



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos magistro studijų programos II kurso studentė

Žydrūnė DEKSNYTĖ

Magistro baigiamasis darbas

Poliuretano degradacijos biotechnologiniais metodais tyrimas

Darbo vadovė:

dr. Inga Matijošytė

Konsultantai:

Rimantas Šiekštelė

Jokūbas Krutkevičius

Vilnius, 2020

Poliuretano degradacijos biotechnologiniais metodais tyrimas

Darbas atliktas: Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Taikomosios biokatalizės sektoriuje

Darbą atliko: Žydrūnė DEKSNYTĖ

Darbo vadovė: dr. Inga MATIJOŠYTĖ

TURINYS

Santrumpos.....	5
ĮVADAS	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Poliuretano pritaikymas	7
1.2. Poliuretano atliekų perdirbimas.....	8
1.3. Poliuretano sintezė	10
1.3.1. Tradicinė cheminė poliuretano sintezė.....	10
1.3.2. Alternatyvūs poliuretano sintezės būdai.....	12
1.4. Biotechnologinė poliuretano degradacija.....	14
1.4.1. Struktūros įtaka biodegradacijai.....	14
1.4.2. Biodegradacijos mechanizmo aspektai	15
1.4.3. Biodegradacija <i>in vivo</i>	18
1.4.4. Biodegradacija <i>in vitro</i>	21
1.4.5. PUazių tyrimai.....	22
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	25
2.1. Prietaisai ir priemonės	25
2.1.1. Prietaisai.....	25
2.2. Medžiagos ir tirpalai	25
2.2.1. Darbo objektas.....	25
2.2.2. Mikroorganizmai, bakterijų kamienai ir plazmidės.....	25
2.2.3. Reagentai.....	26
2.2.4. Terpės ir mikroorganizmų auginimo sąlygos.....	27
2.2.5. Pradmenys	28
2.2.6. Fermentai.....	28
2.2.7. Rinkiniai.....	29
2.2.8. Terpių su PU dažymo tirpalai.....	29
2.2.9. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje tirpalai	29
2.2.10. TLC tirpalai	29
2.2.11. GC tirpalai	29
2.2.12. Kompetentinių <i>E.coli</i> ląstelių paruošimo transformacijai tirpalai.....	30
2.2.13. pDNR išskyrimo ir valymo tirpalai	30
2.2.14. Baltymų koncentracijos nustatymo Bradford metodu tirpalai.....	30
2.2.15. Baltymų elektroforezės tirpalai	30
2.2.16. Uretanazinio aktyvumo nustatymo Berthelot reakcija tirpalai.....	31
2.2.17. Kiti tirpalai	31
2.3. Metodai.....	32
2.3.1. PU skaidančių mikroorganizmų paieška ant selektyvių mitybinių terpių	32
2.3.2. Terpių su PU dažymas.....	33
2.3.3. Genominės DNR išskyrimas	33
2.3.4. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje	33
2.3.5. DNR koncentracijos nustatymas	33
2.3.6. Polimerazės grandininė reakcija – PGR.....	33
2.3.7. Mėginių paruošimas sekoskaitai	34
2.3.8. PU degraduojančių mikroorganizmų tyrimas iš skystos terpės.....	34
2.3.9. Plonasluoksnė chromatografija – TLC.....	35
2.3.10. Dujų chromatografinė (GC) analizė.....	35
2.3.11. Kompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių paruošimas transformacijai.....	36
2.3.12. Kompetentinių <i>E.coli</i> ląstelių transformacija temperatūriniu šoku.....	36

2.3.13. pDNR išskyrimas šarminės lizės metodu	37
2.3.14. pDNR valymas naudojant PEG8000/MgCl ₂	37
2.3.15. pDNR analizė restrikcijos endonukleazėmis	37
2.3.16. Uretanazės geno raiška	38
2.3.17. Ląstelių biomasės ardymas stiklo rutuliukais	38
2.3.18. Baltymų frakcijų atskyrimas	38
2.3.19. Baltymų koncentravimas	39
2.3.20. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradford metodu	39
2.3.21. Baltymų elektroforezė – NDS-PAGE	40
2.3.22. Uretanazinio aktyvumo nustatymas Berthelot reakcija	41
2.3.23. Uretanazinio aktyvumo nustatymas Petri lėkštelėje	41
3. REZULTATAI	43
3.1. Mikrobiologinė PU biodegradacija	43
3.1.1. PU skaidančių mikroorganizmų paieška	45
3.1.2. PU skaidančių mikroorganizmų identifikavimas	47
3.1.3. PES-PU skaidančių mikroorganizmų tyrimas	49
3.1.4. PU biodegradacija laboratoriniais kamienais	51
3.2. Fermentinė PU biodegradacija	53
3.2.1. PU skaidymas komerciniais fermentais	53
3.2.2. Rekombinantinė uretanazė	57
<i>pLATE11 plazmidinis vektorius</i>	58
<i>pET28-MBP-TEV plazmidinis vektorius</i>	62
4. REZULTATŲ APTARIMAS	64
IŠVADOS	66
REZULTATŲ SKLAIDA	67
PADĖKA	67
SANTRAUKA	68
SUMMARY	69
LITERATŪROS SĄRAŠAS	70
<i>Priedas Nr. 1</i>	74
<i>Priedas Nr. 2</i>	75

Santrumpos

AA	akrilamidas
APS	amonio persulfatas
BAA	bis-akrilamidas
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
EtBr	etidžio bromidas
gDNR	genominė DNR
GTE	gliukozės/Tris/EDTA mišinys
YEPD	mielių ekstrakto/peptono/gliukozės mitybinė terpė
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas
JSA	jaučio serumo albuminas
LB	Luria-Bertani mitybinė terpė
NDS	natrio dodecilsulfatas
NDS - PAGE	natrio dodecilsulfato poliakrilamidinė elektroforezė gelyje
NIPU	neizocianatinis poliuretanas (<i>angl.</i> Non Isocyanate Polyurethane)
PDF	poliuretano dispersinė fazė
pDNR	plazmidinė DNR
PEG	polietilenglikolis
PE-PU	polieterinis poliuretanas
PES-PU	poliesterinis poliuretanas
PGR	polimerazės grandininė reakcija
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoridas
PU	poliuretanas
TAE	tris/acto/EDTA buferinis tirpalas
TEMED	N, N, N, N'-tetrametilendiaminas
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
UV	ultravioletiniai spinduliai

IVADAS

Plastikai yra polimerinių medžiagų grupė, pasižyminti skirtingomis savybėmis ir pritaikymu. Tokie plastikai kaip polipropilenas, polietilenas, polivinilchloridas, poliuretanai, polietilentereftalatas yra plačiai naudojami, nes pasižymi patvarumu, lengvumu bei žema kaina. Poliuretanai, pagal gamybos kiekius, yra septintoji plastikų rūšis pasaulyje ir penktoji Europoje¹. Poliuretanai naudojami daugelyje šiuolaikinio gyvenimo sričių – statybose, automobilių pramonėje, baldų, čiužinių gamyboje ir kt. Taigi, poliuretano gaminiai skirti ilgalaikiam naudojimui ir sukurti taip, kad būtų atsparūs biotiniams ir abiotiniams veiksniams. Poliuretano poreikis kiekvienais metais didėja – per pastarąjį dešimtmetį Europoje poliuretano gamyba padidėjo daugiau nei 1,5 karto^{1,2}. Dėl augančio PU vartojimo išskyla jų atliekų tvarkymo problemos ir vis daugiau poliuretano atliekų kaupiasi sąvartynuose. Poliuretano atliekas sudaro ne tik produktai po vartojimo, bet ir gaminant gautos atliekos, sudarančios apie 10 % visos produkcijos. Poliuretano atliekų šalinimas yra problematiškas, kadangi pastaruoju metu taikomi mechaninio ir cheminio perdirbimo procesai yra riboti, o poliuretano deginimo metu susidaro toksiški junginiai - vandenilio cianidas, amoniakas, nitrilo junginiai ir kt. Taigi, būtina ieškoti naujų poliuretano atliekų tvarkymo ir perdirbimo būdų.

Yra žinoma, kad gamtoje grybai ir bakterijos gali vykdyti biologinį poliuretano skaidymą, tačiau skaidymo mechanizmas nėra žinomas. Todėl vienas iš galimų poliuretano atliekų perdirbimo kelių gali būti paremtas biodegradacija. Biodegradacija tai biotechnologiniais metodais paremtas biologinis skaidymas vykdomas mikroorganizmų ir/ar jų išskiriamų fermentų. Toks atliekų tvarkymo procesas yra ekologiškesnis nei minėti prieš tai, kadangi gali būti vykdomas žemesnėje temperatūroje, be cheminių katalizatorių ir yra mažiau teršiantis aplinką. Išsiaiškinus poliuretano biodegradacijos mechanizmą, susidariusius skilimo produktus būtų galima panaudoti pakartotinai cheminėje sintezėje.

Darbo tikslas: ištirti poliuretano degradaciją biotechnologiniais metodais.

Darbo uždaviniai:

1. izoliuoti ir identifikuoti poliuretano skaidančius mikroorganizmus;
2. atlikti poliuretano skaidymo komerciniais fermentais tyrimą;
3. atlikti rekombinantinės uretanazės geno raiškos optimizavimą.

¹ https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics_the_facts_2018_AF_web.pdf

² <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/115-plastics-facts-2011>

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Poliuretano pritaikymas

Poliuretanai (PU) – tai kondensacinis polimeras, pirmą kartą susintetintas vokiečių chemiko Otto Bayer 1937 m. Poliuretano naudojimas išplito per Antrąjį pasaulinį karą, kai elastomerų gamyboje jis pakeitė natūralų kaučiuką (Magnin A. *ir kt.*, 2019). Pastaruoju metu poliuretanoi yra septintoji labiausiai paplitusi plastikų rūšis pasaulyje ir penktoji Europoje³. 2017 m. poliuretanoi sudarė 7,7 % (4,9 mln tonų per metus) viso Europoje pagaminamo plastiko, ir pagal gamybos kiekius 2010 m. aplenkė polietilentereftalatus (PET), kurių gamyba sudaro 7,4 % visų plastikų⁴. Poliuretano gamybai naudojamų poliolių ir izocianatų įvairovė leidžia sintetinti skirtingų savybių poliuretanus, pagal kurias išskiriami du tipai: *putų poliuretanoi* ir *CASE* (*angl.* Coatings, Adhesives, Sealants, Elastomers) *poliuretanoi* (dangos, elastomerai, klijai, hermetikai ir kt.), kurie pritaikomi įvairiose srityse (**1.1 pav.**) (Simon D. *ir kt.*, 2018).



1.1 pav. Poliuretano tipai ir jų pritaikymas, pagal Magnin A. *ir kt.*, 2018

Putų poliuretanoi sudaro pagrindinę poliuretanų rinkos dalį - 65 % (Magnin A. *ir kt.*, 2018). Poliuretano putas gali būti standžios arba lanksčios. Standžios yra naudojamos šaldytuvų bei pastatų šilumos ir garso izoliacijai. Lanksčias poliuretano putas dar galima suskirstyti į dvi grupes: viskoelastinės putas ir didelio atsparumo putas. Viskoelastinės putas, dėl lengvo prisitaikymo prie kūno formų, naudojamos pagalvėms, čiužiniams, biuro baldams, sporto įrangoje, avalinėje, taip pat ergonomiškomis priemonėmis, tokioms kaip kaklo, nugaros pagalvėlės. Didelio atsparumo putas naudojamos paminkštinimams automobilių pramonėje (Simon D. *ir kt.*, 2018).

³ https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics_the_facts_2018_AF_web.pdf

⁴ <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/115-plastics-facts-2011>

CASE poliuretanoi sudaro 32 % visos poliuretano produkcijos: dangos - 13 %, elastomerai - 12 %, klizai ir hermetikai - 7 % (Magnin A. *ir kt.*, 2018). *CASE* poliuretanų pritaikymo spektras yra labai platus, pradedant nuo sportinių batelių, lengvosios atletikos takų, automobilių dangų iki konstrukcinių laivo dalių (Simon D. *ir kt.*, 2018). Pavyzdžiui, PU dangos naudojamos kaip apsauginis sluoksnis nuo dilimo, korozijos ir aplinkos sąlygų. O automobilių pramonėje, kaip pagrindinis kėbulo dalių sujungimo būdas, vietoje taškinio suvirinimo, vis dažniau naudojamas klizavimas poliuretano pagrindu pagamintais klizais, kurie padidina bendrą automobilio kėbulo sandarumą ir lengvumą (Berntsen J.F. *ir kt.*, 2019).

Taip pat poliuretanai laikomi viena iš geriausiai biologiškai su krauju ir audiniais suderinamų medžiagų, todėl yra svarbus kuriant daugelį medicinos prietaisų: kateterių, širdies vožtuvų, kraujagyslių, implantų, sąnarių protezų. Šie gaminiai sudaro apie 3 % visos poliuretano gamybos. Pritaikymą medicinos srityje lemia poliuretanų stabilumas *in vivo*, kurią sąlygoja atsparumas makromolekulinei oksidacijai, hidrolizei ir kalcifikacijai (Santerre J.P. *ir kt.*, 2005).

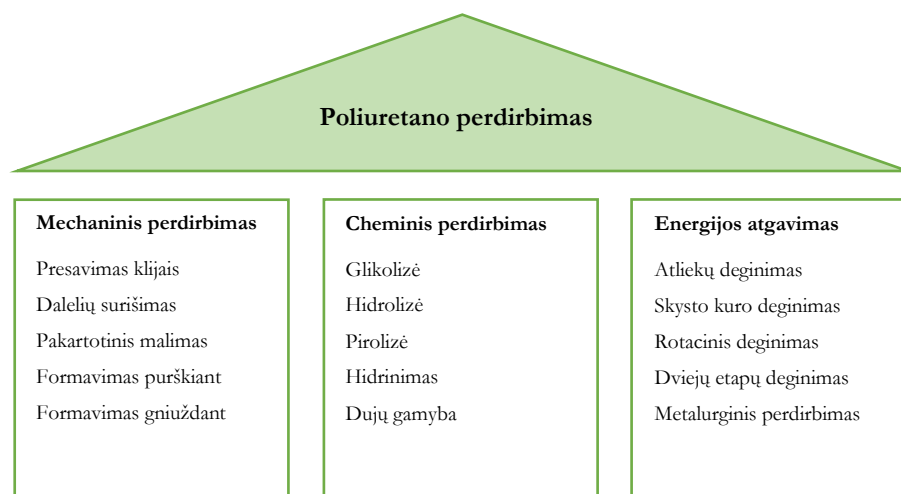
1.2. Poliuretano atliekų perdirbimas

Praėjus daugiau nei penkiasdešimt metų po poliuretano sintezės pradžios, atsirado pirmosios su poliuretano utilizavimu susijusios aplinkosaugos problemos, kurios išlieka aktualios iki šiol (Cregut M. *ir kt.*, 2013). Kiekvienais metais poliuretano poreikis didėja – per pastarąjį dešimtmetį Europoje poliuretano gamyba padidėjo daugiau nei 1,5 karto^{5,6}. Dėl augančio PU vartojimo, vis daugiau poliuretano atliekų kaupiasi sąvartynuose. Poliuretano atliekas sudaro ne tik produktai po vartojimo, bet ir gaminant gautos atraižos, sudarančios apie 10 % visos produkcijos (Simon D. *ir kt.*, 2018). Šiuo metu taikomus poliuretano atliekų perdirbimo metodus galima suskirstyti į tris kategorijas (**1.2 pav.**):

- *Mechaninis perdirbimas*. Poliuretano atliekos mechaniškai paverčiamos granulėmis ar milteliais ir naudojamos naujo produkto gamyboje. Polimero vidinė struktūra nepasikeičia.
- *Cheminis perdirbimas*. Cheminių vyksmų metu gaunami poliuretano monomerai, kurie gali būti naudojami chemijos ir naftos pramonėje.
- *Energijos išgavimas*. Poliuretano atliekos dalinai arba visiškai oksiduojamos, išgaunant šilumą ir energiją. Degimo metu susidaro toksiški junginiai – vandenilio cianidas, amoniakas, nitrilo junginiai ir kt. (Zevenhoven R., 2004; Simon D. *ir kt.*, 2018; Garrido A. *ir kt.*, 2016).

⁵ https://www.plasticseurope.org/application/files/6315/4510/9658/Plastics_the_facts_2018_AF_web.pdf

⁶ <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/115-plastics-facts-2011>



1.2 pav. Poliuretano atliekų perdirbimo metodai, pagal Zevenhoven R., 2004

Šiuo metu nėra biotechnologija pagrįstų PU perdirbimo būdų. Kita vertus, nustatyta, kad gamtoje grybai ir bakterijos gali vykdyti biologinį poliuretano skaidymą, tačiau procesas yra lėtas (Nakajima-Kambre T. *ir kt.*, 1999; Howard G., 2002). Aplinkoje poliuretanai pirmiausia yra veikiami abiotinių veiksnių - temperatūros, saulės šviesos, drėgmės. Šie faktoriai sukelia paviršiaus pažeidimus ir palengvina mikroorganizmų prieigą. Toliau mikroorganizmai fermentinės hidrolizės ir/ar oksidacijos būdu suskaido polimero makromolekules iki oligomerų ir monomerų. Susidariusius mažos molekulinės masės junginius mikroorganizmai gali pasisavinti ir įjungti į metabolizmo kelius. Todėl poliuretano perdirbimui taip pat gali būti priskiriama biodegradacija, kuri vykdoma mikroorganizmų *in vivo* arba fermentiniu skaidymo būdu *in vitro*. Šis atliekų tvarkymo procesas yra ekologiškesnis nei prieš tai aptarti, kadangi gali būti vykdomas žemoje temperatūroje, be cheminių katalizatorių ir yra mažiau teršiantis (Magnin A. *ir kt.*, 2018).

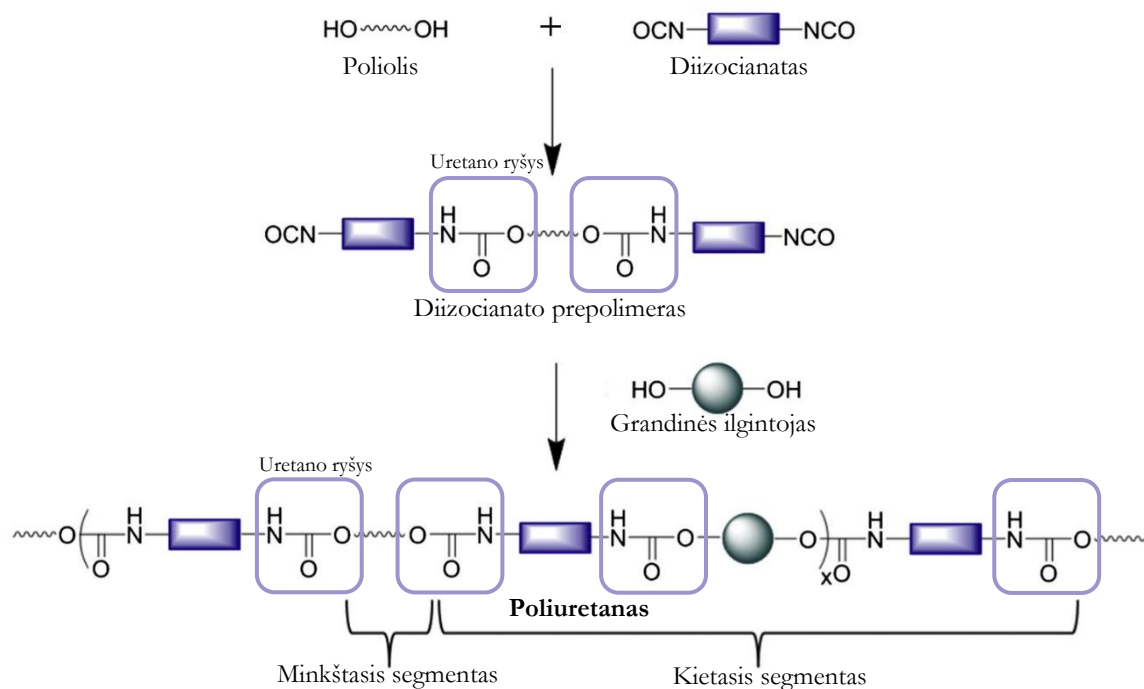
Mikroorganizmų vykdomas biologinis skaidymas naudingas pastaruoju metu ypač aktualiai temai – mikroplastikų keliamai taršai. Poliuretano mikroplastikų gabalėliai susidaro dėvintis padangoms, dažams ar sintetinėms dangoms, ir jų dydis svyruoja nuo 100 nm iki 0,5 cm (Naik R.K. *ir kt.*, 2019). Ypatinę pavojų mikroplastikų dalelės kelia patekusios į vandens telkinius - vandens organizmų praryti mikroplastikai gali neigiamai paveikti jų išgyvenamumą, sukelti morfologinius, histopatologinius pokyčius ar genetinį bei reprodukcinį toksiškumą. Mikroplastikai taip pat kelia grėsmę ekosistemai dėl bioakumuliacijos ir biomagnifikacijos visoje maisto grandinėje, galimai sukeldami sveikatos sutrikimus žmonėms ir gyvūnams (Wu Q. *ir kt.*, 2019). Todėl biodegradacija yra laikoma perspektyviu biotechnologinio perdirbimo procesu, galinčiu pakeisti poliuretano atliekų kaupimą ar jų deginimą. Poliuretano biodegradacija mikroorganizmais ir fermentais plačiau aptariama 1.4 skyriuje.

1.3. Poliuretano sintezė

Priklausomai nuo sintezėje naudojamų struktūrinių segmentų, yra sukuriama skirtingos struktūros poliuretani. Jų biologinis skaidumas priklauso nuo gamybos proceso sąlygų, poliolio tipo, naudotų priedų, molekulinėse grandinėse esančių cheminių grupių bei kietųjų ir minkštųjų segmentų santykio (Loreda-Trevino A. *ir kt.*, 2012). Taigi, poliuretano sintezės sąlygos ir cheminė struktūra yra svarbūs veiksniai norint suprasti, kodėl vieni poliuretani lengvai skaidomi, o kiti mažai ar visai neskaidomi.

1.3.1. Tradicinė cheminė poliuretano sintezė

Poliuretano sintezė, tai egzoterminis procesas susidedantis iš dviejų etapų (**1.3 pav.**). Pirmo etapo metu vyksta sąveika tarp poliolių ir izocianatų, turinčių vieną ar daugiau reaktyvių izociano grupių. Šios sąveikos pagrindas – uretano (-NH-CO-O-) jungties susidarymas. Antrame etape prepolimeras reaguoja su mažos molekulinės masės grandinės ilgintoju (Mahajan N. ir Gupta P., 2015; Magnin A. *ir kt.*, 2019). Susintetintą poliuretana, pagal struktūrą, galima apibūdinti kaip kopolimerą sudarytą iš minkštųjų ir kietųjų molekulių segmentų. Minkštieji segmentai – tai ilgos poliolių grandinės. Kietieji segmentai sudaryti iš diizocianato ir grandinės ilgintojo. Pakeitus molekulių segmentų santykį ar tipą, gali susidaryti skirtingų fizikinių savybių poliuretani, t.y. minkštieji segmentai suteikia elastingumą, o kietieji – tvirtumą (Barrioni B.R. *ir kt.*, 2015). Šie segmentai tarpusavyje sujungti kovalentiniais ryšiais (Jirakittidul K., 2013).



1.3 pav. Poliuretano sintezės schema, pagal Cornille A. *ir kt.*, 2017

Grandinės ilgintojai, naudojami poliuretano kompozicijose, yra polioliai arba diaminai: 1,4-butandiolis, 1,2-etandiolis ir 1,2-etandiaminas. Grandinės ilgintojai prisideda prie poliuretano molekulės modifikavimo kietajame segmente (Barrioni B.R. *ir kt.*, 2015).

Minkštųjų segmentų polioliai gali būti polieteriniai, poliesteriniai, polikarbonatiniai arba šių poliolių deriniai. Priklausomai nuo naudojamo poliolio tipo išskiriamos dvi pagrindinės poliuretanų grupės: polieteriniai poliuretanai (PE-PU) ir poliesteriniai poliuretanai (PES-PU) (Mahajan N. ir Gupta P., 2015). Dauguma poliolių poliuretano gamybai yra gaunami iš naftos produktų, todėl tausoiant iškastinių energijos šaltinių naudojimą, yra ieškoma alternatyvų ir orientuojamasi į poliolius iš atsinaujinančių medžiagų.

Izocianatai, naudojami poliuretano gamyboje, yra skirstomi į dvi klases: alifatiniai ir aromatiniai. Dažniausiai PU pramonėje naudojami alifatiniai diizocianatai yra heksametileno diizociantas (HDI) arba izoforono diizociantas (IPDI). Tolueno diizociantas (TDI) ir metilendifenilo diizociantas (MDI) yra aromatinių izocianatų pavyzdžiai (Engels H.W. *ir kt.*, 2013). Svarbu tai, kad izocianatų gamyba kenksminga dėl jų sintezėje naudojamų nuodingų fosgeno dujų. Be to, MDI ir TDI priskiriami CMR junginiams (*angl.* Carcinogenic, Mutagenic, Reprotoxic), kurie yra kancerogeniniai, mutageniniai ir toksiški reprodukcijai. Ilgalaikis šių junginių poveikis kelia grėsmę žmonių sveikatai, sukelia ūmius apsinuodijimus, astmą ar dermatitą (Cornille A. *ir kt.*, 2017). 2015 m. Europoje priimtas REACH reglamentas, kuriuo yra ribojamas tam tikrų izocianatų naudojimas pramonėje, tokių kaip 4,4-metilendifenilo diizociantas, 1,5-naftileno diizociantas, 2-metil-m-fenileno diizociantas ir kt. Pagal šį reglamentą diizocianatų koncentracija medžiagoje ar mišinyje turi sudaryti ne daugiau kaip 0,1 % visos gaminio masės⁷. Tokiu būdu PU gamintojai yra skatinami ieškoti naujų poliuretano gamybos kelių.

Sintetinant poliuretanus, be poliolių bei izocianatų naudojami ir kiti komponentai, tokie kaip katalizatoriai, plastifikatoriai, antipirenai, pigmentai, kryžminiai grandinių sujungėjai, užpildai, pūtikliai. Šie sintezės priedai suteikia pageidaujamas galutinio gaminio savybes (**1.1 lentelė**) (Akindoyo J.O. *ir kt.*, 2016).

1.1 lentelė. PU sintezėje naudojami priedai ir jų suteikiamos savybės, pagal Akindoyo J.O. *ir kt.*, 2016

Priedai	Naudojimo priežastys
Katalizatoriai	Pagreitina reakciją tarp izocianatų ir poliolių - reakcija gali vykti žemesnėje temperatūroje.
Plastifikatoriai	Sumažina medžiagos kietumą.
Pigmentai	Suteikia medžiagai spalvą.
Grandinės ilgintojai	Naudojami molekulės modifikavimui; Suteikia mechaninę atramą, kuri pagerina medžiagos savybes.

⁷ <https://echa.europa.eu/documents/10162/d6794aa4-8e3a-6780-d079-77237244f5f9>

1.1 lentelės tęsinys.

Priedai	Naudojimo priežastys
Pūtikliai	Naudojami poliuretano putų gamyboje. Kontroliuoja burbuliukų susidarymą sintezės metu ir putų elementų struktūrą.
Užpildai	Sumažina medžiagų sąnaudas; Pagerina standumą ir atsparumą tempimui.
Antipirenai	Sumažina medžiagos degumą.
Dūmų slopikliai	Sumažina dūmų susidarymą deginant medžiagą.

Naudojant atitinkamus priedus galima kontroliuoti ne tik poliuretano sintezės sąlygas, sukurti reikiamas galutinio produkto fizines savybes, bet ir pagerinti biologinio skaidumo savybes. Pavyzdžiui, į minkštąjį segmentą įterpus lengvai hidrolizuojamą polietilenglikolį (PEG), padidinamas poliuretano skaidymo greitis ir yra gaunami netoksiški skilimo produktai (Barrioni B.R. *ir kt.*, 2015).

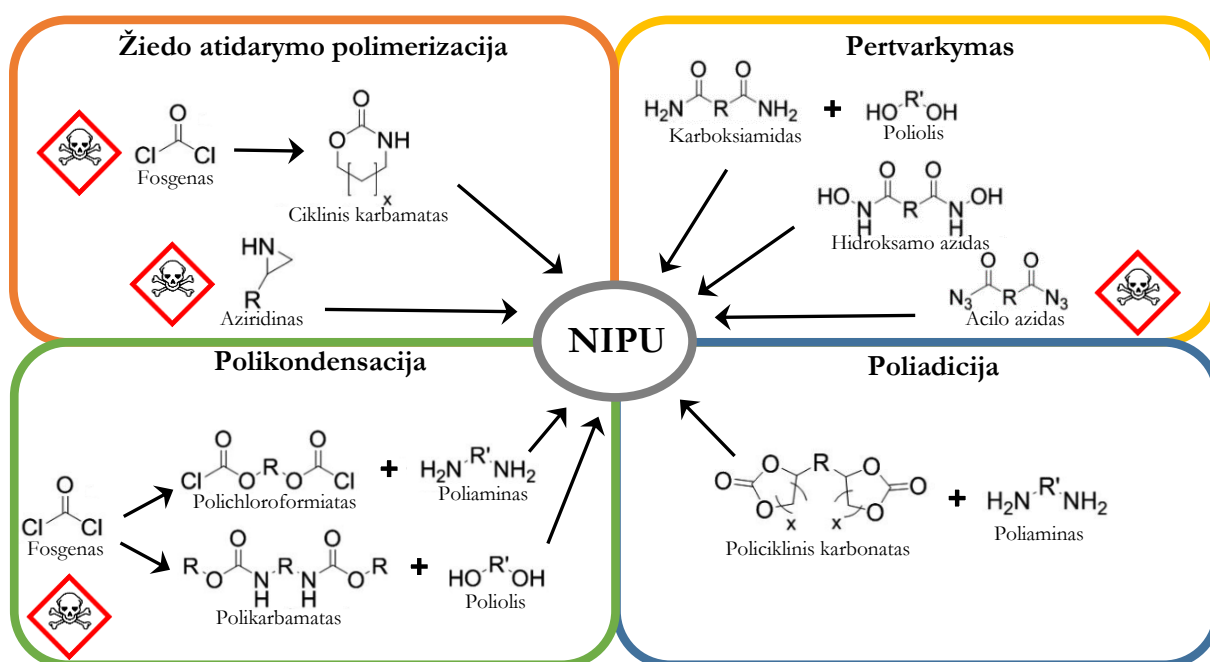
1.3.2. Alternatyvūs poliuretano sintezės būdai

Poliuretano pramonės iššūkis yra pereiti nuo naftos pagrindu pagamintų poliuretanų prie atsinaujinančių išteklių naudojimo. Pastaruoju metu dėmesio centre yra dvi tradicinės poliuretano sintezės alternatyvos (Nohra B. *ir kt.*, 2013).

Pirmoji alternatyva yra orientuota į naftos pagrindo poliolių pakeitimą biologinės kilmės polioliais, kurie gaunami iš skirtingų augalinių aliejų, tokių kaip rapsų, saulėgrąžų, sojų, palmių, linų sėmenų ir ricinos aliejų (Prociak A. *ir kt.*, 2019). Augaliniai aliejai yra tinkami poliuretano sintezei, jei jų molekulėje yra daugiau kaip 2,5 hidroksilo (-OH) grupės. Todėl augaliniai aliejai turi būti modifikuojami ir į jų struktūrą įvedamos papildomos polioliams būdingos hidroksilo grupės, pvz., dvigubų jungčių pavertimas hidroksilo grupėmis, epoksidacijos ar transesterifikacijos reakcijos (Nohra B. *ir kt.*, 2013; Milan D.A. *ir kt.*, 2018; Prociak A. *ir kt.*, 2019). Vienintelis augalinis aliejus, kurį galima tiesiogiai naudoti kaip poliolių, yra ricinos aliejus (2,7 -OH/molekulėje) (Nohra B. *ir kt.*, 2013). Biologinės kilmės polioliai iš atsinaujinančių išteklių komerciškai yra prieinami nuo 2006 m. Pavyzdžiui, įmonė „Huntsman“ siūlo JEFFADD™ B650 poliolių, kuris yra sintetinamas iš epoksidinto sojų aliejaus, ir skirtas standžių dangų, klijų, putų poliuretanams gaminti. Įmonė „Hobum Oleochemicals“ gamina MERGINOL™ poliolių sudarytus iš ricinos, linų sėmenų ir sojų pupelių aliejų, tinkamus poliuretano putoms, dangoms ir dispersijoms gaminti (Desroches M. *ir kt.*, 2012). Nepaisant to, kad biologiniais polioliais yra mažinamas naftos pagrindu gaunamų medžiagų naudojimas, tačiau vis dar išlieka izocianatų toksiškumo problema.

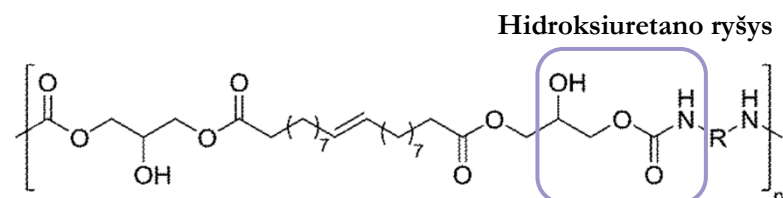
Antroji alternatyva yra beizocianatinių poliuretanų kūrimas. Išskiriami keturi neizocianatinių poliuretanų (NIPU - *angl.* Non Isocyanate Polyurethane) sintezės keliai (**1.4 pav**):

- *Žiedo atidarymo polimerizacija*: naudojami cikliniai karbamatai arba aziridiniai. Reakcijos metu šalutiniai produktai neišsiskiria, tačiau cikliniai karbamatai gaminami iš fosgeno, o aziridiniai yra toksiški. Be to, reakcijos vykdomos aukštoje temperatūroje.
- *Pertvarkymas*: vyksta karboksiamidų, hidroksamo azidų arba acilo azidų pertvarkymas, tačiau šie junginiai yra kenksmingi.
- *Polikondensacija*: reakcijoje dalyvaujančių monomerų sintezei yra reikalingos fosgeno dujos. Taip pat išsiskiria šalutiniai produktai, kurie apsunkina pritaikymą pramonėje.
- *Poliadicija*: vyksta ciklinių karbonatų ir aminių polimerizacija. Šios reakcijos privalumas – išvengiama fosgeno naudojimo. Be to, penkianariai cikliniai karbonatai gaunami iš CO₂, taip mažinamas šiltnamio efektą sukeliančių dujų kiekis (Cornille A. *ir kt.*, 2017; Ke J. *ir kt.*, 2017).



1.4 pav. Neizocianatinio poliuretano sintezės keliai, NIPU – neizocianatiniai poliuretanoi, pagal Cornille A. *ir kt.*, 2017

Literatūroje pastebimas mokslo ir pramonės atstovų susidomėjimas poliadicijos technologija. (Llevot A. ir M. Meier, 2018; Ma Z., *ir kt.*, 2017). Poliadicijos metu gautas neizocianatinis poliuretanai yra vadinamas polihidroksiuretanu. Polihidroksiuretanai yra analogiškas tradiciniam poliuretanui, tačiau šalia kiekvienos uretano jungties turi papildomą pirminę arba antrinę hidroksilo grupę (**1.5 pav.**) (Beniag G. *ir kt.*, 2017). Šių hidroksilo grupių buvimas pagerina cheminį ir hidrolizinį stabilumą (Velthoven J. *ir kt.*, 2015).



1.5 pav. Polihidroksiuretano struktūrinė formulė, pagal Fiorani G. ir kt., 2018

Polihidroksiuretano sintezės trūkumai yra žemas reaktyvumas kambario temperatūroje bei mažos molekulinės masės junginių susidarymas, lyginant su poliuretanais gautais iš diizocianatų ir poliolių. (Cornille A. ir kt., 2017). Reaktyvumas kambario temperatūroje gali būti padidintas gaminant hibridinius neizocianatinius poliuretanus (H-NIPU). „*Nanotech Industries*“ 2015 m. sukūrė hibridinį poliepoksido polihidroksiuretano pavadinimu „*Green Polyurethane*™“. Tai yra pirmasis neizocianatinių poliuretano pritaikymas pramonėje, kuris yra naudojamas standžių ir lanksčių putų, dangų ar hermetikų gamyboje⁸.

Naujos kartos poliuretanoi ateityje gali visiškai pakeisti įprastus poliuretanus gautus iš naftos pagrindo poliolių ir izocianatų. Tačiau vis dar išlieka aktuali besikaupiančių tradicinių poliuretano taršos problema. Ieškoma naujų sprendimo būdų, kaip efektyviai suskaidyti ir perdirbti susidariusias atliekas.

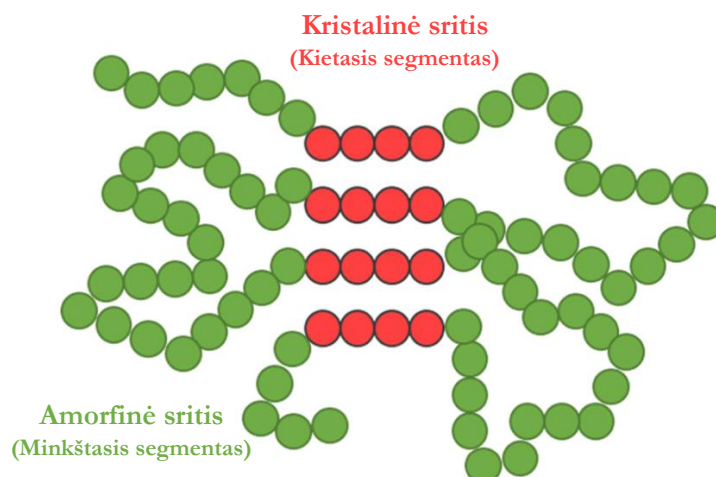
1.4. Biotechnologinė poliuretano degradacija

Biodegradacija, tai biotechnologiniais metodais paremtas skaidymas vykdomas mikroorganizmų ir jų išskiriamų fermentų (Magnin A. ir kt., 2019; Cregut M. ir kt., 2013). Poliuretano biodegradacijos srityje atliekami moksliniai tyrimai, kurie apima poliuretano ardančių mikroorganizmų pasiskirstymą aplinkoje, mikroorganizmų identifikavimą, skaidančių fermentų atradimą ir šių fermentų genų klonavimą į raiškos sistemas.

1.4.1. Struktūros įtaka biodegradacijai

PU sintezės metu susidariusios uretano, karbamido, esterinės grupės yra jautrios hidrolizei ir linkusios dalyvauti poliuretano biodegradacijoje, tačiau jos ne visada yra lengvai prieinamos fermentams (Krasowska K. ir kt., 2015). Kietojo segmento grandinių taisyklingumas leidžia polimero grandinėms artimai susipakuoti, dėl ko susidaro kristalinės sritys, ribojančios mikroorganizmų ir jų sekretuojamų fermentų prieinamumą, o amorfinės sritys dėl naudojamų ilgų ir šakotų poliolių grandinių yra lengvai prieinamos (**1.6 pav.**). Eksperimentiškai buvo nustatyta, kad poliuretano minkštųjų segmentų hidrolizė vyksta greičiau nei kietųjų (Howard G.T., 2002).

⁸ <https://nanotechindustriesinc.com/GPU.php>



1.6 pav. Poliuretano grandinių tarpusavio sąveika, pagal *Magnin A. ir kt., 2019*

Biologinio skaidumo savybes ypač lemia minkštajame segmente naudojami polioliai. Priklausomai nuo poliolių tipo, dažniausiai išskiriami polieterinio (PE-PU) arba poliesterinio (PES-PU) tipo poliuretanoi. PE-PU yra gana atsparus hidrolizei, tačiau yra jautrus oksidaciniam skilimui. PES-PU yra biologiškai skaidesnis dėl hidrolizei jautrių esterinių jungčių gausos (Mahajan N. ir Gupta P., 2015; Rehman F.U., 2010). Vertinant PU bioskaidumą yra svarbus poliolio funkcionalumas, kuris išreiškiamas hidroksido (-OH) grupių skaičiumi molekuleje. Padidinus poliolio hidroksido grupių skaičių, susidaro didesnis grandinių kryžminis susijungimas, kuris lemia standesnius poliuretano produktus, pasižyminčius didesniu cheminiu, šiluminiu bei biodegradaciniu atsparumu⁹.

Kietojo segmento cheminė struktūra taip pat turi įtakos biologiniam poliuretano skaidymui. Kietajame segmente esantys alifatiniai diizocianatai yra labiau biologiškai skaidūs dėl grandinių lankstumo ir lengvesnio fermentų prieinamumo nei aromatiniai diizocianatai (Howard G.T., 2002).

PE-PU sudaro apie 75 % pramonėje naudojamo poliuretano, tačiau dėl didelio atsparumo biotiniams ir abiotiniams veiksniams apie jo biodegradaciją literatūroje pateikiama mažai informacijos. Didžioji dalis biodegradacijos tyrimų orientuoti į PES-PU skaidymą (Nohra *ir kt.*, 2013).

1.4.2. Biodegradacijos mechanizmo aspektai

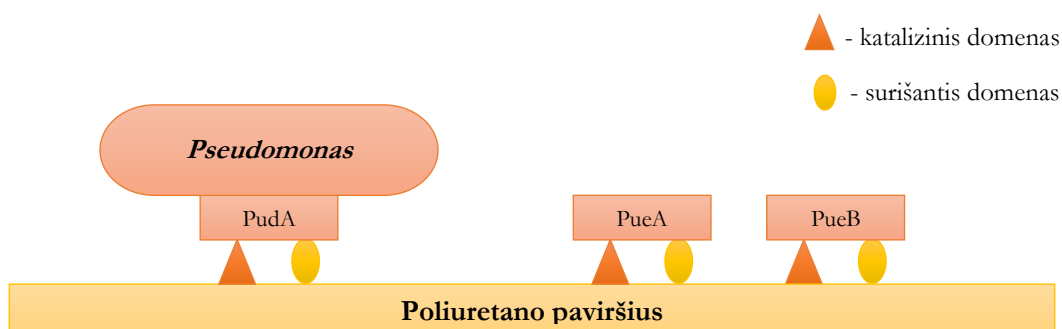
Biologinio skaidymo metu, mikroorganizmai polimerines medžiagas, tarp jų ir poliuretana, gali veikti skirtingai:

- *Biofizinis poveikis*: ląstelių augimas ant polimero paviršiaus;
- *Biocheminis poveikis*: mikroorganizmų gaminami metabolitai daro įtaką polimerams;

⁹ <https://www.tri-iso.com/polyurethane-polycaprolactone-polyols.html>

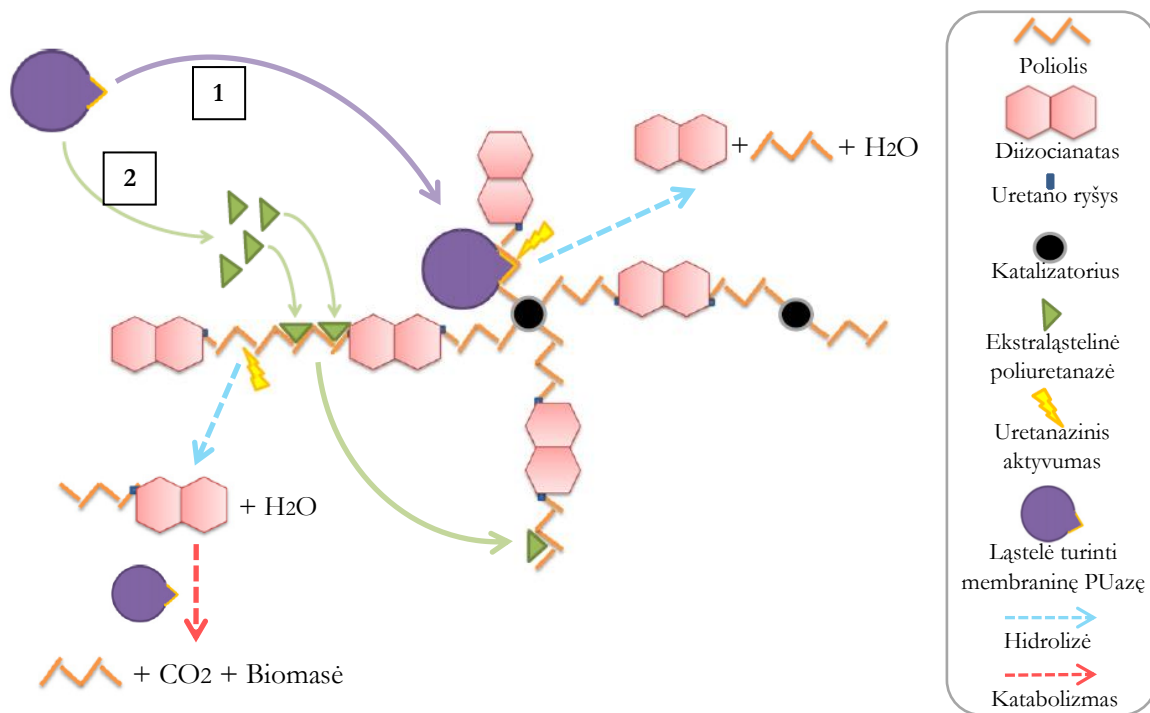
- *Tiesioginis fermentinis poveikis*: mikroorganizmų fermentai veikia polimerą ir vykdo polimerinės grandinės degradaciją (Loredo-Trevino A. *ir kt.*, 2012; Petry do Conto V. *ir kt.*, 2019).

Mikroorganizmų poveikį apsunkina tai, kad poliuretanai dėl kristalinio kietojo segmento pobūdžio netirpsta vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, tokiuose kaip etanolis, metanolis, izopropanolis ar acetonas (Cregut M. *ir kt.*, 2013). Todėl poliuretanai, kaip netirpus substratas, turi ypač mažą sąlytį su fermento molekulėmis, dėl ko yra ribojamas ardančių fermentų prieinamumas. **Akutsu Y. *ir kt.* (1998)**, nustatė, kad poliuretano skaidančios viduląstelinės esterazės pasižymi gebėjimu adsorbuotis prie substrato paviršiaus, t.y. turi hidrofobinį prie poliuretano paviršiaus rišantį domeną. Poliuretano biodegradacija atliekama per dviejų domenų sąveiką: fermento adsorbcija prie hidrofobinio substrato paviršiaus per surišantį domeną ir esterinės jungties hidrolizė per katalizinį domeną (**1.7 pav.**) (Howard G.T., 2002).



1.7 pav. Esterazės sąveikos su poliuretano paviršiumi modelis. PudA – viduląstelinis fermentas; PueA ir PueB – ekstraląsteliniai fermentai, pagal Howard G.T., 2002

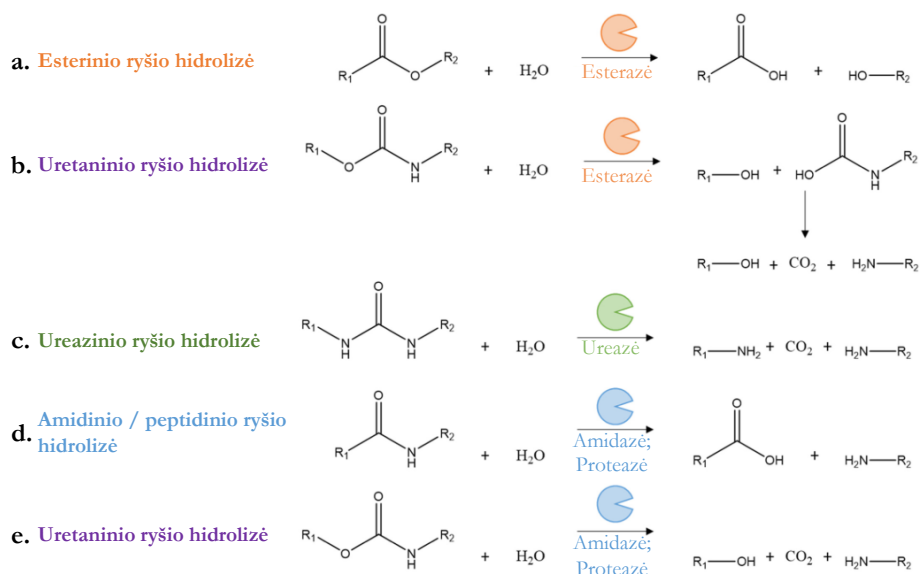
Poliuretano skaidantys fermentai bendrai yra vadinami poliuretanazėmis (PUazėmis). Mikroorganizmų vykdomame poliuretano skaidyme, gali dalyvauti dviejų tipų fermentai: su ląstelės membrana susijusi viduląstelinė PUazė ir tirpi ekstraląstelinė PUazė (**1.8 pav.**). Abiejų fermentų vyksmai naudingi poliuretano ardančioms bakterijoms. Ląstelių adhezija prie poliuretano paviršiaus per membraninę PUazę leidžia substratą hidrolizuoti iki tirpių metabolitų (1.8 pav. 1 kelias). Ekstraląstelinė PUazė hidrolizuoja poliuretano į mažesnius tirpius monomerus, kurie gali būti metabolizuojami ląstelėje, taip pat palengvina kitų fermentų prieigą prie dalinai suskaidyto polimero (1.8 pav. 2 kelias) (Howard G.T., 2002).



1.8 pav. Poliuretano biodegradacijos mechanizmas: **1** – biologinis skaidymas dėl ląstelių adhezijos ir viduląstelinų fermentų veiklos; **2** – biologinis skaidymas dėl ekstraląstelinų fermentų veiklos, pagal Cregut M. ir kt., 2013

Veikiant mikroorganizmams ir jų sekretuojamiems fermentams, poliuretano molekulinė masė pakankamai sumažinama, susidarant vandenyje tirpiems tarpiniams produktams, kurie gali būti eksportuojami į ląstelės vidų ir įjungiami į mikroorganizmo metabolizmo kelius (Kupka V., 2018).

Naudojant oksidacinius fermentus, pvz., kaip grybelinę peroksidazę ir lakazę, buvo atlikti PES-PU fermentinio skaidymo tyrimai, tačiau dauguma poliuretano biodegradacijos tyrimų yra susiję su hidrolizinių fermentų naudojimu. Hidrolazės, galinčios vykdyti poliuretano biodegradaciją, yra esterazė, ureazė, peptidazė ir amidazė (**1.9 pav.**).



1.9 pav. Fermentinė poliuretano hidrolizė veikiant esterazėms, ureazėms, amidazėms ir proteazėms, pagal Magnin A. ir kt., 2019

Dažniausiai vykdoma esterinių ryšių hidrolizė esterazėmis, susidarant karboksirūgščiai ir alkoholiui (**1.9 pav. a.**). Esterazės taip pat gali veikti uretaninę jungtį, susidarant alkoholio ir karbamo rūgšties molekulėms. Tačiau šis mechanizmas yra abejotinas, dėl nestabilios karbamo rūgšties, kuri nedelsiant skyla į aminą, išsiskiriant anglies dioksido molekulei (**1.9 pav. b.**) (Magnin A. *ir kt.*, 2019).

1.4.3. Biodegradacija *in vivo*

Mikroorganizmai gali skaidyti poliuretaną *in vivo* naudodami jį tik kaip anglies šaltinį arba kaip anglies ir azoto šaltinį. **Darby R.T. ir Kaplan A.M (1968)** atliko pirmąjį poliuretano biodegradacijos tyrimą su mikroorganizmais. Tyrimo tikslas buvo išsiaiškinti mikroorganizmų poveikį PES-PU ir PE-PU, siekiant sukurti biotinėmis aplinkos sąlygomis stabilius poliuretanus. Buvo naudoti skirtingos struktūros poliuretanoi, gauti reaguojant keturiems diizocianatams su 25-iais polioliais, ir šešios grybų rūšys: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *Pullularia pullulans*, *Trichoderma* sp. Visi tirti PES-PU buvo jautrūs grybų poveikiui, tačiau PE-PU dalinai arba visiškai atsparūs. Autorių teigimu, yra reikalingos bent dvi metileno grupės, kad įvyktų pastebimas PE-PU depolimerizavimas.

Praėjus daugiau kaip 50 metų nuo pirmųjų poliuretano biodegradacijos tyrimų pradžios, dabar vienas iš pagrindinių tyrimų tikslų yra surasti mikroorganizmus, gebančius skaidyti poliuretaną ir naudoti kaip anglies šaltinį. **Magnin A. ir kt. (2018)**, identifikavo *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. ir *A. flavus* kamienus, galinčius naudoti PES-PU kaip vienintelį mitybinį anglies šaltinį. PES-PU biodegradacija vykdyta minimalioje MM terpėje (*angl.* Minimal Medium) 30 °C temperatūroje 2 mėnesius. Fermentiniai tyrimai parodė esterazinį kamienų aktyvumą, dėl ko FT-IR (*angl.* Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) spektrų analizės metu pastebėtas esterinės jungties signalo sumažėjimas ir hidroksido (-OH) bei amino (-NH₂) grupės reprezentuojančių signalų padidėjimas. Efektyviausiai PES-PU biodegradaciją vykdė *P. brasilianum*. Ši rūšis plačiai naudojama biotechnologijoje dėl produktyvios bioaktyvių antrinių metabolitų, tokių kaip feruloilinio esterazė, celiulazė, α- ir β-galaktozidazė, gamybos (Bazioli J.M. *ir kt.*, 2017).

Kaip minėta, poliuretano biodegradacija itin priklauso nuo minkštajame segmente naudojamo poliolio tipo. **Alvarez-Barragan J. ir kt. (2016)**, atliko grybų gebėjimo skaidyti PES-PU ir PE-PU tyrimus. Iš įvairių aplinkos mėginių buvo izoliuotos 73 morfologiškai skirtingos grybų rūšys, iš kurių identifikavo gebančias biodegraduoti PES-PU poliuretaną: *Cladosporium pseudocladosporioides*, *C. tenuissimum*, *C. asperulatum*, *C. montecillanum*, *A. fumigatus* ir *P. chrysogenum*. Tai, kad keturios iš šešių geriausiai poliuretaną skaidančių rūšių, priklauso tai pačiai genčiai, rodo, jog galimai gebėjimas skaidyti poliuretaną išsivystė dėl šios

genties fiziologijos ir genetikos. *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1 kamienas, po inkubacijos tamsoje skystoje MM terpėje per 14 dienų 30 °C temperatūroje sugebėjo suskaidyti 87 % komercinio PES-PU „Impranil“. Po biodegradacijos FT-IR spektruose pastebėti karbonilo grupių signalo sumažėjimai yra susiję su minkštajame segmente esančių esterinių ir uretano ryšių skilimu. PES-PU skaidyme dalyvavo ekstraląsteliniai fermentai – nustatytas aukštas esterazinis aktyvumas, maksimaliai pasireiškiantis 7 inkubavimo dieną, ir žemas ureazinis aktyvumas. GC-MS (*angl.* Gas Chromatography-Mass Spectrometry) analize nustatytas alkoholių bei heksano diizocianatų susidarymas, patvirtina įvykusią esterinių ir uretano jungčių hidrolizę.

Tiriant tų pačių grybų vykdomą PE-PU putų biodegradaciją, nustatyta, kad mažiausiai PE-PU skaidantys grybai augo tik putų paviršiuje, o aktyviai poliuretaną biodegraduojantys grybai hifais įaugo į putų gilumą. Geriausiu PE-PU skaidymu pasižymėjo *C. tenuissimum* A2.PP.5, kuris inkubuojamas 21 dieną 25–30 °C temperatūroje, suskaidė 65 % PE-PU. Geriausiu PES-PU skaidymu pasižymėjęs *C. pseudocladosporioides* T1.PL.1, PE-PU biodegradaciją vykdė beveik dvigubai lėčiau. Nors „Impranil“ (PES-PU) ir putos (PE-PU) yra skirtingos cheminės struktūros, juose yra visiems poliuretanams būdingos uretano, esterinės ir karbamido grupės, todėl manoma, kad pirmuoju atveju nustatyti fermentai, turėtų dalyvauti PE-PU skaidyme (Alvarez-Barragan J. *ir kt.*, 2016).

PE-PU yra atsparesnis mikroorganizmų poveikiui ir biodegradacijos tyrimams reikalingas ilgesnis inkubacijos laikas. **Matsumiya Y. *ir kt.* (2010)**, kaip PE-PU ardantį mikroorganizmą, išskyrė *Alternaria* sp. PURDK2. Ši grybų rūšis kartu su PE-PU gabalėliais buvo kultivuoti agarizuotoje LB (*angl.* Luria-Bertani) terpėje su gliukoze 30 °C temperatūroje. Nustatytas lėtas biodegradavimas – per 10 savaičių suskaidė 28 % PE-PU. Pratęsus auginimo laiką, buvo pastebėtas tolesnis PE-PU skilimas, tai rodo, kad kamienas nuolat naudoja PE-PU kaip energijos šaltinį.

Poliuretano biologinį skaidymą taip pat gali atlikti ir bakterijos bei jų fermentai. Aplinkoje plačiai paplitę *Pseudomonas* sp. rūšys yra žinomos dėl gebėjimo vykdyti poliuretano biodegradaciją. *Pseudomonas* sp. rūšyse randami skirtingi biologiniam skaidymui skirti fermentai, todėl manoma, kad gebėjimas skaidyti poliuretaną atsirado dėl adaptacijos prie aplinkos sąlygų (Howard G.T. 2011). **Howard G.T. ir Blake R.C. (1998)**, nustatė *P. fluorescens* augimą YES (*angl.* Yeast Extract with Supplements) terpėje, kurioje yra PES-PU „Impranil“. Įvykusi substrato hidrolizė pastebėta po 16 val inkubacijos, kai aplink kolonijas susidaro maždaug 1 cm skaidrios „halo“ hidrolizės zonos. Analizuojant *P. fluorescens* PES-PU skaidančius fermentus, nustatytas atsakingas ekstraląstelinis 29 kDa dydžio fermentas, pasižymintis proteaziniu aktyvumu. Ši proteazė ląstelėje ekspresuojama nepriklausomai nuo

substrato, kadangi yra aktyvi tiek *P. fluorescens* auginant LB terpėje, tiek YES terpėje papildytoje „Impranil“ (Howard G.T. ir Blake R.C., 1998). *P. fluorescens* taip pat nustatyta 48 kDa dydžio PUazė, pasižyminti esteraziniu aktyvumu (Vega R.E. ir kt., 1999).

Kita svarbi, PU skaidyme dalyvaujanti, bakterijų rūšis yra *P. aeruginosa*. Iš dirvožemio išskirtas *P. aeruginosa* MZA-85 kamienas geba vykdyti PES-PU hidrolizę, veikiant viduląstelinėms esterazėms. Įvykusi PES-PU biodegradacija buvo nustatyta GPC (angl. Gel Permeation Chromatography) analize: PES-PU polidispersiškumo padidėjimas rodė, kad *P. aeruginosa* MZA-85 suskaidė ilgos grandinės polimerą į trumpesnius subvienetus, taip sumažindamas poliuretano molekulinę masę. Esterazės dalyvavimas PES-PU skaidyme buvo patvirtintas atlikus GC-MS analizę, kurios metu nustatyti esterinių ryšių hidrolizės produktai - 1,4-butandiolis ir adipo rūgštis, kurie nebuvo identifikuoti kontroliniuose mėginiuose (Shan Z. ir kt., 2013).

Ypač stiprus poliuretano biodegradacijos aktyvumas buvo pastebėtas *P. putida* AS90 kamiene, veikiant ekstraląstelinei esterazei. Šis fermentas per pirmąsias dvi dienas 30 °C temperatūroje suskaidė 45 % PES-PU „Impranil“ (Peng Y.H. ir kt., 2014).

Literatūroje ypatingas dėmesys skiriamas *Delftia acidovorans* (anksčiau vadintas *Comamonas acidovorans*) kamienui. **Nakajima-Kambe ir kt (1995)**., tirdami dirvožemio mėginius išskyrė ir identifikavo bakteriją *D. acidovorans*, galinčią augti ir naudoti PES-PU ne tik kaip vienintelį anglies šaltinį, bet ir kaip azoto šaltinį. *D. acidovorans* augdamas MSM (angl. Mineral Salt Medium) terpėje, kurioje vienintelis anglies šaltinis yra poliuretanai, per septynias dienas 30 °C temperatūroje suskaidė 50 mg PES-PU. Tomis pačiomis eksperimentinėmis sąlygomis, tačiau, kai poliuretanai buvo tiekiami kaip anglies ir azoto šaltiniai, skilimas buvo lėtesnis. Tiriant *D. acidovorans* PE-PU biodegradaciją, mikroorganizmų augimas nebuvo nustatytas. **Akutsu Y. ir kt. (1998)**, iš *D. acidovorans* išskyrė PES-PU ardantį fermentą. Kaip minėta, mikroorganizmams būdingos dviejų rūšių esterazės: viena su ląstelės membrana susijusi, o kita ekstraląstelinė, t.y. sekretuojama į augimo terpę. Nustatyta, kad tik membraninė *D. acidovorans* esterazė gali skaidyti PES-PU. Šis fermentas, tai 62 kDa dydžio esterazė, galinti hidrolizuoti PES-PU grandines iki dietilenglikolio ir adipo rūgšties. Tiriant esterazės aktyvumą nustatyta, kad mažėjant PES-PU svoriui, didėjo susidarancio dietilenglikolio kiekis: po 24 val inkubacijos 30 °C temperatūroje, buvo suskaidyta 1,2 mg PES-PU putų ir susidarė 0,5 mg dietilenglikolio. Kai papildomu azoto šaltiniu naudotas amonio nitratas, po augimo buvo nustatytas tik dietilenglikolio susidarymas. Lieka neaišku, ar *D. acidovorans* esterazė hidrolizuoja uretano jungtis, nes nebuvo nustatyti skilimo produktai, rodantys uretano jungties skaidymą.

Grybai efektyviai skaido netirpias medžiagas, o bakterijos labiau linkusios skaidyti tirpius junginius, tokius kaip angliavandeniai (Matsumiya Y. *ir kt.*, 2010). **Fernandes I.P. *ir kt.* (2016)**, tyrė grybo ir bakterijos, kurie žinomi kaip gebantys skaidyti PES-PU, veikimo sinergiją vykdant poliuretano biodegradaciją. *A. niger* ir *P. aeruginosa* konsorciumas pasižymėjo geresniu gebėjimu degraduoti avalynės gamyboje naudojamą PES-PU, nei šiems mikroorganizmams veikiant atskirai. Poliuretano svorio sumažėjimas buvo maždaug du kartus didesnis, palyginus su vieno mikroorganizmo inkubacija. Manoma, kad tarp šių mikroorganizmų veikia sinergetinis, abipusiai naudingas, ryšys. Pirmiausia *A. niger* hifais prieina prie poliuretano paviršiaus ir sekretuoja ekstraląstelinius fermentus, kurie skaido poliuretaną, sudarydami palankias sąlygas *P. aeruginosa* fermentų veiklai degraduojant PES-PU. Kitų dviejų bakterijų *B. subtilis* MZA-75 ir *P. aeruginosa* MZA-85 konsorciumas taip pat pasižymėjo didesniu PES-PU skaidymo efektyvumu, nei šiems mikroorganizmams veikiant atskirai (Shah Z. *ir kt.*, 2016). Taigi, tai yra nauja sritis, apimanti kartu augančių mikroorganizmų tarpusavio sąveikos tyrimus.

Dar viena tyrimų sritis yra susijusi su alternatyvių poliuretanų biodegradacija, pvz, NIPU ar kai PU sintezei naudojami biopolioliai. Didėjant PU įvairovei svarbu ištirti ir įvertinti jų biologinį skaidumą. Grybas *Chaetomium globosum* yra žinomas dėl poliuretano, pagaminto ricinos aliejaus ir PEG pagrindu, biologinio skaidymo. Sintezės metu ricinos aliejus buvo naudojamas minkštajame polimero segmente, o PEG, dėl aukšto hidrofiliškumo, buvo naudojamas kaip grandinės ilgintojas. *C. globosum* biologinis skaidymas vykdytas 28 °C temperatūroje 130 dienų. Remiantis SEM (*angl.* Scanning Electron Microscopy) analize, buvo identifikuoti poliuretano paviršiaus plėvelių morfologiniai pokyčiai, dėl ko suprastėja poliuretano plėvelių mechaninės savybės (Oprea S., 2010). **Bialkowska A. *ir kt.* (2019)**, atliko NIPU, kurio sudėtyje yra 2-hidroksinaftalen-6-sulfonrūgšties, biodegradacijos tyrimą, naudojant *Achromobacter xylosoxidans* G21 išskirtą iš nafta užteršto dirvožemio. Biologinio skaidymo procesas vykdytas MSM terpėje, kaip vienintelį anglies šaltinį naudojant NIPU plėvelę, esant 160 aps/min, 30 °C temperatūroje ir 21 dieną. Remiantis DSC (*angl.* Differential Scanning Calorimetry) ir FT-IR analizėmis, nustatyta, kad karbamido, uretano ir sulfoninės grupės, esančios kietajame segmente buvo biologiškai skaidomos, o didėjantis poliuretano grandinių kryžminio sujungimo laipsnis lėmė padidėjusį atsparumą bakterijų vykdomai biodegradacijai.

1.4.4. Biodegradacija *in vitro*

Fermentai, naudojami skilimo tyrimuose *in vitro*, yra komerciniai arba identifikuoti poliuretaną skaidančiuose mikroorganizmuose, kurių koduojami genai klonuoti į genų raiškos sistemas (Magnin A. *ir kt.*, 2019).

Pilch-Pitera B. (2013) tyrė poliuretano dangų atsparumą fermentiniam skaidymui naudojant komercines lipazes. PES-PU mėginiai buvo panardinti į skirtingų komercinių lipazių – „Novozym 735“, „Novozym 51032“, „Palatase 20000“, „Lipolase 100 L“ - tirpalus. Po fermentinio poveikio 42 dienas 37 °C temperatūroje, didžiausias PES-PU mėginio svorio pokytis nustatytas naudojant „Lipolase 100 L“ fermentą - svoris sumažėjo 3,7 %.

Naudojant proteolitinius fermentus ir kasos lipazę, atliktas mažai kristalinės ir stipriai kristalinės struktūros poliuretanų hidrolizinio skaidymo tyrimas. Eksperimentai atlikti maišant orbitaline maišykle 200 aps/min greičiu, esant 37 °C temperatūrai 10 dienų. Esterazinio aktyvumo kasos lipazė efektyviai depolimerizavo mažai kristalinį PU, nustatytas svorio pokytis buvo 63 %. Proteolitiniai fermentai papainas ir α -chimotripsinas, priešingai, pasižymėjo didesniu gebėjimu skaidyti stipriai kristalinės struktūros poliuretaną, nustatyti svorio pokyčiai buvo 30 % ir 35 %, atitinkamai. Tyrimo metu pastebėtas didesnis molekulinės masės sumažėjimas per pirmąjį inkubacijos periodą, t.y. per pirmąsias keturias dienas, vėliau skaidymas vyksta mažesniu greičiu (Ferri C. *ir kt.*, 2010).

Poliuretano biodegradacija fermentų tirpalais nėra pakankamai išanalizuota, kad būtų galima taikyti perdirbimo procesuose. Norint pasiekti didesnę biologinio skaidymo *in vitro* reakcijų efektyvumą, poliuretano biodegradacijai tirti buvo naudoti fermentų kokteilio tirpalai. **Ozsagioglu E. ir kt. (2012)**, tirdami poliuretano hidrolizę naudojo kiaulių kepenų esterazės („Sigma Aldrich“) ir proteazės DSM („Cognis“) fermentų kokteilį. Tačiau nustatyta, kad PES-PU biodegradacijoje fermentai konkuruoja tarpusavyje ir vienas fermentas slopina kito fermento aktyvumą. **Magnin A. ir kt. (2019)**, atliko esterazės E3576 ir amidazės E4143 fermentų kokteilio tyrimą. Priešingai nei pirmuoju, šiuo atveju skaidant PES-PU, tarp naudotų fermentų buvo pastebėtas sinergetinis ryšys. Nustatyta, kad veikiant esterazei vyksta minkštajame segmente esančių esterinių grupių hidrolizė, dėl ko išsiskiria mažos molekulinės masės molekulės, turinčios uretano ryšius, kurios vėliau hidrolizuojamos amidaze. Po depolimerizacijos, kaip hidrolizės produktai, gauti 6-hidroksikaprurūgštis ir 4,4'-metileno dianilinas. Skirtingais fermentų kokteilių tirpalais kontroliuojamos biodegradacijos metu užtikrinamas tvarus poliuretano perdirbimas, siekiant gauti tarpinius produktus, kurie galėtų būti pritaikomi skaidomų polimerų sintezėje, pvz., gaunamų poliadicijos būdu.

1.4.5. PUazių tyrimai

Poliuretano biodegradaciją vykdančioms bakterijų rūšims *P. chlororaphis*, *D. acidovorans* TB-35, *P. fluorescens* buvo atlikti genetiniai ir biocheminiai tyrimai, kurių metu poliuretaną skaidančių fermentų genai buvo klonuoti į genų raiškos sistemas. Iš šių aplinkos mikroorganizmų apibūdinti keturi PUazių genai: *pueA*, *pueB*, *pudA* ir *pula*.

Už poliuretano skaidymą atsakingi *P. chlororaphis* fermentai PueA ir PueB, kurie išsiskiriami į ekstraląstelinę terpę. Šiuos fermentus koduojantys genai *pueA* ir *pueB* buvo klonuoti į *E. coli*. *PueA* nustatytas atviro skaitymo rėmelis (ORF), koduojantis 65 kDa baltymą, kuriame yra 617 a.r., o *pueB* - ORF, koduojantis 60 kDa baltymą iš 565 a.r. liekanų. Abiems fermentams būdingas serino hidrolazės sekos motyvas G-X-S-X-G. Palyginus šių dviejų genų aminorūgščių ir nukleotidų sekas, nustatyta, kad jų panašumas yra atitinkamai 42 % ir 59 %. Skirtumas tarp šių genų tas, kad *pueB* sekoje yra numanomas N-galo signalinis peptidas. Abu genai buvo ekspresuojami *E. coli* raiškos sistemoje, tačiau fermentas PueA yra sekretuojamas ir matoma praskaidrėjimo „halo“ zona poliuretano agarą lėkštelėje, o PueB nėra sekretuojamas ir praskaidrėjimo zona nesusidaro. Rekombinantinio PueB ekspresija nebuvo pastebėta iki 6–10 dienų inkubacijos, o didžioji dalis baltymo lokalizuota *E. coli* ląstelių citoplazmoje. Abu fermentai yra pasižymi esteraziniu aktyvumu p-nitrofenilacetato substrato atžvilgiu (Stern R.V. *ir kt.*, 2000; Howard G.T. *ir kt.*, 2001).

Kaip minėta, *D. acidovorans* TB-35, skaidydama poliuretaną išskiria dviejų rūšių esterazes - viduląstelinę ir ekstraląstelinę - tačiau tik membraninė esterazė gali skaidyti PES-PU (Akutsu Y. *ir kt.*, 1998). Genas *pudA*, kuris koduoja PU-esterazę, taip pat buvo klonuotas į *E. coli*. *PudA* nustatytas ORF, koduojantis 62 kDa baltymą, kuriame yra 548 a.r. liekanos. *PudA* būdingas serino hidrolazių motyvas Gly-X-Ser-X-Gly. Optimalus šio fermento veikimo pH yra 6,5, o optimali veikimo temperatūra 45 °C. Vykstant *pudA* geno raiškai *E. coli* sistemoje, rekombinantinis baltymas gali skaidyti kietą PES-PU (Nomura N. *ir kt.*, 1998).

P. fluorescens ekstraląstelinę esterazę *PulA* koduojantis genas klonuotas į *E. coli*. Geno *pulA* nukleotidų seka charakterizavo ORF, koduojantį 48 kDa baltymą, sudarytą iš 451 a.r. liekanų. Identiškumo paieška duomenų bazėje, naudojant BLAST įrankį, atskleidė šio ORF panašumą į lipazės genus, todėl sekvenuotas genas vadinamas *pulA* (poliuretanazės-lipazė A). Kaip *P. chlororaphis* ir *D. acidovorans*, *pulA* geno sekoje nustatytas serino hidrolazės sekos motyvas G-X-S-X-G (Ruiz C. ir Howard G.T., 1999; Vega R.E. *ir kt.*, 1999).

Kompostavimo, kuris taip pat yra biodegradacijos pavyzdys, procese svarbų vaidmenį vaidina mikroorganizmų išskiriami fermentai: fosfatazės, celiulazės, proteazės, lipazės, arilsulfatazės ir hemiceliulazės, todėl **Kang Ch.H. *ir kt.* (2011)**, iš komposto sudarytos metagenominės bibliotekos atliktos analizės išskyrė *estCS2* geną ir klonavo į *E. coli*. Geno sekos analize nustatyta, kad *estCS2* koduoja 530 a.r. baltymą, kurio molekulinė masė yra 63 kDa. *EstCS2* aminorūgščių sekos analize buvo identifikuotas G-X-S-X-G motyvas. *EstCS2* aminorūgščių seka pasižymi 52 % panašumu į PU-esterazę iš *D. acidovorans*. Todėl patikrinus rekombinantinio fermento *estCS2* gebėjimą hidrolizuoti poliuretaną, nustatyta, kad transformuotos *E. coli* kolonija suformavo skaidrią zoną terpėje, papildytoje

polidietilenglikolio adipatu, kuris yra vienas iš PES-PU komponentų. EstCS2 fermento optimalus veikimas yra kai pH 9,0, o temperatūra 55 °C. Manoma, kad EstCS2 fermentas turi galimybę hidrolizuoti PES-PU, tačiau reikia atlikti tolesnius fermentinius poliuretano skaidymo tyrimus.

Poliuretano biodegradacija yra sąlyginai nauja tyrimų sritis, kuri yra perspektyvi tiek ekologiniu, tiek ekonominiu požiūriu. Tyrimai gali būti orientuoti į poliuretano sintezę alternatyviais būdais, t.y. naudojant augalinės kilmės poliolių arba gaminant neizocianitinius poliuretanus, taip sumažinant neigiamą PU atliekų poveikį aplinkai. Taip pat yra svarbi poliuretano biodegraduojančių mikroorganizmų paieška ir jų fermentų, atsakingų už PU skaidymą, tyrimai. Siekiant palengvinti poliuretano biologinį skaidymą, į poliuretano struktūrą, sintezės metu, gali būti įterpiamos mikroorganizmų ir jų fermentų skaidymui jautrios jungtys. Taigi, šie tyrimai ir jų rezultatai yra tikslingas kelias poliuretano atliekų keliamai taršai mažinti, bei siekiant sukurti naujus PU atliekų perdirbimo būdus.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Prietaisai ir priemonės

2.1.1. Prietaisai

- Analitinės svarstyklės „Kern ABJ“;
- Baltymų koncentravimo mėgintuvėliai „Amicon® Ultra 30K“;
- Centrifugos „MIKRO 220R“ (rotorius r = 98 mm), „PRISM R“ (rotorius r = 84 mm), „Eppendorf 5424“ (rotorius r = 84 mm);
- Dujų chromatografas „Shimadzu GC-2010“;
- Horizontali elektroforezės kamera „BioRad“ ir srovės šaltinis „Источник питания постоянного тока Б5-50“;
- Inkubatorius „BINDER“;
- Laminarinė traukos spinta „Flow FAST H“;
- Magnetinė maišyklė „Fisherbrand“ ir „Biosan MMS-3000“;
- Maišyklė „IKA MS3 basic“ ir „Vortex-Genie 2“;
- Mikrobangų krosnelė „Daewoo“ ir „Scarlett“;
- pH matuoklis „Mettler Toledo“;
- Purtyklė „Heidolph Vibramax 100“;
- Spektrofotometrai „Analytik Jena SPEKOL2000“ ir „Nanodrop 2000“;
- Svarstyklės „Kern EG“;
- Termocikleris „BIO RAD iCycler“;
- Termostatuojami kratytuvai „Biosan“, „IKA KS 4000i“, „Stuart SI600“;
- Termostatuojamos vandens vonelės „Julabo TW8“ ir „Thermo Haake P5“;
- Transiliuminatorius „Ultra-Lum“;
- Traukos spinta „SCALA 1200“;
- Vandens dejonizatorius „Crystal“;
- Vertikalios elektroforezės aparatas ir įtampos šaltinis „Biometra P25 T“.

2.2. Medžiagos ir tirpalai

2.2.1. Darbo objektas

Tyrimams atlikti naudojama vandeninė poliuretano dispersinė fazė (PDF). Tai balta, pieno konsistencijos suspensija, kurioje yra 35–40 % polimero. Tyrimų metu naudojama:

- Aromatinio polieterinio poliuretano dispersinė fazė (PE-PU);
- Alifatinio poliesterinio poliuretano dispersinė fazė (PES-PU).

2.2.2. Mikroorganizmai, bakterijų kamienai ir plazmidės

PU degraduojančių mikroorganizmų paieškos šaltiniai:

- Paviršinis dirvožemis („Dirvožemis I“ ir „Dirvožemis II“);
- Kuršių marių ir Baltijos jūros vandens mėginių mišinys („Jūra“);
- PU putos iš teatro lėlių („79PU“);
- PU putos iš automobilio sėdynių („88PU“).

PU biodegradacijos tyrimuose naudoti mikroorganizmai:

- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Pseudomonas putida*;
- *Yarrowia lipolytica*.

Bakterijų transformacijos procesuose naudoti kamienai:

- *Escherichia coli* DH5 α ;
- *Escherichia coli* BL21(DE3).

Tikslinio geno klonavimui ir raiškai naudoti plazmidiniai vektoriai:

- pLATE11 plazmidė („*Thermo Fisher Scientific*“);
- pET28-MBP-TEV plazmidė („*Addgene*“) gauta iš BTI EGIS.

2.2.3. Reagentai

2.1 lentelė. Naudotos medžiagos ir jų gamintojas

Gamintojas	Naudotos medžiagos
„Acros Organics“	Acto rūgštis 99,5 %, agaras, amonio sulfatas, etilkarbamatas, fosforo rūgštis, LB terpė, natrio hipochloritas, natrio nitrofericianido dihidratas, kalio acetatas, sieros rūgštis, 1,4-butandiolis;
„Avsista“	Druskos rūgštis 33,5 %;
„BioRad laboratories, Inc.“	Akrilamidas, bis-akrilamidas, bromfenolio mėlynasis;
„Ducheta Biochemie“	ETDA;
„J. T. Baker“	Fenolis;
„Mallinckrodt“	Geležies sulfato heptahidratas;
„Merck & Co., Inc.“	Agarozė, chloroformas, magnio chlorido heksahidratas, mielių ekstraktas, natrio acetatas, Tris, vario sulfato pentahidratas;
„Reachim“	Bromkrezolio žaliasis, cinko sulfato heptahidratas, fenoltaleinas, gintaro rūgštis, glicerolis, mangano chlorido heptahidratas, magnio sulfato heptahidratas, mangano chlorido heptahidratas, monokalio fosfatas, natrio sukcinatas;
„Riedel-de Haën“	Izopropanolis;
„Roth“	2-merkaptoetanolis, amonio persulfatas, Coomassie Brilliant Blue R-250, Coomassie Brilliant Blue G-250, dikalio fosfatas, etidžio bromidas, kalcio chloridas, TEMED, natrio chloridas, natrio hidroksidas, NDS, peptonas;
„Sigma-Aldrich“	Adipo rūgštis, dietilenglikolis, ftalio rūgšties anhidridas, glicinas, PMSF, gliukozė, metanolis, PEG-8000, Rodaminas B, tributirinas;
„Serva“	Etilenglikolis;
„Thermo Fisher Scientific“	6 \times elektroforetinis DNR dažas, ampicilinas, DNR fragmentų dydžių standartas „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“, Jaučio serumo albumino standartas, „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“;
„Vilniaus degtinė“	Etanolis 96 %;

2.2.4. Terpės ir mikroorganizmų auginimo sąlygos

Mitybinės terpės:

- *LB skysta*: pasveriami 25 g komercinės LB terpės ir tirpinama 1 l dH₂O.
- *LB agarizuota*: pasveriami 25 g komercinės LB terpės ir 15 g agarų, tirpinama 1 l dH₂O.
- *YEPD skysta*: pasveriami 20 g peptono, 20 g gliukozės ir 10 g mielių ekstrakto, tirpinama 1 l dH₂O.
- *YEPD agarizuota*: pasveriami 20 g peptono, 20 g gliukozės, 10 g mielių ekstrakto ir 15 g agarų, tirpinama 1 l dH₂O.

Paruoštos LB terpės autoklavuojamos 1/20` režimu (20 min 121 °C temperatūroje), o YEPD terpės 0,8/30` režimu (30 min 80 °C temperatūroje).

Priedai, tokie kaip antibiotikai, IPTG ar kiti komponentai, neautoklavojami. Jei įmanoma jie yra filtruojami per sterilius filtrus, dedami į išlydytą ir atvėsintą terpę. Agarizuotos terpės išpilstomos į Petri lėkšteles, kurios laikomos 4 °C temperatūroje.

Selektyvios mitybinės terpės PU biodegradacijai:

- *1,5 % agaras*: pasveriami 15 g agarų ir tirpinama 1 l dH₂O.
- *MSM ir MSM+N**:

2.2 lentelė. MSM ir MSM+N terpių sudėtis

Druska	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ ×7H ₂ O	FeSO ₄ ×7H ₂ O	ZnSO ₄ ×7H ₂ O	CuSO ₄ ×5H ₂ O	MnCl ₂ ×4H ₂ O	(NH ₄) ₂ SO ₄ *
Konc.	7 g/l	2 g/l	0,1 g/l	0,01 g/l	0,001 g/l	0,0001 g/l	0,0015 g/l	1 g/l

*(NH₄)₂SO₄ naudojamas tik MSM+N terpėje

MSM ir MSM+N terpėse papildomais anglies šaltiniais naudojami:

- 1 % glicerolis – žymima MSM+Glic. / MSM+N+Glic.;
- 20 mM gliukozė – žymima MSM+Gliuk. / MSM+N+Gliuk.;
- 20 mM sukcinatas – žymima MSM+Sukc. / MSM+N+Sukc.;
- 20 mM natrio citratas – žymima MSM+Citr. / MSM+N+Citr.

Agarų, atskirai paruoštų druskų tirpalai ir papildomi anglies šaltiniai autoklavuojami režimu 1/20`. Po autoklavavimo į išlydytą ir atvėsintą 1,5 % agarų tirpalą pridedami druskų tirpalai iki reikiamos galutinės koncentracijos (žr. 2.2 lentelė). (NH₄)₂SO₄ dedamas tik į MSM+N terpę. Agaras su druskomis išmaišomas ir į beveik stingstančią terpę pridedama 0,3 % PDF tirpalo, kuris mikroorganizmams pateikiamas kaip anglies ir azoto šaltinis. Paruoštos agarizuotos MSM ir MSM+N terpės su PDF lengvai išmaišomos ir išpilstomos į Petri lėkšteles, kurios laikomos 4 °C temperatūroje.

Mikroorganizmų auginimo sąlygos:

PU biodegrauojančių mikroorganizmų paieškai, kultūros auginamos ant agarizuotų selektyvių mitybinių terpių su PDF kambario temperatūroje ne mažiau 14 d.

Mikroorganizmai, išskirti kaip biodegruojantys PU, gryninami ir ruošiami identifikavimui auginant juos ant agarizuotų LB ir YEPD terpių 30 °C temperatūroje.

E. coli DH5α ir *E. coli* BL21(DE3) ląstelės auginamos LB terpėje 37 °C temperatūroje, skystoje LB terpėje - purtant 200–220 aps/min greičiu 37 °C temperatūroje. Ampicilinui atsparūs klonai auginami terpėje, kurioje galutinė antibiotiko koncentracija 100 µg/ml, o klonai atsparūs kanamicinui - 50 µg/ml.

2.2.5. Pradmenys

2.3 lentelė. Pradmenys, jų sekos ir prilydymo temperatūra

Pavadinimas	Seka	Prilydymo temperatūra*
P498	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';	Tm=61,9 °C
P499	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3';	Tm=53,6 °C
P27F	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3';	Tm=53,7 °C
P1492R	5'-ACGCGTCGACGCTGGTGCTTACTTGAAC-3';	Tm=69,7 °C
P564	5'-AGAAGGAGATATAACTATGACAACCTGATTTACATTTAAAATC-3';	Tm=59,7 °C
P565	5'-GGAGATGGGAAGTCATTAGATATTAGCAAAAATATTTGGTTTTC-3';	Tm=63,3 °C
P615	5'-TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCC-3';	Tm=65,5 °C
P616	5'-TCCTTGGAAGTATAGATTTTACCCTTGG-3';	Tm=62,8 °C

*prilydimo temperatūra naudojant *Taq* DNR polimerazę

2.2.6. Fermentai

- DreamTaq Green PCR Master Mix (2×) („*Thermo Fisher Scientific*“);
- Šarminė fosfatazė (FastAP) („*Thermo Fisher Scientific*“);
- Egzonukleazė I (ExoI) („*Thermo Fisher Scientific*“);
- Ribonukleazė A (RNaseA) („*Thermo Fisher Scientific*“);
- Restrikcijos endonukleazės *Bam*HI, *Bgl*III, *Mlu*I, *Nco*I, *Pvu*I, *Xho*I ir jų buferiniai tirpalai („*Thermo Fisher Scientific*“);
- Poliuretano degradacijos tyrimuose naudojami skirtingų aktyvumų komerciniai fermentai:

2.4 lentelė. Komerciniai fermentai, jų fermentiniai aktyvumai ir gamintojai

Fermentas	Aktyvumas	Gamintojas
Cathepsin C	proteazinis	„ <i>Boehringer Mannheim GmbH</i> “
Celluclean 5000 L	celiulazinis	„ <i>Novozymes</i> “
Laccase Plus Vilzim	lakazinis	„ <i>Biorro</i> “
Laccase Vilzim	lakazinis	„ <i>Biorro</i> “
Lipase LPS L	lipazinis	„ <i>Biorro</i> “
Lipolase 100 L	lipazinis	„ <i>Novozymes</i> “
Novozym 51003	lakazinis	„ <i>Novozymes</i> “
Novozyme 435	lipazinis	„ <i>Novozymes</i> “
Peroxidase	peroksidazinis	„ <i>Roanal</i> “
Promozyme D2	α-glukanazinis	„ <i>Novozymes</i> “
Protease	proteazinis	„ <i>Biorro</i> “
Proteinase K	proteazinis	„ <i>Carl Roth</i> “

2.2.7. Rinkiniai

Rinkinys „Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit“ („Zymo Research“) genominės DNR išskyrimui.

2.2.8. Terpių su PU dažymo tirpalai

0,1 % Coomassie dažas: pasveriamas 0,5 g „Coomassie Blue R250“ dažo ir tirpinamas 200 ml metanolio, 50 ml acto rūgšties ir 250 ml dH₂O mišinyje.

Plovimo tirpalas: 200 ml metanolio, 50 ml acto rūgšties ir 250 ml dH₂O mišinys.

2.2.9. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje tirpalai

10×TAE buferinis tirpalas: pasveriamas 48,4 g Tris, įpilama 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ir 11,42 ml 99,5 % acto rūgšties. Visa tirpinama 150 ml dH₂O ir vėliau tirpalas skiedžiamas iki 200 ml žymos. Pagaminto buferinio tirpalo pH turi būti 8,0. Prieš naudojimą tirpalas praskiedžiamas 10 kartų (1×TAE).

1 % agarozės gelis: pasveriamas 1 g agarozės ir tirpinamas 1×TAE buferiniame tirpale iki 100 ml tūrio. Mišinys kaitinamas mikrobangų krosnelėje, pravėsus įpilama 5 µl 1 mg/ml EtBr tirpalo.

1 mg/ml EtBr tirpalas: pasveriamas 0,01 g etidžio bromido ir tirpinamas dH₂O iki 10 ml tūrio. Saugoma nuo tiesioginės šviesos. Dažant DNR, tirpalas skiedžiamas 1:999.

2.2.10. TLC tirpalai

0,1 M NaOH tirpalas: pasveriamas 0,399 g NaOH ir tirpinamas H₂O iki 100 ml tūrio.

Bromkrezolio žaliojo dažas: pasveriamas 0,04 g dažo ir tirpinamas 100 ml 96 % etanolyje. Įlašinama 0,1 M NaOH tirpalo, kol tirpalas iš bespalvio tampa mėlynos spalvos. Paruoštas dažas sandariai uždaromas ir laikomas tamsoje saugant nuo šviesos.

2.2.11. GC tirpalai

50 mM adipo rūgštis: pasveriamas 0,731 g adipo rūgšties ir tirpinamas dH₂O iki 100 ml tūrio.

10 mM 1,4-butandiolis: įpilama 0,044 ml 1,4-butandiolio ir skiedžiama dH₂O iki 50 ml tūrio.

100 mM dietilenglikolis: įpilama 0,237 ml dietilenglikolio ir skiedžiama dH₂O iki 25 ml tūrio.

10 mM etilenglikolis: įpilama 0,028 ml etilenglikolio ir skiedžiama dH₂O iki 50 ml tūrio.

10 mM ftalio rūgšties anhidridas: pasveriamas 0,1481 g ftalio rūgšties anhidrido ir tirpinamas dH₂O iki 100 ml tūrio.

10 mM gintaro rūgštis: pasveriamas 0,118 g gintaro rūgšties ir tirpinamas dH₂O iki 100 ml tūrio.

10 mM glutaro rūgštis: pasveriamas 0,132 g glutaro rūgšties ir tirpinamas dH₂O iki 100 ml tūrio.

2.2.12. Kompetentinių *E.coli* ląstelių paruošimo transformacijai tirpalai

NaCl tirpalas: paruošiamas mišinys, kuriame galutinė komponentų koncentracija yra 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl (pH 8,0) ir 100 mM NaCl. Tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje.

CaCl₂ tirpalas: paruošiamas mišinys, kuriame galutinė komponentų koncentracija yra 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl (pH 8,0) ir 100 mM CaCl₂. Tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje.

2.2.13. pDNR išskyrimo ir valymo tirpalai

GTE buferinis tirpalas: paruošiamas mišinys, kuriame galutinė komponentų koncentracija yra 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl ir 50 mM gliukozės.

Lizės tirpalas: paruošiamas 100 µl 10 % NDS, 200 µl 1 M NaOH ir 700 µl dH₂O mišinys.

5 M kalio acetato tirpalas (pH 4,8): pasveriamas 490,75 g kalio acetato ir tirpinama 700 ml dH₂O. Tirpalo pH acto rūgštimi privedamas iki 4,8 ir skiedžiama dH₂O iki 1 l žymos.

70 % etanolio tirpalas: pamatuojama 73 ml 96 % etanolio ir skiedžiama dH₂O iki 100 ml.

30 % PEG8000/MgCl₂ tirpalas: pasveriamas 30 g PEG8000 ir 0,286 g MgCl₂, tirpinama dH₂O iki 100 ml tūrio.

2.2.14. Baltymų koncentracijos nustatymo Bradford metodu tirpalai

Bradford reagentas: pasveriamas 50 mg „Coomassie Brilliant Blue G-250“ dažo ir tirpinama 25 ml 96 % etanolyje. Tirpinama nuo šviesos uždengus aliuminio folija ir maišoma magnetine maišykle kambario temperatūroje apie 24 val. Po maišymo įpilama 67 ml 70 % H₃PO₄ ir skiedžiama dH₂O iki 500 ml žymos. Paruoštas tirpalas filtruojamas vakuumu per stiklinį filtrą ir laikomas 4 °C temperatūroje tamsiame inde saugant nuo šviesos.

0,15 M NaCl tirpalas: pasveriamas 0,877 g NaCl ir tirpinama dH₂O iki 100 ml tūrio.

0,5 mg/ml JSA standartas: komercinis 2 mg/ml JSA standartinis tirpalas skiedžiamas dH₂O santykiu 1:3.

2.2.15. Baltymų elektroforezės tirpalai

70 % etanolio tirpalas: pamatuojama 73 ml 96 % etanolio ir skiedžiama dH₂O iki 100 ml.

30 % AA ir 0,8 % BAA tirpalas: pasveriamas 30,0 g akrilamido ir tirpinama ~80 ml dH₂O. Tuomet pridedama 0,8 g bis-akrilamido. Mišinys skiedžiamas dH₂O iki 100 ml žymos ir filtruojamas. Paruoštas tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje, saugant nuo šviesos tamsiame inde.

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) tirpalas: pasveriamas 18,15 g Tris ir tirpinama ~80 ml dH₂O. Naudojant HCl tirpalą, privedama reikiama pH vertė - 8,8. Tirpalas skiedžiamas su dH₂O iki 100 ml žymos. Paruoštas tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje, saugant nuo šviesos tamsiame inde.

1,0 M Tris-HCl (pH 6,8) tirpalas: pasveriamas 12,10 g Tris ir tirpinamas ~50 ml dH₂O. Naudojant HCl tirpalą, privedama reikiama pH vertė - 6,8. Tirpalas skiedžiamas dH₂O iki 100 ml žymos. Paruoštas tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje, saugant nuo šviesos tamsiame inde.

10 % NDS tirpalas: pasveriamas 5 g NDS ir tirpinamas dH₂O iki 50 ml tūrio. Paruoštas tirpalas laikomas kambario temperatūroje.

10 % APS tirpalas: pasveriamas 1,0 g APS ir tirpinamas dH₂O iki 10 ml tūrio. Paruoštas tirpalas išpilstomas į ependorfinius mėgintuvėlius po 1 ml ir laikomas -20 °C temperatūroje.

10 × baltymų elektroforezės buferinis tirpalas: atskirai ruošiami NDS, glicino ir Tris tirpalai:

- pasveriamas 5 g NDS ir ištirpinamas 20 ml dH₂O;
- pasveriamas 72 g glicino ir kaitinant ištirpinamas 380 ml dH₂O;
- pasveriamas 15 g Tris ir ištirpinamas 50 ml dH₂O;

Tirpalai sumaišomi tarpusavyje ir skiedžiama dH₂O iki 500 ml žymos. Paruošto tirpalo pH turi būti tarp 8,3 ir 8,6.

2 × elektroforetinis dažas: paruošiamas mišinys, kurio galutinė koncentracija yra 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25 % glicerolio, 2 % NDS ir 0,01 % bromfenolio mėlynojo dažo. Paruoštas dažas laikomas kambario temperatūroje. Atliekant baltymų elektroforezę denatūruojančiomis sąlygomis, papildomai į dažą pridedama 5 % β-merkaptoetanolio.

„Coomassie Blue R-250“ dažas: pasveriamas 1,24 g „Coomassie Brilliant Blue R-250“ ir tirpinamas 226 ml 96 % etanolyje. Vėliau įpilama 46 ml 99,5 % acto rūgšties ir skiedžiama dH₂O iki 500 ml žymos. Tirpalas filtruojamas vakuumu per stiklinį filtrą. Paruoštas tirpalas saugomas nuo šviesos tamsiame inde ir laikomas kambario temperatūroje.

2.2.16. Uretanazinio aktyvumo nustatymo Berthelot reakcija tirpalai

3 % etilkarbamato tirpalas: pasveriamas 3 g etilkarbamato ir tirpinamas dH₂O iki 100 ml tūrio.

0,5 M sieros rūgšties tirpalas: 2,68 ml sieros rūgšties pilama į 80 ml dH₂O, stipriai išmaišoma ir skiedžiama dH₂O iki 100 ml.

Berthelot reagentas I: pasveriamas 6 g fenolio, 0,25 g nitroferocianido dihidrato ir tirpinamas dH₂O iki 100 ml. Paruoštas tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje.

Berthelot reagentas II: pasveriamas 5,25 natrio šarmo, ištirpinamas 70 ml H₂O, įpilama 3 ml natrio hipochlorito ir skiedžiama iki 100 ml. Paruoštas tirpalas laikomas 4 °C temperatūroje.

0,1 M amonio sulfato tirpalas: pasveriamas 1,32 g amonio sulfato ir tirpinamas dH₂O iki 100 ml tūrio.

2.2.17. Kiti tirpalai

0,9 % NaCl tirpalas: pasveriamas 0,9 g NaCl ir tirpinamas dH₂O iki 100 ml tūrio.

10 mM kalio fosfatinis buferis (pH 7): pasveriami 0,234 g K_2HPO_4 ir 0,158 g KH_2PO_4 , tirpinama 200 ml dH_2O , pH pridedamas iki 7. Paruoštas tirpalas skiedžiama dH_2O iki 250 ml.

100 mM kalio fosfatinis buferis (pH 7): pasveriami 2,336 g K_2HPO_4 ir 1,577 g KH_2PO_4 , tirpinama 200 ml dH_2O , pH pridedamas iki 7. Paruoštas tirpalas skiedžiama dH_2O iki 250 ml.

100 mM IPTG tirpalas: pasveriami 0,238 g IPTG ir tirpinama dH_2O iki 10 ml tūrio. Išpilstoma į sterilius ependorfinius mėgintuvėlius ir laikoma $-20\text{ }^{\circ}C$ temperatūroje.

100 mM PMSF: pasveriami 0,1742 g PMSF ir tirpinama izopropanolyje iki 10 ml tūrio. Išpilstoma į sterilius ependorfinius mėgintuvėlius ir laikoma $-20\text{ }^{\circ}C$ temperatūroje.

100 mg/ml ampicilino tirpalas: pasveriami 10 g ampicilino ir tirpinama dH_2O iki 100 ml tūrio. Išpilstoma į sterilius ependorfinius mėgintuvėlius ir laikoma $-20\text{ }^{\circ}C$ temperatūroje.

50 mg/ml kanamicino tirpalas: pasveriami 5 g kanamicino ir tirpinama dH_2O iki 100 ml tūrio. Išpilstoma į sterilius ependorfinius mėgintuvėlius ir laikoma $-20\text{ }^{\circ}C$ temperatūroje.

2.3. Metodai

2.3.1. PU skaidančių mikroorganizmų paieška ant selektyvių mitybinių terpių

Atliekant PU degraduojančių mikroorganizmų paiešką naudojami skirtingi jų šaltiniai (2.2.2).

Šie mikroorganizmų šaltiniai paruošiami ir laikomi kambario temperatūroje:

- „*Dirvožemis I*“: vienodomis dalimis sumaišomas dirvožemis, 0,9 % NaCl tirpalas ir PU milteliai. Inkubuojama apie 18 mėn.
- „*Dirvožemis II*“: į 20 ml skystos LB terpės pridedama 200 μ l PE-PU tirpalo ir užsėjama 100 μ l „*Dirvožemis I*“ mėginio. Inkubuojama apie 12 mėn.
- „*Jūra*“: į 20 ml skystos LB terpės pridedama 200 μ l PE-PU tirpalo ir užsėjama 100 μ l Kuršių marių ir Baltijos jūros vandens mišinio. Inkubuojama apie 12 mėn.
- „*79PU*“: 0,1 g senų teatro lėlių PU putų užpilamos 1 ml steriliaus 0,9 % NaCl tirpalo ir vorteksuojama. Kiekvieną kartą mėginys ruošiamas naujai.
- „*88PU*“: 0,1 g senų automobilio sėdynių PU putų užpilamos 1 ml steriliaus 0,9 % NaCl tirpalo ir vorteksuojama. Kiekvieną kartą mėginys ruošiamas naujai.

Ant agarizuotų MSM ir MSM+N terpių su PDF, užsėjama po 50 μ l paruošto mėginio. Lėkštelės inkubuojamos ne mažiau kaip 14 d. kambario temperatūroje. Stebimas mikroorganizmų augimas ir gebėjimas skaidyti PDF, susidarant skaidrioms „halo“ zonoms aplink kolonijas.

Užaugusios pavienės kolonijos persėjamos ant agarizuotų LB ir YEPD mitybinių terpių ir gryninamos iki homogeniškų kultūrų. Grynios kultūros dar kartą patikrinamos ar geba augti ant terpės su poliuretanu. Šiuo tikslu mikroorganizmai užsėjami ant MSM ir MSM+N agarizuotų terpių su PDF ir inkubuojama ne mažiau kaip 14 d. kambario temperatūroje.

2.3.2. Terpių su PU dažymas

Agarizuotose terpėse su poliuretanu užaugę mikroorganizmai prieš dažymą Coomassie tirpalu persėjami ant agarizuotų LB ar YEPD terpių (2.2.4). Tuomet ant terpių Petri lėkštelėse užpilama 20 ml 0,1 % Coomassie dažo tirpalo (2.2.8) ir inkubuojama 25 min. Po 25 min dažas nupilamas, lėkštelės užpilamos 20 ml plovimo tirpalo (2.2.8) ir laikoma 25 min. Po plovimo etapo aplink kolonijas turi būti matomos skaidrios hidrolizės zonos mėlynos spalvos fone.

2.3.3. Genominės DNR išskyrimas

Mikroorganizmų gDNR išskirimui naudojamas „Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit“ rinkinys (2.2.7). Procedūros atliekamos pagal gamintojo protokolą.

2.3.4. DNR elektroforezė agaroziniame gelyje

DNR elektroforezei naudojama horizontali elektroforezės vonelė, užpildyta 1×TAE buferiniu tirpalu (2.2.9). Pradžioje paruošiamas 1 % agarozės gelis su EtBr (2.2.9). Geliui sustingus ištraukiamos šukutės, suformuojančios šulinėlius gelyje. Analizuojami DNR mėginiai sumaišomi su 6×elektroforetiniu DNR dažu (pagal santykį 5 DNR mėginio:1 dažo). Į šulinėlius gelyje suleidžiama 5–10 µl paruošto mišinio su dažu. DNR mėginių analizei, viename šulinėlyje įnešami 3 µl DNR fragmentų dydžio standarto („GeneRuler™ DNA Ladder Mix“). Elektroforezė vykdoma esant 7 V/cm įtampai. Po elektroforezės gelis vizualizuojamas transliuminatoriuje po UV šviesa. Apytikslė DNR koncentracija nustatoma vizualiai lyginant tiriamąjį DNR mėginį su DNR fragmentų dydžių standartu.

2.3.5. DNR koncentracijos nustatymas

DNR koncentracija nustatoma spektrofotometru „Nanodrop 2000“ („Thermo Fisher Scientific“), matuojant mėginio absorbciją ties 260 nm ir 280 nm bangos ilgiais.

2.3.6. Polimerazės grandininė reakcija – PGR

DNR pagausinimas vykdomas pagal DreamTaq polimerazės gamintojo „Thermo Fisher Scientific“ rekomendacijas. Reakcijos mišinį (25 µl) sudaro:

- 12,5 µl „DreamTaq Green PCR Master Mix (2×)“ (2.2.6);
- 1,5 µl Pradmuo I;
- 1,5 µl Pradmuo II;
- 0,5 µl DNR;
- 9 µl miliQ H₂O.

Paruošus reakcijos mišinį, PGR atliekamas termocikleryje „iCycler“ pagal nustatytą programą (2.5 lentelė):

2.5 lentelė. PGR sąlygos

Ciklo etapas	Temperatūra	Trukmė	Ciklai
Pradinė DNR denatūracija	95 °C	3 min	1
Pradmenų prilydimas	T _m °C	30 s	30
DNR prailginimas	72 °C	X s	
DNR denatūracija	95 °C	30 s	
Galutinis pradmenų prilydimas	T _m °C	30 s	1
Galutinis DNR prailginimas	72 °C	5 min	
Palaikymas	20 °C	∞ min	

T_m – pradmenų prilydimo temperatūra, kuri nustatoma kiekvienai pradmenų porai pagal „*Thermo Fisher Scientific*“ internetinę skaičiuoklę ¹⁰.

X – DNR prailginimo etapo laikas, kuris parenkamas pagal naudojamos polimerazės sintezės greitį ir gausinamo fragmento sekos ilgį. Paprastai gDNR – 30 s/kb, o pDNR 15 s/kb.

2.3.7. Mėginių paruošimas sekoskaitai

Sekoskaitai PGR produktai ruošiami pagal „*Thermo Fisher Scientific*“ protokolą, naudojant egzozonukleazę I (2.2.6) ir termiškai jautrią šarminę fosfatazę FastAP¹¹ (2.2.6). Paruošiamas reakcijos mišinys, kuriame yra:

- 5 µl PGR produkto;
- 0,5 µl egzozonukleazės I (10 u);
- 1 µl FastAP (1 u).

Mišinys sumaišomas ir inkubuojamas 15 min 37 °C temperatūroje. Reakcijos metu pašalinami neįterpti pradmenys ir suardomi laisvi likę nukleotidai. Tuomet reakcija sustabdoma mišinį kaitinant 85 °C temperatūroje 15 min.

2.3.8. PU degraduojančių mikroorganizmų tyrimas iš skystos terpės

Sterilia mikrobiologine kilpele paimama vienos kolonijos biomasė ir užsėjama į skystą terpę: LB bakterijoms, YEPD mielėms (2.2.4). Ląstelės auginamos per naktį (16–18 val) 30 °C temperatūroje purtant 200–220 aps/min greičiu. Naktinė kultūra perkeliama į sterilų 2 ml ependorfinį mėgintuvėlį ir centrifuguojama 5 min 13400 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. Procedūra kartojama, kol surenkamos visos ląstelės. Terpė nupilama, ląstelės suspenduojamos 1,5 ml 50 mM kalio fosfatiniame buferyje (pH 7,4) (2.2.17) ir centrifuguojama 5 min 13400 aps/min greičiu. Ląstelės dar kartą atplaunamos kalio fosfatinio buferiu (2.2.17) ir centrifuguojamos. Po plovimo, ląstelės suspenduojamos 1 ml fosfatinio buferio (2.2.17). Steriliu antgaliu agarizuotose MSM ir MSM+N terpėse su PDF (2.2.4) padaromi šulinėliai, į kuriuos įnešama 20 µl ląstelių suspensijos. Inkubuojama kambario temperatūroje ne mažiau 14 dienų. Stebimas praskaidrėjimo zonų susidarymas.

¹⁰<https://www.thermofisher.com/lt/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>

¹¹<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EF0654#/EF0654>

2.3.9. Plonasluoksnė chromatografija – TLC

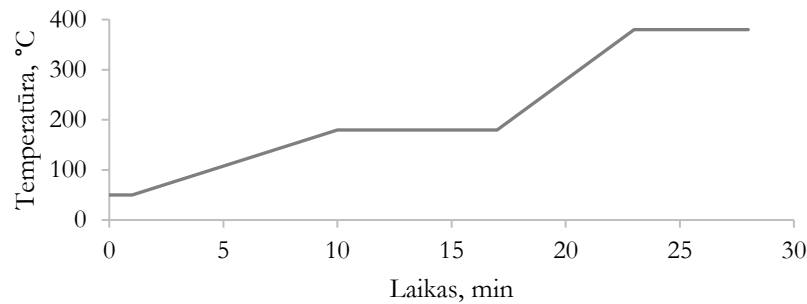
Mėginiai po fermentinio skaidymo nucentrifuguojami 10 min 14300 aps/min greičiu. Supernatantas perleidžiamas per sterilų 0,2 µm filtrą, pašalinant PDF likučius. Tuomet atliekama vandeninio tirpalo ekstrakcija chloroformu, kai mėginio ir chloroformo santykis 1:1. Ekstrakcija vykdoma vorteksuojant 1 min kambario temperatūroje. Gaunami du sluoksniai: apatinis yra chloroformo, o viršutinis vandeninis. Viršutinis sluoksnis perkeliamas į naują ependorfinį mėgintuvėlį ir centrifuguojamas 14300 aps/min greičiu 10 min. Gautas supernatantas perkeliamas į naują ependorfinį mėgintuvėlį. Naudojama aliuminio plokštelė, padengta 0,2 mm silikagelio sluoksniu, iš kurios iškerpama maždaug 2,5 cm pločio ir 6 cm aukščio plokštelė. Ant TLC plokštelės dedama 0,5 µl mėginio ir leidžiama nudžiūti. Visi mėginiai koncentruojami 5 kartus.

Plokštelė su užneštais mėginiais dedama į stiklinę, kurioje, kaip eliuentas, yra metanolis. Metanolio stiklinėje turi būti tiek, kad neapsemtų linijos, kurioje užnešti mėginiai. Stiklinėlė uždengiama aliuminio folija ir laukiama, kol eliuentas su užneštais mėginiais pakils iki plokštelės viršaus. Plokštelė išimama, kai iki viršaus lieka 1 cm tarpas, ir leidžiama nudžiūti. TLC plokštelės dažymui naudojamas bromkrezolio žaliasis dažas (2.2.10), kurio dažymo principas yra pH, t.y. mėlyna spalva rodo neutralų pH, o gelsva - rūgštinį pH. Plokštelė įmerkiamą į dažą, nedelsiant ištraukiama ir leidžiama nudžiūti ant horizontalaus paviršiaus.

2.3.10. Dujų chromatografinė (GC) analizė

GC analizė atliekama naudojant „*Rtx®-Biodiesel TG*“ kolonėlę. Mėginiai po fermentinio skaidymo centrifuguojami 14300 aps/min greičiu 10 min. Supernatantas filtruojamas per sterilų 0,2 µm filtrą, siekiant pašalinti PDF likučius. Tuomet atliekama vandeninio tirpalo ekstrakcija chloroformu, kai mėginio ir chloroformo santykis 1:1. Ekstrakcija vykdoma vorteksuojant 1 min kambario temperatūroje. Nusistovėjęs gaunami du sluoksniai: apatinis yra chloroformo, o viršutinis vandeninis. Viršutinis sluoksnis perkeliamas į naują ependorfinį mėgintuvėlį ir centrifuguojamas 14300 aps/min greičiu 10 min. Gautas supernatantas perkeliamas į naują mėgintuvėlį ir yra paruoštas GC analizei.

„*Rtx®-Biodiesel TG*“ kolonėlės parametrai: kolonėlės ilgis 10 m, vidinis skersmuo 0,32 mm. Kolonėlės pradinė temperatūra 50 °C išlaikoma 1 min. Tada temperatūra keliamą nuo 50 °C iki 180 °C 15 °C/min greičiu, išlaikoma 7 min. Vėliau temperatūra pakeliamą nuo 180 °C iki 380 °C 30 °C/min greičiu, išlaikoma 5 min (**2.1 pav.**). Helis naudojamas kaip nešančios dujos, kurių srautas kolonėlėje 4 ml/min.



2.1 pav. GC analizės metu naudotas temperatūrinis gradientas

2.3.11. Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas transformacijai

Sterilia mikrobiologine kilpele užsėjamos *E. coli* DH5 α ląstelės į 5 ml skystos LB terpės (2.2.4). Antibiotikai šiame žingsnyje nenaudojami. Ląstelės auginamos per naktį (16–18 val) 37 °C temperatūroje purtant 200–220 aps/min greičiu.

Užaugusi naktinė kultūra persėjama: 50 μ l naktinės kultūros įpilama į 5 ml naujos skystos LB terpės (2.2.4). Inkubuojama 1,5–2 val 37 °C temperatūroje, purtant 200–220 aps/min greičiu, kol, ties 600 nm bangos ilgiu, ląstelių tankis pasiekia 0,4–0,5 optinius vienetus. Terpė su užaugusiomis *E. coli* ląstelėmis atvėsinama ledo vonelėje apie 15 min. Tolimesnės procedūros atliekamos 0–4 °C temperatūroje. Ląstelės surenkamos 2 ml ependorfiniame mėgintuvėlyje pakartotinai centrifuguojant 30 s 8000 aps/min greičiu. Terpės supernatantas pašalinamas, ląstelės praplaunamos 1,5 ml atšaldytu NaCl tirpalu (2.2.12) ir centrifuguojamos 30 s 8000 aps/min greičiu. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos 1,5 ml atšaldytu CaCl₂ tirpalu (2.2.12) ir vėl centrifuguojamos 30 s 8000 aps/min greičiu. Ant nuosėdų užpilama 1,5 ml CaCl₂ tirpalo (2.2.12) ir inkubuojama ledo vonelėje 1 val. Po inkubacijos nucentrifuguojama 1 min 8000 aps/min greičiu. Supernatantas pašalinamas, kompetentinės ląstelės transformacijai paruošiamos suspenduojant jas 50 μ l CaCl₂ tirpalo (2.2.12).

2.3.12. Kompetentinių *E. coli* ląstelių transformacija temperatūriniais šoku

Prie paruoštų kompetentinių ląstelių pridedama iki 10 μ l transformuojamo DNR mišinio ir inkubuojama 1,5 val ledo vonelėje. Po inkubacijos atliekama transformacija temperatūriniais šoku: iš ledo mėginys patalpinamas 45 s į 42 °C vandens vonelę. Vėliau atvėsinama iki kambario temperatūros, pridedama 1 ml sterilios skystos LB terpės (2.2.4) ir inkubuojama 50 min 37 °C temperatūroje purtant 200–220 aps/min greičiu. Tuomet ląstelės centrifuguojamos 30 s 8000 aps/min greičiu. Dalis supernatanto nupilama, o jo likučiuose suspenduojamos nusėdusios ląstelės. Paruošiama agarizuota LB terpė su ampicilinu (2.2.4), ant kurios išsėjama 50 μ l suspenduotų ląstelių. Inkubuojama 37 °C temperatūroje per naktį (iki 24 val).

2.3.13. pDNR išskyrimas šarminės lizės metodu

Sterilia mikrobiologine kilpele viena *E. coli* kolonija užsėjama į 5 ml skystos LB terpės su ampicilinu (2.2.4). Kultūra auginama 37 °C temperatūroje purtant 200–220 aps/min greičiu per naktį (16–18 val). Užaugusi naktinė kultūra perpilama į sterilų 2 ml ependorfinį mėgintuvėlį ir centrifuguojama 5 min 13000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas ir centrifugavimas kartojamas, kol surenkamos visos naktinės kultūros ląstelės. Po paskutinio centrifugavimo supernatantas pašalinamas, o ląstelės suspenduojamos 100 µl GTE tirpalo (2.2.13). Pridedama 2 µl Rnazės A (2.2.6) ir įpilama 150 µl šviežiai paruošto lizės tirpalo (2.2.13). Mišinys gerai išmaišomas, inkubuojamas 5 min ledo vonelėje. Į mišinį pridedama 150 µl 5 M kalio acetato tirpalo (2.2.13) ir dar kartą inkubuojama 5 min ledo vonelėje. Praėjus 5 min mėginys centrifuguojamas 3 min 13000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. Susidaręs supernatantas, kuriame yra pDNR, nepaliekiant nuosėdų perkeliamas į sterilų 1,5 ml ependorfinį mėgintuvėlį. Atskirtas supernatantas užpilamas izopropanoliu (santykiu 1:1) ir inkubuojamas 10 min kambario temperatūroje. Po inkubacijos centrifuguojama 3 min 13000 aps/min greičiu kambario temperatūroje. Skystis atsargiai nupilamas, o nuosėdos plaunamos 500 µl 70 % etanolio tirpalu (2.2.13) ir centrifuguojama 3 min 13000 aps/min greičiu. Šis žingsnis kartojamas du kartus. Po paskutinio plovimo supernatantas kiek įmanoma labiau nusiurbiamas, o nuosėdos išdžiovinamos. Sausos nuosėdos suspenduojamos 50 µl miliQ H₂O.

2.3.14. pDNR valymas naudojant PEG8000/MgCl₂

Šarminės lizės būdu (2.3.13) išskirta pDNR nuo RNR priemaišų valoma naudojant 30 % PEG8000/MgCl₂ tirpalą (2.2.13). Steriliame ependorfiniame mėgintuvėlyje pDNR sumaišoma su ½ pradinio tūrio PEG8000/MgCl₂ mišiniu (2.2.13) ir laikoma 5 min kambario temperatūroje. Po inkubacijos centrifuguojama 5 min 13000 aps/min greičiu kambario temperatūroje. Supernatantas pašalinamas, o nuosėdos plaunamos 500 µl 70 % etanolio tirpalu (2.2.13) ir centrifuguojama 3 min 13000 aps/min greičiu. Šis žingsnis kartojamas du kartus. Po paskutinio plovimo supernatantas nusiurbiamas, o nuosėdos ištirpinamos minimaliame tūryje miliQ H₂O.

2.3.15. pDNR analizė restrikcijos endonukleazėmis

pDNR restrikcinė analizė atliekama pagal naudojamų endonukleazių gamintojo „*Thermo Fisher Scientific*“ nurodymus. Paruošiamas reakcijos mišinys (20 µl), kurį sudaro:

- iki 20 µl miliQ H₂O;
- 2 µl buferinis tirpalas* (2.2.6);
- 1 µl restrikcijos endonukleazė (2.2.6);
- 0,5–1,0 µg DNR.

* buferinis tirpalas parenkamas pagal naudojamą restrikcijos endonukleazę ir gamintojo rekomendacijas.

Mišinys sumaišomas ir inkubuojamas 1–3 val 37 °C temperatūros vandens vonelėje. Po inkubacijos atliekama reakcijos metu gautų produktų DNR elektroforezė agaroziniame gelyje (2.3.4). Produktų dydžiai lyginami su DNR fragmentų dydžių standartu.

2.3.16. Uretanazės geno raiška

Tikslinio uretanazės geno raiška vykdoma *E.coli* BL21(DE3) kamiene pagal naudotos plazmidės pLATE11 gamintojo „*Thermo Fisher Scientific*“ protokolą. Sterilia mikrobiologine kilpele viena transformuotos *E.coli* kolonija iš Petri lėkštelės užsėjama į 5 ml skystos mitybinės LB terpės su antibiotiku ampicilinu (iki galutinės 100 µg/ml koncentracijos) (2.2.4). Kultūra auginama per naktį 16–18 val 37 °C temperatūroje purtant 200–220 aps/min greičiu.

Užaugusi naktinė kultūra santykiu 1:49 persėjama į 20 ml naujos skystos mitybinės LB terpės su ampicilinu (2.2.4). Ši persėta kultūra auginama 37 °C temperatūroje purtant 200–220 aps/min greičiu, iki kol optinis tankis, ties 600 nm bangos ilgiu, pasiekia 0,5–0,6 optinius vienetus. Norint indukuoti tikslinio geno raišką pridėjama IPTG tirpalo iki galutinės 1 mM koncentracijos (2.2.17), ir auginama 3 val tomis pačiomis sąlygomis. Po auginimo ląstelių kultūra paruošta tolimesniems tyrimams.

2.3.17. Ląstelių biomasės ardymas stiklo rutuliukais

Užaugusi ląstelių kultūra perpilama į sterilų, prieš tai pasvertą, mėgintuvėlį ir centrifuguojama 20 min 3000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. Po centrifugavimo terpės supernatantas perpilamas į naują sterilų mėgintuvėlį, o ląstelių biomasė plaunama 100 mM kalio fosfatiniu buferiu (pH 7,0) (2.2.17). Buferyje suspenduotos ląstelės centrifuguojamos 20 min 3000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. Supernatantas nupilamas, o ląstelių biomasė pasveriamas. Ląstelės pakartotinai suspenduojamos 100 mM kalio fosfatiniame buferyje (2.2.17), pagal biomasės ir buferio santykį 1:4.

Resuspenduotos ląstelės perkeliama į sterilų 2 ml ependorfinį mėgintuvėlį ir užpilamos stiklo rutuliukais, santykiu: 4 ml suspenduotų ląstelių ir 5 ml stiklo rutuliukų. Ląstelių biomasė ardoma 15 min kartojant cikliškai: 30 s laikoma ledo vonelėje, 30 s vorteksuojama.

2.3.18. Baltymų frakcijų atskyrimas

Po ląstelių ardymo (2.3.17) supernatantas nusiurbiamas į naują sterilų 1,5 ml mėgintuvėlį, kuris centrifuguojamas 20 min 17000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. Gaunamos dvi baltymų frakcijos: supernatantas - tirpūs viduląsteliniai baltymai, o ląstelių nuolaužos - netirpūs baltymai. Atsargiai, nepaliekiant nuosėdų supernatantas nusiurbiamas ir perkeliama į naują mėgintuvėlį. Ląstelių nuolaužos plaunamos 100 mM kalio fosfatiniu buferiu (2.2.17) ir pakartotinai centrifuguojamos 10 min 17000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. Supernatantas

pašalinamas, o nuosėdos suspenduojamos tokia pačia tūryje 100 mM kalio fosfatiniame buferyje (2.2.17). Gautos baltymų frakcijos laikomos lede.

2.3.19. Baltymų koncentravimas

Baltymų koncentravimas atliekamas naudojant „Amicon Ultra 30K” koncentruojamuosius mėgintuvėlius pagal gamintojo „Merck Millipore“ rekomendacijas. Prieš koncentravimą membrana du kartus plaunama: užpilama 10 ml miliQ H₂O ir centrifuguojama 20 min 3000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje. Po paskutinio plovimo miliQ vanduo pašalinamas iš mėgintuvėlio. Koncentruojamas mėginys užpilamas ant membranos ir centrifuguojama 3000 aps/min greičiu 4 °C temperatūroje, kol mėginys sukcentruojamas iki pageidaujamo tūrio. Koncentratas atsargiai nusiurbiamas, nepažeidžiant membranos.

2.3.20. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradford metodu

Paruoštas Bradford reagentas (2.2.14) gali būti naudojamas iki 30 dienų. Tirpalo kokybė tikrinama matuojant jo absorbciją prie 465 nm bangos ilgio: tinkamas naudoti, kol optinis tankis yra 1,3–1,5 ribose, kaip kontrolę naudojant dH₂O.

Nustatant baltymo koncentraciją mėginyje, į mėgintuvėlį įpilami atitinkami analizuojamo mėginio ir 0,15 M NaCl tirpalo (2.2.14) kiekiai, kad bendras mišinio tūris būtų 300 μl. Tuomet įpilama 3 ml Bradford reagento (2.2.14), mišinys sumaišomas ir reakcija vykdoma kambario temperatūroje 2 min. Lygiai po 2 min spektrofotometru matuojamas mėginio optinis tankis prie 595 nm bangos ilgio. Kontrolinį mėginį sudaro 300 μl 0,15 M NaCl (2.2.14) ir 3 ml Bradford reagento (2.2.14).

Baltymo koncentracija mėginyje apskaičiuojama pagal formulę:

$$c = \frac{Abs \cdot V_B}{tg\alpha \cdot V_M}$$

kur:

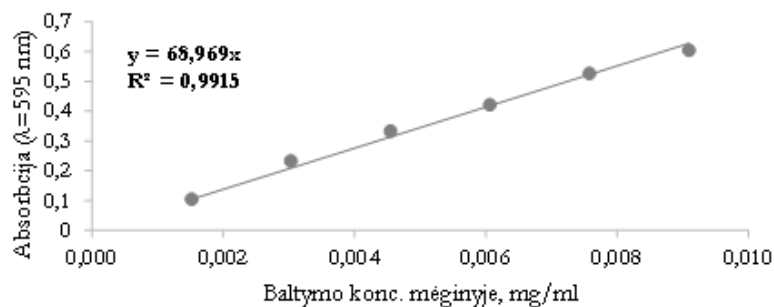
Abs – išmatuotas optinis tankis;

tg α – kalibracinės kreivės nuokrypio kampas;

V_B – bendras reakcijos tūris, ml;

V_M – mėginio tūris, ml.

Kalibracinė kreivė sudaroma naudojant skirtingų koncentracijų JSA standarto tirpalus



2.2 pav. Kalibracinė kreivė baltymų koncentracijos nustatymui

2.3.21. Baltymų elektroforezė – NDS-PAGE

Stiklinės plokštelės nuvalomos 70 % etanolio tirpalu (2.2.15) ir surenkamas gelio rėmelis. Baltymų elektroforezė vykdoma poliakrilamidiniame gelyje. Pirmiausia ruošiamas skiriamasis 12 % gelis (žr. 2.6 lentelė): svarbu, įpylus paskutinį reagentą TEMED, visas mišinys gerai sumaišomas ir nedelsiant pilamas į gelio rėmelį, kadangi prasideda gelio polimerizacijos reakcija. Skiriamuoju geliu užpildoma maždaug $\frac{3}{4}$ viso rėmelio tūrio, o ant viršaus atsargiai užpilama dH₂O. Gelio polimerizacijos trukmė apie 20–30 min. Per tą laiką paruošiamas koncentruojamasis 4 % gelis (žr. 2.6 lentelė), kuris taip pat gerai sumaišomas ir užpilamas ant sustingusio skiriamojo gelio. Tarp stiklo plokštelių įstatomos šukutės gelyje suformuojančios šulinėlius. Geliui leidžiama polimerizuotis apie 20 min.

Po polimerizacijos ištraukiamos šukutės, gelis įstatomas į vertikalią elektroforezės kamerą ir pritvirtinamas. Kamera užpildoma 1×elektroforezės buferiniu tirpalu (2.2.15), pašalinami po stikleliais susikaupę oro burbuliukai.

2.6 lentelė. Baltymų elektroforezės gelių sudėtis

Reagentai	Tūris, μ l	
	Skiriamasis gelis (12 %)	Koncentruojamasis gelis (4 %)
30 % AA / 0,8 % BAA*	2000	335
1,5 M Tris–HCl (pH 8,8)*	1250	-
1,0 M Tris–HCl (pH 6,8)*	-	625
10 % NDS*	50	25
dH ₂ O	15855	1500
10 % APS*	25	12,5
TEMED	2,5	2,5

*tirpalų ruošimo metodikos pateiktos 2.2.15 skyriuje

Ruošiant analizuojamus mėginius, jie sumaišomi su 2× koncentruotu elektroforetiniu dažu (su merkaptoetanoliu) (2.2.15) santykiu 1:1 ir inkubuojami 95 °C temperatūroje 5 min. Į paruošto gelio šulinėlį leidžiama 10 μ g analizuojamo mėginio baltymų. Šalia mėginių į šulinėlį užnešama 3,5 μ l baltymų molekulinės masės standarto („PageRuler™ Prestained Protein Ladder“). Pradžioje elektroforezė vykdoma esant 150 V įtampai, pasiekus skiriamąjį gelį, įtampa padidinama iki 190 V.

Po elektroforezės gelis atsargiai nuplaunamas dH₂O. Gelyje išfrakcionuoti baltymai vizualizuojami dažant „Coomassie Blue R-250“ dažo tirpalu (2.2.15) 20 min purtant ant purtyklės kambario temperatūroje. Vėliau gelis blukinamas dH₂O dažnai keičiant vandenį, kol dažas atplaunamas ir aiškiai matomos atskirtos baltymų frakcijos.

2.3.22. Uretanazinio aktyvumo nustatymas Berthelot reakcija

Berthelot reakcija atliekama dviem etapais. Pirmiausia vykdoma fermentinė reakcija, kurios mišinį sudaro 1 ml fermento 100 mM kalio fosfatiniame buferyje (pH 7,0) (2.2.17) ir 1 ml 3 % etilkarbamato tirpalo (2.2.16). Ši reakcija vykdoma 15 min 37 °C temperatūroje. Reakcija sustabdoma pridedant 1 ml 0,5 M sieros rūgšties tirpalo (2.2.16). Tuomet vykdoma spalvinė reakcija, kai į sustabdytos reakcijos mišinį pridedama po 1 ml I ir II Berthelot reagentų (2.2.16), sumaišoma ir inkubuojama 20 min 37 °C temperatūroje. Analizuojamų mėginių optinis tankis matuojamas ties 650 nm bangos ilgiu.

Fermento aktyvumo vienetas (U) apibūdinamas kaip fermento kiekis, reikalingas suskaidyti etilkarbamatą iki 1 μmol amoniako, per 1 min., esant atmosferiniam slėgiui 37 °C temperatūroje, kai pH 7,0.

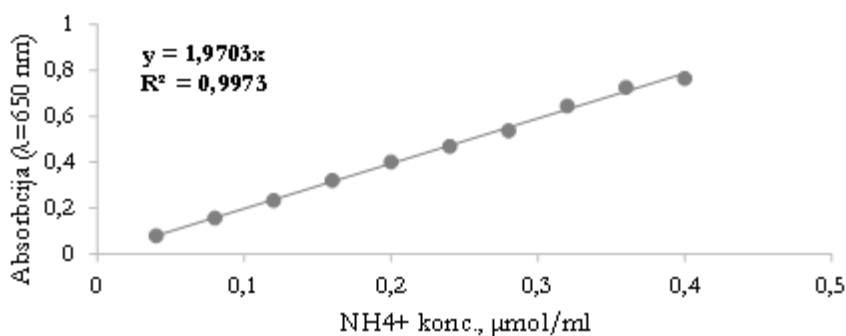
Uretanazinis aktyvumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$U = \frac{Abs \cdot V_B}{tg \alpha \cdot V_M \cdot t}$$

kur:

- Abs – išmatuotas optinis tankis;
- tg α – kalibracinės kreivės nuokrypio kampas;
- V_B – bendras reakcijos tūris, ml;
- V_M – mėginio tūris, ml;
- t – reakcijos trukmė, min.

Kalibracinė kreivė sudaroma naudojant skirtingų koncentracijų amonio sulfato tirpalus (2.2.16). Pagal kalibracinę kreivę įvertinama amonio jonų koncentracija analizuojamame mėginyje (2.3 pav.):



2.3 pav. Kalibracinė kreivė fermento uretanaziam aktyvumui nustatymui

2.3.23. Uretanazinio aktyvumo nustatymas Petri lėkštelėje

Pasveriamas komercinė LB terpė, agaras ir monokalio dihidrofosfatas (žr. 2.7 lentelė). Šie komponentai ištirpinami dH₂O ir autoklavuojama 1/20` režimu. Į pravėsusią sterilią terpę pridedami papildomi komponentai – indikatorius fenolftaleinas ir etilkarbamatas. Terpė išpilstoma į Petri lėkštes, laikoma 4 °C temperatūroje.

2.7 lentelė. Terpės sudėtis uretanazinio aktyvumo nustatymui

Komponentas	LB	Agaras	Monokalio dihidrofosfatas	Fenoltaleinas	Etilkarbamatas
Koncentracija	2,5 %	1,5 %	0,2 %	0,005 %	0,5 %

Ant terpių, skirtų uretanaziniam aktyvumui nustatyti, užsėjamos grynos mikroorganizmų kultūros ir inkubuojamos 30 °C temperatūroje. Stebima ar įvyksta terpėje esančio indikatorius spalvos pokytis.

Tiriant transformuotos *E. coli* uretanazinį aktyvumą papildomai į pravėsusią terpę pridedamas antibiotikas ir ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje. Terpėje užaugus ląstelėms, siekiant indukuoti tikslinio geno raišką paruošiamas 1,5 % agaras, į kurį po autoklavavimo pridedamas IPTG (IPTG koncentracija tirpale 1 mM) (2.2.17). Tuomet terpėje, ant užaugusių ląstelių, užliejamas plonas agaro su IPTG sluoksnis. Stebimas terpėje esančio indikatorius spalvos pokytis.

3. REZULTATAI

Atliekant poliuretano degradacijos biotechnologiniais metodais tyrimus, buvo dirbama dvejomis kryptimis. Viena iš jų apėmė poliuretano skaidančių mikroorganizmų paiešką ir jų identifikavimą. Kita buvo orientuota į fermentinį poliuretano depolimerizavimą, naudojant komercinius fermentus ir genų raiškos sistemas.

Pagrindiniais tyrimo objektais buvo naudojami polieterinės (PE-PU) ir poliesterinės (PES-PU) kilmės vandeniniai PDF tirpalai (2.2.1). PDF - tai poliuretano dispersinė fazė, susidedanti iš tirpiklyje tolygiai pasiskirsčiusių PU dalelių. PDF galima apibūdinti kaip koloidinę sistemą, pagal nanometrinių poliuretano dalelių dydį. Pramonėje PDF tirpalas naudojamas tekstilės gaminių, avalinės ar lagaminų paviršių padengimui¹². Ši poliuretano dispersinė sistema, dėl mažo polimerinių dalelių dydžio ir vienalytiškumo vandeninėje terpėje, yra tinkama priemonė mikroorganizmų ir fermentų biodegradacijai tirti. PDF tirpalas selektyviose mitybinėse terpėse mikroorganizmams yra tiekiamas kaip substratas, t.y. kaip anglies ir/ar azoto šaltinis. Mikroorganizmų fermentams hidrolizuojant agarizuotoje terpėje esančias PDF daleles, susidaro vandenyje tirpios molekulės, todėl terpėje, aplink mikroorganizmų kolonijas, pastebimos skaidrios zonos (Magnin A. *ir kt.*, 2019). PDF taip pat yra tinkamas mikroorganizmų ir fermentų degradacijos tyrimams skystoje terpėje, matuojant tirpalo praskaidrėjimą spektrofotometriškai, stebint PDF dalelių pokytį arba analizuojant susidariusius vandenyje tirpius skilimo produktus (Hung C.S. *ir kt.*, 2016; Alvarez-Barragan J. *ir kt.*, 2016).

PDF naudojimą tyrimuose apsunkina tai, kad tiksli PDF struktūra nėra žinoma. Gamintojas pateikia tik labai bendrą informaciją apie sintezės metu naudoto izocianato ir poliolio struktūrą: izocianatas - alifatinis ar aromatinis, poliolis - poliesterinis ar polieterinis. PDF gamybos metu taip pat gali būti naudojami įvairūs priedai, apie kuriuos gamintojas informacijos nesuteikia. Biffinger J.C. *ir kt.* (2015), bandė išsiaiškinti PES-PU struktūrą. Šių autorių teigimu, manoma, kad PES-PU pagrindą sudaro poliheksano/neopentilo adipatinis poliesteris ir HDI, tačiau tai yra tik preliminarūs rezultatai. Kadangi tiksli PDF cheminė struktūra yra nežinoma, sunku prognozuoti galimus skilimo mechanizmus, todėl atliekamų tyrimų spektras išsiplečia.

3.1. Mikrobiologinė PU biodegradacija

Atliekant poliuretano skaidančių mikroorganizmų paiešką, dėl didesnės mikroorganizmų įvairovės, buvo naudojami du aplinkos mėginiai - dirvožemis bei Kuršių marių ir Baltijos jūros vandens mišinys (pastarasis buvo pavadintas „Jūra“) (2.3.1). Įprastai dirvožemis, kuriame a

¹² <https://solutions.covestro.com/en/brands/impranil>

priori yra daug mitybinių medžiagų, pasižymi mikroorganizmų įvairove ir gausa: viename grame paviršinio dirvožemio (iki 15 cm gylio) yra nustatoma apie 10^9 bakterijų ir apie 10^5 grybų (Hooman J.J., 2010). Be to, Kuršių marių ir Baltijos jūros vandens mišinys (2.3.1) yra svarbus mikroorganizmų šaltinis, dėl galimo mikroorganizmų prisitaikymo, vykdyti plastikų, tarp jų ir poliuretano, biodegradaciją. Kadangi atvirose vandens telkiniuose susikaupusios plastiko atliekos, patenkančios iš pakrančių, upių ir jūrų, sudaro apie 3 % visos pasaulinės plastikų gamybos¹³.

Kaip mikroorganizmų šaltiniai taip pat buvo naudojamos PU putos iš teatro lėlių („79PU“) ir automobilio sėdynių („88PU“) (2.3.1). Šie mėginiai yra seni – teatro lėlių putos pagamintos apie 1979 metus, o automobilio sėdynių putos - apie 1988 metus. Mėginiai „79PU“ ir „88PU“ yra pageltę ir per ilgą naudojimo laiką galimai pradėję irti, todėl buvo manoma, kad yra potencialūs poliuretano skaidančių mikroorganizmų šaltiniai (3.1 pav.).



3.1 pav. Mikroorganizmų šaltiniai: „79PU“ (kairėje) ir „88PU“ (dešinėje) mėginiai

Renkant terpes mikroorganizmų kultivavimui, buvo atsižvelgiama, kad terpė nebūtų „turtina“ anglies ir azoto šaltinių atžvilgiu. Todėl pasirinkta minimali druskų terpė (MSM), kurios sudėtyje yra septynios skirtingos druskos (2.2.4) (Peng Y.H. *ir kt.*, 2014). Paruoštoje MSM terpėje, kaip anglies ir azoto šaltinis, buvo pridedamas PDF tirpalas, taip siekiant izoliuoti mikroorganizmus skaidančius ir savo metabolizmo procesams naudojančius poliuretano. Be to, literatūroje pateikiami tyrimai, kuriais nustatyta, kad mikroorganizmų augimas priklauso nuo jiems tiekiamų C ir N šaltinių. *Nakajima-Kambe T. ir kt. (1995)* padarė išvadą, kad *D. acidovorans* augdamas terpėje, kurioje be PES-PU, papildomai buvo dedamas azoto šaltinis, geriau skaidė poliuretano, nei augdamas terpėje, kurioje naudojamas tik PES-PU, kaip anglies ir azoto šaltinis. Būtent šiuo tikslu buvo ruošiama MSM+N terpė, kurioje kaip papildomas azoto šaltinis naudotas 1 g/l amonio sulfatas. Atsižvelgiant į *Nair S. ir Kumar P. (2007)* atliktą tyrimą, kuriuo nustatyta, kad *Bacillus pumilus* geriausiai augo terpėje su 0,3 % PES-PU, buvo nuspręsta visais atvejais taip pat ruošti terpes su 0,3 % PDF. Taigi, siekiant izoliuoti poliuretano skaidančius mikroorganizmus, tyrimo metu buvo naudoti įvairūs mikroorganizmų šaltiniai ir skirtingų kompozicijų selektyvios mitybinės terpės.

¹³ <https://ourworldindata.org/plastic-pollution>

3.1.1. PU skaidančių mikroorganizmų paieška

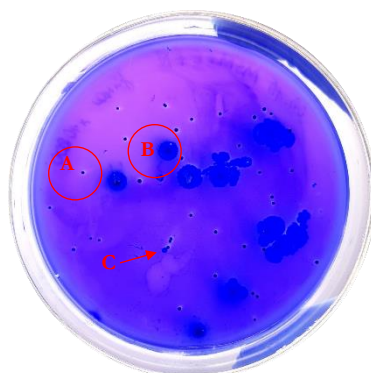
Vykdamas PU skaidančių mikroorganizmų paiešką, mėginiai skleidžiami ant selektyvių MSM ir MSM+N terpių, kurios papildytos 0,3 % PDF tirpalu. Užsėtos lėkštelės buvo inkubuojamos kambario temperatūroje ne mažiau kaip 14 dienų (2.3.1).

Mikroorganizmai ant selektyvių agarizuotų terpių su PE-PU augo negausiai ir aplink užaugusias bakterijų kolonijas skaidrių poliuretano skaidymo zonų neformavo. Taip pat buvo pastebėta, jog mikroorganizmai galėjo augti ant terpės, kurioje yra PE-PU, bet jo neskaidė. Kadangi, net po ilgesnio nei 2 savaitės inkubacinio periodo, vizualiai buvo pastebimas biomasės padidėjimas, tačiau matomos hidrolizės zonos nesusidarė. Manoma, kad šie mikroorganizmai anglį fiksuoja iš ore esančio CO₂. Siekiant paskatinti mikroorganizmų augimą ir tikintis, kad tarp jų bus gebantys skaidyti PE-PU, buvo nuspėsta paruošti „turingesnes“ terpes, t.y. pridėti papildomus mitybinius anglies šaltinius. Papildomais anglies šaltiniais buvo naudoti glicerolis, gliukozė, natrio citratas arba natrio sukcinatas (2.2.4) (Hung C.S. ir kt., 2016). Ant paruoštų terpių su PE-PU ir papildomais anglies šaltiniais buvo užsėti tie patys mėginiai ir inkubuojami kambario temperatūroje 14 dienų (2.3.1). Po inkubacijos, užaugus mikroorganizmams, MSM+N+Citr. terpėje su PE-PU, buvo pastebėta viena kolonija aplink save formuojanti praskaidrėjimo zoną. (3.2 pav.). Tai užsėtas „Dirvožemis II“ mėginys, kuris buvo skiestas 10000 kartų. Viso tyrimo metu, tai buvo vienintelis atvejis, kai terpėje su PE-PU aplink koloniją matoma hidrolizės zona. Ši bakterijų kolonija pasirinkta identifikavimui.



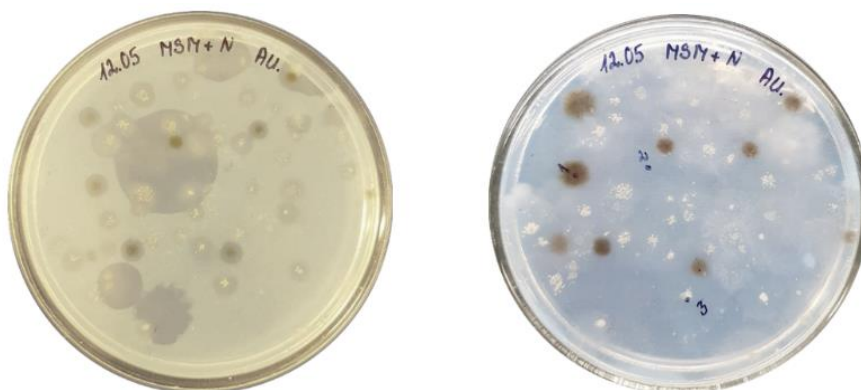
3.2 pav. Terpėje MSM+N+Citr. su PE-PU užsėtas „Dirvožemis II“ mėginys

Yra žinoma, kad PE-PU biodegradacijos tyrimams reikalingas ilgesnis inkubacijos laikas (Matsumiya Y. ir kt., 2010). Siekiant patikrinti ar kitos užaugusios kolonijos ant selektyvių terpių su PE-PU ir papildomais anglies šaltiniais, formuoja hidrolizės zonas, terpės buvo dažomos Coomassie dažu (2.3.2), kuris padidina biodegradacijos zonų aptikimo jautrumą. Šis dažymo metodas yra pagrįstas Coomassie mėlynojo dažo sąveika su poliuretanu. Mikroorganizmams hidrolizuojant terpėje esantį PDF, sumažėja Coomassie mėlynojo sąveika su poliuretanu ir susidaro šviesi zona mėlyname fone (Howard G.T., ir kt., 2000; Howard G.T. ir Hilliard N.P., 1999). Lėkštelės pavyzdys, nudažytos Coomassie mėlynuoju pateiktas 3.3 pav., kai terpėje MSM+N+Citr. buvo užsėtas „Jūra“ mėginys (skiestas 10000 kartų). Aplink A koloniją matoma skaidri zona, tačiau skaidrėjimo nėra aplink B ir C bakterijų kolonijas. Identifikavimui buvo atrinktos bakterijų kolonijos, aplink kurias susidarė skaidrios zonos.



3.3 pav. Terpėje MSM+N+Citr. su PE-PU užsėtas „Jūra“ mėginys. **A** kolonija formuoja hidrolizės zoną, **B ir C** kolonijos hidrolizės zonos neformuoja

Analogiškai, prieš tai aptartiems PE-PU tyrimams, buvo atlikti tyrimai MSM ir MSM+N terpėse su PES-PU. Ant terpių buvo užsėti tie patys, „Dirvožemis I“, „Dirvožemis II“, „Jūra“, „79PU“, „88PU“, mėginiai ir inkubuojami kambario temperatūroje (2.3.1). MSM+N terpėje su užsėtu „88PU“ mėginiu, po 14 dienų inkubacijos aplink mikroorganizmų kolonijas buvo matomos aiškios PES-PU hidrolizės zonos (**3.4 pav. kairėje**). Tai patvirtina ir literatūroje pateikiamą informaciją, jog PES-PU yra labiau jautrus mikroorganizmų poveikiui nei PE-PU (Mahajan N. ir Gupta P., 2015). Pratęsus auginimo laiką iki 4 savaičių, pastebėtas tolesnis PES-PU skaidymas. Galiausiai terpė tapo visai skaidri (**3.4 pav. dešinėje**). Tai rodo, kad mikroorganizmai nuolat naudoja PES-PU kaip energijos šaltinį. Be to, kaip ir PE-PU atveju, buvo mikroorganizmų, kurie gebėjo augti, tačiau neskaidė PES-PU.



3.4 pav. Terpėje MSM+N su PES-PU užsėtas mėginys „88PU“. Kairėje po dviejų savaičių inkubacijos; dešinėje po keturių savaičių inkubacijos

Kadangi PES-PU biodegradacijos zonos buvo aiškiai matomos, tolimesniuose tyrimuose naudoti terpes su papildomais anglies šaltiniais ar dažyti Coomassie mėlynuoju nebuvo tikslinga. Užaugę mikroorganizmai buvo persėjami ant agarizuotų LB ir YEPD terpių ir gryninami iki homogeniškų kultūrų. Iš jų, identifikavimui buvo pasirinkti mikroorganizmai vykdančius PES-PU biodegradaciją.

3.1.2. PU skaidančių mikroorganizmų identifikavimas

Prieš identifikavimą, išgryninti mikroorganizmai buvo persėti ant selektyvių terpių, iš kurių buvo išskirti. Tokiu būdu siekiant dar kartą patikrinti ir įsitikinti šių mikroorganizmų gebėjimu augti ant PE-PU ir degraduoti PES-PU. Sekoskaitai buvo atrinkti morfologiškai skirtingi mikroorganizmai, tarp kurių buvo aštuoni bakterijų kamienai, gebantys augti ant PE-PU, ir trys - viena bakterija ir du grybai - biodegraduojantys PES-PU.

Bakterijų ir grybų gDNR išskyrimui naudotas „Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit“ rinkinys (2.3.3). Bakterijų molekulinis identifikavimas atliktas pagausinus 16S rRNR geno sritį, naudojant P1492 ir P27 pradmenis (2.2.5). Grybai buvo identifikuojami pagal 18S – 5,8S rRNR tarpgentinį regioną (ITS), naudojant P499 ir P498 pradmenis (2.2.5). PGR reakcija vykdyta termocikleryje (2.3.6), šalia analizuojamų mėginių buvo atliekamos kontrolinės reakcijos. PGR metu gautų produktų koncentracija nustatoma elektroforezės metodu agarozės gelyje (2.3.4). Sekoskaitai PGR produktai buvo ruošiami pagal 2.3.7 metodiką, siekiant pašalinti nesureagavusius reagentus (polimerazė, pradmenys, ddNTP) bei mažos molekulinės masės šalutinius PGR produktus.

Sekoskaita buvo atlikta VU Biotechnologijos instituto DNR sekoskaitos centre, kuriame remiamasi Sendžerio metodu, pagrįstu DNR grandinės terminacija su fluorescenciškai žymėtais terminatoriais (ddNTP). Sekoskaita atliekama iš 5' galo ir 3' galo. Elektroferogramų rezultatai apdoroti „Geneious Pro 4.8.5“ programa. Pagal gautas konsensuso sekas, buvo ieškoma panašiausių sekų, naudojant NCBI (*angl.* The National Center for Biotechnology Information) *BLAST* algoritmą. Paieška atlikta nukleotidinėje duomenų bazėje (nr/nt), patikrinant analizuojamų sekų unikalumą. Tačiau ši duomenų bazė nėra itin patikima, kadangi autoriai laisvai gali deponuoti sekas be griežtų reikalavimų. Todėl, papildomai bakterinių sekų paieška atlikta 16S rRNR duomenų bazėje, o grybų – ITS duomenų bazėje. 16S rRNR ir ITS duomenų bazės bei jų turinys yra griežtai kontroliuojamos, todėl yra patikimesnės. Palyginamoji analizė buvo atlikta *MAFFT* įrankiu, kuomet analizuojama seka lyginama su šimtu panašiausių sekų, esančių duomenų bazėje. Toks molekulinis identifikavimas leidžia identifikuoti mikroorganizmus genties ribose. **3.1 lentelėje** pateikti mikroorganizmų pavadinimai, kurių sekos buvo panašiausios į tyrimo metu analizuotų bakterijų 16S rRNR geno sekas ir grybų ITS regiono sekas bei nukleotidų skirtumai nuo panašiausios sekos, esančios 16S rRNR / ITS duomenų bazėje.

3.1 lentelė. Identifikuoti mikroorganizmai ir jų sekų palyginimas NCBI duomenų bazėse

Eil. nr.	Mikroorganizmas su panašiausia 16S rRNR / ITS geno seka 16S rRNR / ITS duomenų bazėje*	Nukleotidų skirtumas nuo panašiausios sekos:		Išskirta iš
		nr/nt duomenų bazėje	16S rRNS / ITS duomenų bazėje*	
Auga ant PE-PU				
1.	<i>Streptomyces</i> sp.	0	0	
2.	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i>	0	0	
3.	<i>Kocuria carniphila</i>	1	2	„Dirvožemis I“,
4.	<i>Micrococcus antarcticus</i>	0	4	„Dirvožemis II“
5.	<i>Rhodococcus artemisiae</i>	0	10	
6.	<i>Micrococcus endophyticus</i>	0	12	
7.	<i>Delftia acidovorans</i>	0	1	
8.	<i>Microbacterium oxydans</i>	0	1	„Jūra“
Skaido PES-PU				
9.	<i>Paenibacillus pabuli</i>	0	2	
10.	<i>Stachybotrys chartarum</i>	0	0	„79PU“
11.	<i>Penicillium citrinum</i>	0	0	„Dirvožemis II“

*bakterijoms 16S rRNR duomenų bazėje, grybams – ITS duomenų bazėje.

Prieš tai aptarta bakterijos kolonija, suformavusi matomą hidrolizės zoną MSM+N+Citr. terpėje su PE-PU (3.2 pav.), seka Nr. 5, buvo identifikuota priklausanti *Rhodococcus* sp. genčiai (3.1 lentelė, seka Nr. 5). Akutsu-Shigeno Y. ir kt. (2006) parodė, kad šios genties atstovas *R. equi* TB-60 pasižymėjo gebėjimu skaidyti toluen-2,4-dikarbamo rūgšties dibutilo esterį, susidarant tolueno diaminui, ir buvo pripažintas kaip vykdamasis uretaninio ryšio hidrolizę. Taigi, bakterija Nr. 5 taip pat galimai skaido PE-PU esančią uretaninę jungtį, tačiau reikalingi išsamesni tyrimai.

Atliktas sekos Nr. 3 palyginimas su šimtu panašiausių sekų, parodė, kad analizuojama seka (3.5 pav. 101/1-1387, pažymėta raudona rodykle), nuo artimiausios nr/nt duomenų bazėje esančios sekos, skyrėsi vienu nukleotidu 1280 pozicijoje. Siekiant patikrinti, ar nebuvo įsivėlusį klaidą, sekoskaita atlikta pakartotinai. Gauti sekoskaitos rezultatai buvo analogiški pirmiesiems. Todėl remiantis šiais atliktos filogenetinės analizės rezultatais galima teigti, kad tai yra unikali seka. Nuspręsta šią 16S rRNR geno seką deponuoti į NCBI Genų banko nr/nt duomenų bazę. Seka pavadinta *Kocuria* sp. TBS102 ir suteiktas prieigos numeris MN038066. Pilna *Kocuria* sp. TBS 102 16S rRNR geno seka pateikta 1 priede.

	1280
101/1-1387	GCGAGAGAGTGTAG
_R_MH671540.	GCGAGAGAATGTAG
_R_KU147416.	GCGAGAGAATGTAG
_R_KT905645.	GCGAGAGAATGTAG
_R_HM579796.	GCGAGAGAATGTAG
_R_AM237350.	GCGAGAGAATGTAG
_R_MH298693.	GCGAGAGAATGTAG
_R_FM873332.	GCGAGAGAATGTAG
_R_JN245672.	GCGAGAGAATGTAG
_R_NR_0271930	GCGAGAGAGTGTAG
_R_KC848894.	GCGAGAGAATGTAG
_R_JX949819.	GCGAGANNNTGTAG
_R_KU497552.	GCGAGAGAATGTAG
_R_KU184512.	GCGAGAGAATGTAG
_R_JN644610.	GCGAGAGAATGTAG
_R_JN644516.	GCGAGAGAATGTAG
_R_DQ227777.	GCGAGAGAATGTAG
_R_KC534176.	GCGAGAGAATGTAG
_R_KR085939.	GCGAAGATATGTAG
_R_NR_1162660	GCGAGGGCAGGTAG
_R_JQ977369.	GCGAGGGCACGTAG
_R_KF306360.	GCGAAGATATGTAG
_R_DQ365571.	GCGAAGATATGTAG
_R_DQ365559.	GCGAAGATATGTAG
_R_AM237379.	GCGAGAAATRTGTAG

3.5 pav. Sekų palyginio fragmentas. *Kocuria* sp. 16S rRNR geno seka - 101/1-1387

Sekos **Nr. 7 (3.1 lentelė)** palyginimo analizės rezultatai parodė, kad seka yra artimiausia *D. acidovorans*. Ši bakterija, izoliuota iš mėginio „Jūra“, pasižymėjo gebėjimu augti terpėje su PE-PU, bet vizualiai matomos hidrolizės zonos nesudarė. Literatūroje yra pateikiami tyrimai, kuriais nustatyta, kad *D. acidovorans* gali augti terpėje su PES-PU ir jį naudoti kaip anglies ir azoto šaltinį (Nakajima-Kambe *ir kt.*, 1995; Akutsu Y. *ir kt.*, 1998), tačiau tyrimų, įrodančių *D. acidovorans* gebėjimą skaidyti PE-PU, nepavyko surasti.

3.1.3. PES-PU skaidančių mikroorganizmų tyrimas

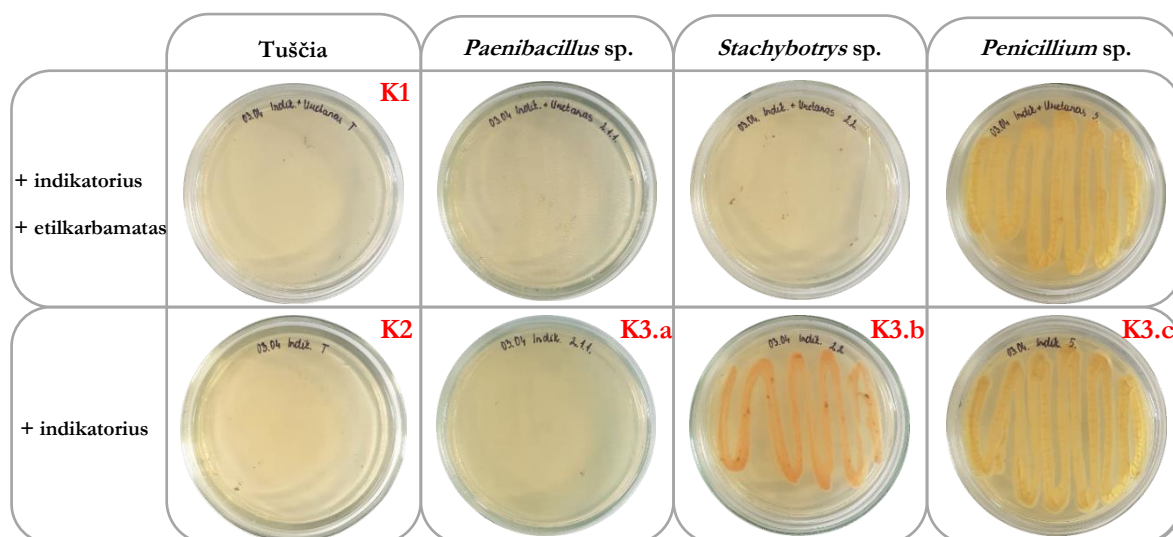
PES-PU skaidantys mikroorganizmai, pagal 16S rRNR ir ITS genų sekas, buvo identifikuoti kaip panašiausi į bakteriją *Paenibacillus pabuli* bei grybus *Stachybotrys chartarum* ir *Penicillium citrinum*. Todėl buvo priskirti *Paenibacillus* sp., *Stachybotrys* sp. ir *Penicillium* sp. gentims. Atliekant literatūros analizę, skirtingi *Penicillium* genties nariai buvo aprašyti kaip vykdančios tiek PE-PU, tiek PES-PU pagrindu pagamintų putų ir PDF dangų skilimo tyrimus. Išskiriamos tokios rūšys kaip *P. funiculosum*, *P. chrysogenum*, *P. brasilianum* (Darby R.T. ir Kaplan A.M., 1968; Alvarez-Barragan *ir kt.*, 2016; Magnin A. *ir kt.*, 2018). Tačiau nepavyko surasti atliktų tyrimų, patvirtinančių *Paenibacillus* sp. ir *Stachybotrys* sp. gebėjimą skaidyti PU. Šiame darbe jie pirmą kartą minimi kaip biodegraduojantys poliuretaną.

Viena išsikeltų hipotezių buvo, kad šių mikroorganizmų gaminami fermentai hidrolizuoja poliuretane esančią uretaninę jungtį. Jų uretanazinis aktyvumas tirtas agarizuotose terpėse Petri lėkštelėse (2.3.23). Šio metodo principas buvo pagrįstas terpėje esančio indikatorius fenolftaleino spalvos pokyčiu, kai fermentui hidrolizuojant etilkarbamato uretaninę jungtį išsiskiria amoniakas. Dėl susidarančio amoniako, terpės pH sumažėja ir gali būti stebimas

fenolftaleino spalvos pokytis (iš bespalvės į raudoną). Stebint ar dėl natūralių vyksmų terpėje ir jos komponentų nevyksta savaiminis pH pokytis, buvo naudojamos kontrolės:

- terpė su indikatoriumi ir etilkarbamatu - patikrinama ar etilkarbamatas neskylla savaime sukeldamas pH pokytį (3.6 pav. **K1**);
- terpė su indikatoriumi - patikrinama ar terpės komponentai ir indikatorius nesąveikauja tarpusavyje (3.6 pav. **K2**);
- terpė su indikatoriumi ir mikroorganizmu - patikrinama ar mikroorganizmas augdamas nesukelia terpės pH pokyčio (3.6 pav. **K3.a** - *Paenibacillus* sp., **K3.b** - *Stachybotrys* sp., **K3.c** - *Penicillium* sp.).

Tiriami mikroorganizmai buvo užsėti eksperimentinėse lėkštelėse su indikatoriumi ir etilkarbamatu. Visos lėkštelės buvo inkubuojamos 30 °C temperatūroje ir stebimas spalvos pokytis. Po 2 sav. auginimo, terpėje esančio indikatoriaus spalva nė vienu atveju nepakito. Todėl buvo galima teigti, jog šie mikroorganizmai ir jų gaminami fermentai etilkarbamato uretaninės jungties neskaidė ir uretanaziniu aktyvumu nepasižymėjo (3.6 pav.).



3.6 pav. PES-PU skaidančių mikroorganizmų uretanazinio aktyvumo nustatymas Petri lėkštelėse; K1, K2, K3, K3.a, K3.b, K3.c – kontrolinės lėkštelės

Kadangi, tiek PES-PU, tiek PE-PU struktūros pagrindą sudaro uretaninės jungtys, mikroorganizmų gebėjimas skaidyti uretaninę jungtį buvo patikrintas kitu būdu - mikroorganizmai buvo užsėjami ant agarizuotų MSM ir MSM+N terpių su PE-PU. Po ilgesnės kaip 14 d. inkubacijos kambario temperatūroje, PE-PU praskaidrėjimo zonos nebuvo matomos (rezultatai nepateikiami). Taigi, atliktas eksperimentas dar kartą patvirtina, kad šiems mikroorganizmams uretanazinis aktyvumas nėra būdingas.

3.1.4. PU biodegradacija laboratoriniais kamienais

Šiame darbo etape buvo tiriamos Taikomosios biokatalizės sektoriaus (TBS) kolekcijoje turimų mikroorganizmų biodegradacijos galimybės skaidyti PE-PU ir PES-PU. Tyrimui buvo naudojami *P. aeruginosa*, *P. putida* ir *Y. lipolytica* kamienai (2.2.2). Pagal 2.3.8 metodiką, skystose LB ir YEPD terpėse (2.2.4) per naktį augintos kultūros buvo atplaunamos nuo augimo terpės 50 mM fosfatinu buferiu (pH 7,4) (2.2.17). Buferyje suspenduotos ląstelės buvo įnešamos į šulinėlius agarizuotose MSM ir MSM+N terpėse su 0,3 % PDF tirpalo (2.2.4). Tokiu būdu užtikrinama, kad ląstelės būtų gyvybingos, t.y. eksponentinėje augimo fazėje, ir galėtų produktyviai skaidyti poliuretaną. Lėkštelės buvo inkubuojamos kambario temperatūroje ir stebima ar susidaro praskaidrėjimo zonos. Gauti tyrimo rezultatai pateikti **3.2 lentelėje**.

- *P. aeruginosa* rūšis yra gerai žinoma ir plačiai ištirta, kaip poliuretaną skaidantis mikroorganizmas. Šio tyrimo metu, visi tirti *P. aeruginosa* kamienai vykdė PES-PU biodegradaciją. Silpniausiu skaidymu pasižymėjo a2 kamienas. Be to, buvo pastebėta, kad *P. aeruginosa* a3 ir a4 kamienai geriau skaido PES-PU MSM terpėje be papildomo azoto šaltinio. Tačiau nė vienas iš tirtų *P. aeruginosa* kamienų neskaidė PE-PU.
- Tirti *P. putida* kamienai nebuvo aktyvūs nei PE-PU, nei PES-PU skaidymo procese. Nors literatūroje pateikiama informacija apie šios rūšies dalyvavimą skaidant PES-PU (Peng Y.H. *ir kt.*, 2014).
- *Y. lipolytica* yra žinoma kaip ekstraląsteliniu lipaziniu aktyvumu pasižyminti mielių rūšis (Pignede G. *ir kt.*, 2000). Visi keturi tirti *Y. lipolytica* kamienai gebėjo skaidyti terpėje esantį PES-PU. Ryškus PES-PU skaidymo skirtumas MSM ir MSM+N terpėse nebuvo pastebėtas. Taip pat nustatyta, kad *Y. lipolytica* KS 71 Y.L.80 kamienas augdamas YEPD terpėje su 0,3 % PES-PU suformavo matomą praskaidrėjimo zoną (rezultatai nepateikiami). Pažymėtina, kad 2019 m. EFSA (*angl.* European Food Safety Authority) mieles *Y. lipolytica* pripažino saugiomis ir tinkamomis naudoti maisto pramonėje, kaip maisto papildą¹⁴. Literatūroje buvo rastas tik vienas tyrimas, apibūdinantis mielių dalyvavimą skaidant poliuretaną - *Thirunavukarasu K. ir kt. (2015)*, nustatė, kad *Cryptococcus* sp. MTCC 5455 auginant žuvų atliekose, susidaro lipazė, veikianti poliuretaną.














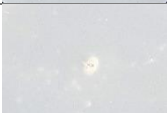


¹⁴ <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2019.5594>

3.2 lentelė. PE-PU ir PES-PU skaidymas TBS kolekcijoje turimais laboratoriniais kamienais

		PE-PU		PES-PU	
		MSM	MSM+N	MSM	MSM+N
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	a1				
	a2				
	a3				
	a4				
<i>Pseudomonas putida</i>	2BNa5				
	IINa2.3				
	2BNaC1				
	p4				
<i>Yarrowia lipolytica</i>	KS 71 Y.L.80				
	KS. Y.L.63 72				
	Y KS. 74 Y.L.73				
	KS. 73 Y.L.64				

Analogiškas eksperimentas (2.3.8) buvo atliktas ir su izoliuotais mikroorganizmais, gebančiais augti terpėje su PE-PU. Nustatyta, kad *Kocuria* sp., kurios seka deponuota į NCBI duomenų bazę, ir *Microbacterium* sp. pasižymėjo gebėjimu skaidyti PES-PU (3.3 lentelė).

3.3 lentelė. Mikroorganizmų, augusių terpėje su PE-PU, gebėjimas skaidyti PE-PU ir PES-PU

	PE-PU		PES-PU	
	MSM	MSM+N	MSM	MSM+N
<i>Kocuria sp.</i>				
<i>Microbacterium sp.</i>				
<i>Rhodococcus sp.</i>				
<i>Delftia sp.</i>				

Iš atliktų tyrimų akivaizdu, kad skirtingi mikroorganizmai yra aktyvūs poliuretano skaidytojai. Šių mikroorganizmų išskyrimas ir identifikavimas yra priežastis toliau plėtoti poliuretano biologinio skaidymo tyrimus, siekiant išsiaiškinti biodegradacijos skilimo mechanizmus ir pritaikyti poliuretano atliekų skaidymui.

3.2. Fermentinė PU biodegradacija

Poliuretano skaidymas fermentais yra detalesnis ir tikslesnis būdas biodegradacijos mechanizmams tirti. Poliuretaną veikiant pavieniais ir žinomo aktyvumo fermentais, pagal susidariusius skilimo produktus, galima numanyti ir/ar identifikuoti poliuretano grandinėje esančias, biodegradacijai jautrias, jungtis. Mikrobiologinė PU degradacija neleidžia visiškai įvertinti skaidymo mechanizmo, kadangi augdami mikroorganizmai gali metabolizuoti susidariusius skilimo produktus.

Atliekant fermentinės poliuretano biodegradacijos tyrimus buvo naudojami komerciniai fermentai ir galimai poliuretaną skaidantis uretanazės genas, klonuotas į ekspresijos sistemas.

3.2.1. PU skaidymas komerciniais fermentais

Iki šiol nėra jokių komerciškai prieinamų fermentų, skirtų poliuretano skaidymui. Šiuo tyrimu buvo siekiama iš rinkoje esančių komercinių fermentų nustatyti gebančius skaidyti poliuretaną. Kaip minėta, tyrimuose naudojamų PDF tirpalų cheminė struktūra yra nežinoma, todėl buvo naudoti skirtingų aktyvumų fermentai, pasižymintys proteaziniu, celiulaziniu, lakaziniu, lipaziniu, peroksidaziniu ir α -glukanaziniu aktyvumu (2.2.6, 2.5 lentelė). Pirminis fermentų atrankos tyrimas buvo atliktas agarizuotose terpėse: sterilus 1,5 % agarų tirpalas papildomas 0,3 % PE-PU arba PES-PU, ir išpilstoma į Petri lėkštes. Sustingusiame agare su PDF padaromi šulinėliai ir įnešama po 10 μ l komercinių fermentų, laikoma kambario

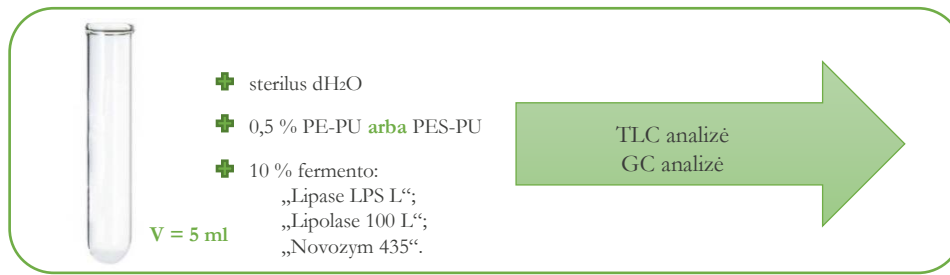
temperatūroje. Praėjus parai buvo matomos aiškios PES-PU praskaidrėjimo zonos ties fermentais Nr. 5 ir Nr. 6 (**3.7 pav.**). PE-PU nė vienas iš tirtų fermentų neskaidė (rezultatai nepateikiami).



3.7 pav. PES-PU biodegradacija komerciniais fermentais; 1 - Cathepsin C; 2 - Celluclean 5000 L; 3 - Laccase Lus Vilzim; 4 - Laccase Vilzim; **5 - Lipase LPS L**; **6 - Lipolase 100 L**; 7 - Novozym 51003; 8 - Promozyme D2; 9 - Peroxidase; 10 - Protease; 11 - Proteinase K.

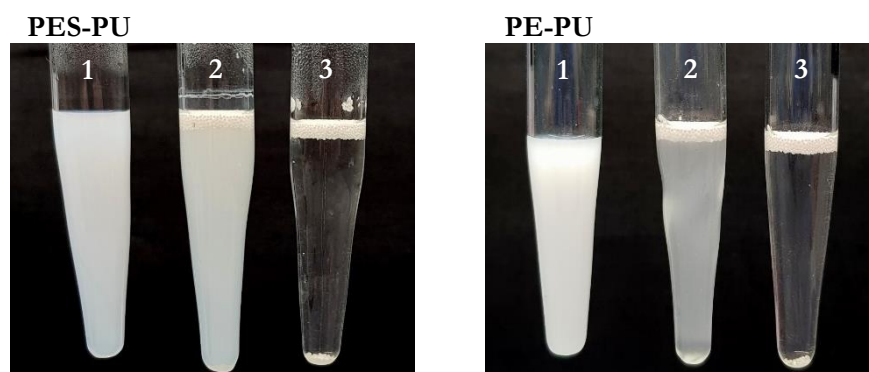
Taigi, buvo nustatyti du fermentai, galintys skaidyti PES-PU, tai lipazės „*Lipase LPS L*“ ir „*Lipolase 100 L*“. Taip pat į tyrimus buvo įtrauktas dar vienas lipaziniu aktyvumu pasižymintis fermentas – lipazė „*Novozym 435*“, kuri yra imobilizuota ant hidrofobinio akrilo dervos nešiklio. Imobilizuotas fermentas naudingas atliekant išsamesnius tyrimus, kadangi prieš analizę fermentą galima pašalinti ir taip išvengti papildomų signalų, būdingų fermentui. Fermentų specifikacijų dokumentuose apie šių fermentų pritaikymą PU skaidyme nėra nurodyta.

Lipazės (EC 3.1.1.3) yra fermentų grupė, katalizuojanti eilę skirtingų reakcijų, tarp jų hidrolizę, esterinimą, alkoholizę, aminolizę, peroksidaciją, epoksidaciją ir interesterifikaciją (Thirunavukarasu K. *ir kt.*, 2015). Tiriamos lipazės galimai vykdo hidrolizės reakciją, skaidant poliuretane esančias jungtis ir susidarant vandenyje tirpiems skilimo produktams, dėl ko terpėje su PES-PU matomos skaidrios zonos. Tačiau tam patvirtinti buvo reikalingas detalesnis tyrimas. Šiuo tikslu buvo atliktas didesnio masto fermentinio PDF skaidymo eksperimentas mėgintuvėliuose, naudojant „*Lipase LPS L*“, „*Lipolase 100 L*“ ir „*Novozym 435*“ lipazes (**3.8 pav.**). Buvo paruošti 0,5 % PE-PU ir PES-PU vandeniniai tirpalai, pridedama 10 % vieno iš fermentų. Bendras fermentinės reakcijos tūris - 5 ml. Kartu su eksperimentiniais mėginiais paruošiamos kontrolės, kuriose fermentai nenaudojami. Mėgintuvėliai buvo uždengiami ir inkubuojami purtyklėje 150 aps/min greičiu kambario temperatūroje. Buvo stebimas vizualus mėginių praskaidrėjimas, atliekamos TLC ir GC analizės.



3.8 pav. Fermentinio skaidymo mėgintuvėliuose tyrimo schema

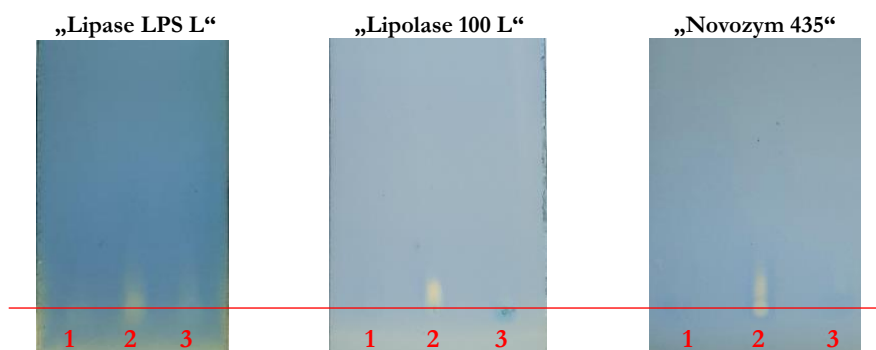
Po pirmųjų inkubacijos dienų, PE-PU ir PES-PU mėgintuvėliuose su fermentais „Lipase LPS L“ ir „Lipolase 100 L“, PDF dalelės agregavosi su fermentu ir nusėdo į mėgintuvėlio dugną. Dėl įvykusios agregacijos, tirpalo praskaidrėjimo vizualiai vertinti nebuvo galima (rezultatai nepateikiami). Mėgintuvėlyje su PES-PU ir imobilizuotu „Novozym 435“ fermentu, po 1 sav. inkubacijos buvo vizualiai matomas tirpalo skaidrėjimas. Taip pat pastebėtas greitas PE-PU su „Novozym 435“ tirpalo praskaidrėjimas: po 3 d. tirpalas tapo ženkliai skaidresnis. Praėjus ilgesniam inkubacijos laikui, šių mėginių praskaidrėjimas dar labiau išryškėjo, lyginant su kontroliniais mėgintuvėliais be fermento (**3.9 pav.**). Tačiau negalima drąsiai teigti, kad praskaidrėjimą lėmė įvykusi fermentinė poliuretano biodegradacija. Gali būti, kad PDF dalelės agregavosi prie „Novozym 435“ imobilizavimui naudotos dervos. Biffinger J.C. ir kt. (2015), savo darbe taip pat pastebėjo PES-PU dalelių agregaciją su fermentu. Tyrėjai norėdami detalesnės informacijos, atliko NMR ir FT-IR analizes, kuriomis patvirtino įvykusį biologinį PU skaidymą ir nustatė susidariusius skilimo produktus (Biffinger J.C. ir kt., 2015). Taigi, akivaizdu, kad vizualus stebėjimas nėra pats efektyviausias būdas poliuretano degradacijai tirti. Remiantis gautais rezultatais buvo keliamos dvi hipotezės: veikiant fermentams vyksta PDF biodegradacija arba PDF dalelės agreguojasi prie „Novozym 435“ imobilizavimui naudotos dervos.



3.9 pav. Fermentinė PES-PU ir PE-PU biodegradacija skystoje terpėje po 14 dienų inkubacijos: **1** - 0,5 % PDF; **2** - 0,5 % PDF + „Novozym 435“; **3** - H₂O + „Novozym 435“;

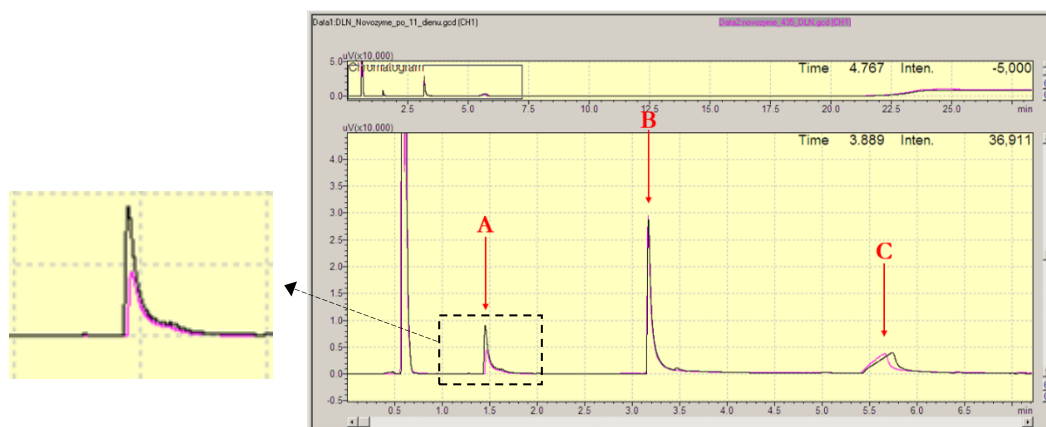
Siekiant patvirtinti ar paneigti įvykusią PDF degradaciją, buvo atliktos TLC ir GC analizės, kurių metu buvo nustatomi galimai susidarę vandenyje tirpūs skilimo produktai. Mėginiai buvo paruošti centrifuguojant, po to supernatantą filtruojant pro sterilų 0,2 μm filtrą, taip pašalinant

PDF daleles, ir gautą vandeninę fazę ekstrahuojant chloroformu. Remiantis literatūros duomenis, dažniausiai kaip poliuretano skilimo produktas yra identifikuojama adipo rūgštis (Nakajima-Kambe T. *ir kt.*, 1997; Akutsu Y. *ir kt.*, 1998; Shan Z. *ir kt.*, 2013). Todėl TLC analizės metu, plokštelė buvo dažoma naudojant bromkrezolio žaliojo dažą (2.3.9). Šis dažymo būdas skirtas karboksirūgštims nustatyti ir yra pagrįstas pH skirtumu: mėlyna spalva rodo neutralų pH, o gelsva - rūgštinį pH. **3.10 paveiksle** pateikti TLC analizės rezultatai po fermentinio PES-PU skaidymo lipazėmis. Raudona linija žymi mėginių užnešimo ribą. Visuose takeliuose Nr. 1 nebuvo jokio signalo, kurį duotų vandeninis PES-PU tirpalas. Takeliuose Nr. 2 buvo matomos gelsvos zonos, parodančios rūgštinių junginių susidarymą. Skystų lipazių „*Lipase LPS L*“ ir „*Lipolase 100 L*“ takeliuose Nr. 3, matomi neryškūs signalai, kuriuos suteikia patys fermentų mėginiai. Imobilizuotos „*Novozym 435*“ lipazės trečiasis takelis, kaip ir tikėtasi, nedavė jokio signalo. Taigi, TLC analizės metu užfiksuotų rūgštinių junginių susidarymas, rodo galimai įvykusią PES-PU hidrolizę.



3.10 pav. TLC analizės rezultatai po fermentinio skaidymo: **1** – 0,5 % PES-PU tirpalas; **2** – 0,5 % PES-PU + 10 % fermento tirpalas; **3** – 10 % fermento tirpalas;

Atlikus GC analizę (2.3.10), buvo patvirtintas tirtų lipazių dalyvavimas PES-PU skaidyme. Po PES-PU skaidymo „*Lipase LPS L*“, „*Lipolase 100 L*“ ir „*Novozym 435*“ lipazėmis, GC tyrimo metu buvo užfiksuotos smailės, kurios nenustatytos kontroliniuose mėginiuose (**3.11 pav.**). Po kiekvienos fermentinės reakcijos buvo identifikuotos trys smailės, rodančios įvykusią PES-PU degradaciją (**3.11 pav. A, B, C**). Be to, veikiant skirtingomis lipazėmis, gautų smailių išėjimo laikai sutampa. Tai reiškia, kad šios lipazės specifiskai hidrolizuoja tas pačias PES-PU jungtis. Nustatyta, kad su „*Novozym 435*“ lipaze, po ilgesnio inkubacinio laiko, t.y. pratęsus fermentinę reakciją nuo 5 iki 11 dienų, A smailė išauga beveik du kartus (**3.11 pav. A**). Tačiau, GC analizės metu gauti rezultatai nepatvirtino įvykusios PE-PU biodegradacijos. Vadinasi, PE-PU neskaidė nė vienas iš tirtų lipaziniu aktyvumu pasižyminčių fermentų. O vizualiai matomą praskaidrėjimą „*Novozym 435*“ lipazės atveju, galimai sukėlė PE-PU dalelių agregacija prie fermento imobilizavimui naudotos dervos.



3.11 pav. GC analizės rezultatai po fermentinio PES-PU skaidymo „Novozym 435“ lipaze; rausva spalva – po 5 d. fermentinės reakcijos; juoda spalva - po 11 d. fermentinės reakcijos

Fermentinės biodegradacijos metu susidarę skilimo produktai priklauso nuo pradinės cheminės poliuretano struktūros, kuri gali būti labai įvairi. Literatūroje pateikiama informacija, kad be adipo rūgšties gali susidaryti ir kiti junginiai, tokie kaip etilenglikolis, dietilenglikolis, ftalio rūgšties anhidridas, glutaro rūgštis, gintaro rūgštis¹⁵ (Nakajima-Kambe T. *ir kt.*, 1997; Shan Z. *ir kt.*, 2013). Šie tirpalai buvo paruošti (2.2.11) ir po 1 μ l mėginio leista į dujų chromatografą, tikintis identifikuoti susidariusias smailes. Tačiau nė viena iš šių junginių gautų smaيليų nesutapo su fermentinio skaidymo metu susidariusiomis smailėmis (rezultatai nepateikiami). Sėkmingai nustatčius fermentinės reakcijos produktus, būtų galima kiekybiškai įvertinti susidariusių skilimo produktų koncentraciją.

Šiame etape, dėl susidariusios COVID-19 situacijos, tyrimas buvo nutrauktas. Siekiant identifikuoti PES-PU fermentinės biodegradacijos metu susidariusius skilimo produktus, planuose buvo atlikti GC-MS analizę, kuri leistų ne tik identifikuoti susidariusias medžiagas, bet ir įvertinti jas kiekybiškai. Dėl nebaigto tyrimo sunku apibendrinti fermentinės biodegradacijos mechanizmą. Manoma, kad alkoholių ir karboksirūgščių susidarymas patvirtintų minkštajame segmente esančių poliolio esterinių grupių hidrolizę, o specifinių aminių aptikimas reikštų įvykusį uretaninės jungties skilimą (Magnin A. *ir kt.*, 2019). Atsižvelgiant į tai, kad uretaninė jungtis yra būdinga visiems poliuretanams, tačiau PE-PU šios lipazės neskaidė, manoma, kad PES-PU skaidymas vyko hidrolizuojant esterines jungtis, esančias minkštajame segmente.

3.2.2. Rekombinantinė uretanazė

Šiame etape buvo tiriama transformuota *E. coli*, skirta kietajame segmente esančios uretaninės jungties skaidymui. Tai palanku, kadangi uretaninės jungtys sudaro tiek PE-PU, tiek

¹⁵https://ebrary.net/14325/environment/polyester_polyol_building_blocks?fbclid=IwAR2WJX5f16Dzrn1tRW7sEP2itKtN3TikfPQow4sLnhGnLJwEmEkPSh6ryf0

PES-PU pagrindą. Kaip galimai PU degraduojantis fermentas pasirinkta uretanazė, kuri hidrolizuoja nepeptidinius C-N ryšius.

Pirmiausia NCBI nr/nt duomenų bazėje buvo surasta pilna, 1419 bp ilgio, *Lysinibacillus fusiformis* (KU353448.1) uretanazės geno seka. Pagal šią seką sukurta pradmenų pora P564/P565 (2.2.5), kuri skirta uretanazės geno pagausinimui iš TBS mikroorganizmų kolekcijoje esančios *Lysinibacillus* sp. gDNR. Vėliau tikslinis uretanazę koduojantis genas buvo įterpiamas į pLATE11 ir pET28-MBP-TEV plazmidinius vektorius (2.2.2). Paruošti konstruktai buvo transformuojami į *E. coli* BL21(DE3) raiškos kamieną (2.2.2).

pLATE11 plazmidinis vektorius

Remiantis gamintojo aprašymu, pLATE vektoriai yra skirti efektyviam, greitam ir ligavimo stadijos nereikalaujančiam tikslinių fragmentų įterpimui. Operatoriai „*lac*“, terminatorius „*rrnBT1-T2*“ ir promotorius „*Tet*“ lemia kontroliuojamą tikslinio geno raišką. Didelę pLATE bakterinių vektorių ekspresuojamų baltymų išėigą lemia bakteriofago T7 promotorius. Induktoriumi naudojant IPTG, T7 RNR polimerazė yra ekspresuojama ląstelėje ir prasideda genų transkripcija pagal T7 promotorių. Jei mitybinėje terpėje nėra induktoriaus, pLATE sistemos promotorius neveikia ir nevyksta įterpto tikslinio geno raiška. Turimas β-laktamazės genas transformantams suteikia atsparumą ampicilinui ir palengvina jų selekciją¹⁶.

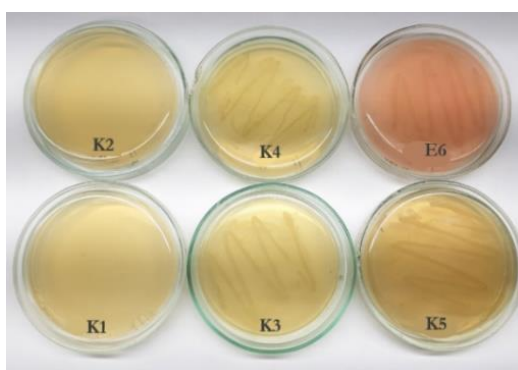
Ankstesniame darbe, naudojant pLATE11 plazmidinį vektorių, buvo paruošta transformuota *E. coli* BL21(DE3) su įterptu uretanazės genu. (2.3.11-2.3.15). Transformuotos *E. coli* BL21(DE3) ląstelės auginamos agarizuotoje LB terpėje su ampicilinu ir IPTG. Šiame tyrimo etape buvo patikrintas sukurtos fermentinės *E. coli* sistemos uretanazinis aktyvumas Petri lėkštelėse (2.3.23). Terpėje etilkarbamatas, turintis vieną uretaninę jungtį, buvo naudojamas kaip mažos molekulinės masės substratas uretanazei. Šiam fermentui hidrolizuojant uretaninę C-N jungtį, išsiskiria amoniakas, sukeliantis terpės pH sumažėjimą, kuris sąlygoja terpėje esančio fenolftaleino spalvos pokytį. Taip pat buvo paruoštos kontrolinės lėkštelės, leidžiančios stebėti ar natūralūs procesai nesukelia terpės pH pokyčio (**3.12 pav.**):

- lėkštelė be etilkarbamato, neužsėta (**K1**);
- lėkštelė su etilkarbamatu, neužsėta (**K2**);
- lėkštelė be etilkarbamato, užsėta netransformuota *E. coli* BL21(DE3) (**K3**);
- lėkštelė su etilkarbamatu, užsėta netransformuota *E. coli* BL21(DE3) (**K4**);
- lėkštelė be etilkarbamato, užsėta transformuota *E. coli* BL21(DE3) (**K5**);

Kontrolė *K1* leidžia stebėti, ar inkubuojant ilgą laiką nekinta pačios terpės pH. *K2* naudojama patikrinti, ar etilkarbamatas neskyla terpėje sukeldamas pH pokytį. Kontrolinės *K3* ir *K4*

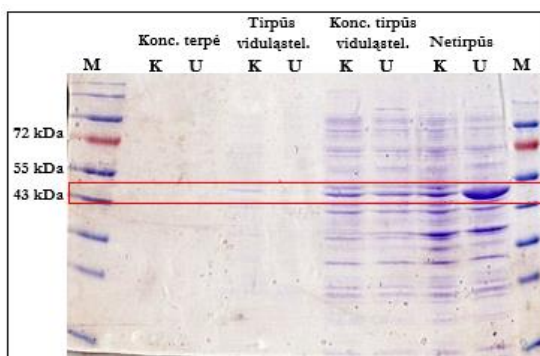
¹⁶ <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1241#/K1241>

lėkštelės leidžia įvertinti, ar netransformuota *E. coli* BL21(DE3) daro įtaką terpės pH kitimui. K5 lėkštelėje patikrinamas transformuotos *E. coli* BL21(DE3) augimo poveikis terpės pH, kai nėra etilkarbamato. E6 – tai eksperimentinė lėkštelė, kurioje buvo stebimas transformuotos *E. coli* uretazinis aktyvumas, skaidant terpėje esantį substratą. Transformuota *E. coli* BL21(DE3) buvo auginama K5 ir E6 lėkštelėse, kurios papildytos ampicilino tirpalu (2.2.17). Po paros, užaugus ląstelėms, siekiant indukuoti tikslių baltymų raišką, buvo užliejamas plonas agarų tirpalas su IPTG sluoksniu. Kontrolinėse lėkštelėse K1-K5 terpėje esančio fenolftaleino spalva nekito. Eksperimentinėje lėkštelėje (E6) terpės spalva pasikeitė. Spalvos pokytis reiškia įvykusią etilkarbamato uretaninės jungties hidrolizę (3.12 pav.). Taigi, buvo įrodyta, kad sukurta transformuotos *E. coli* BL21(DE3) fermentinė sistema pasižymėjo uretaziniu aktyvumu.



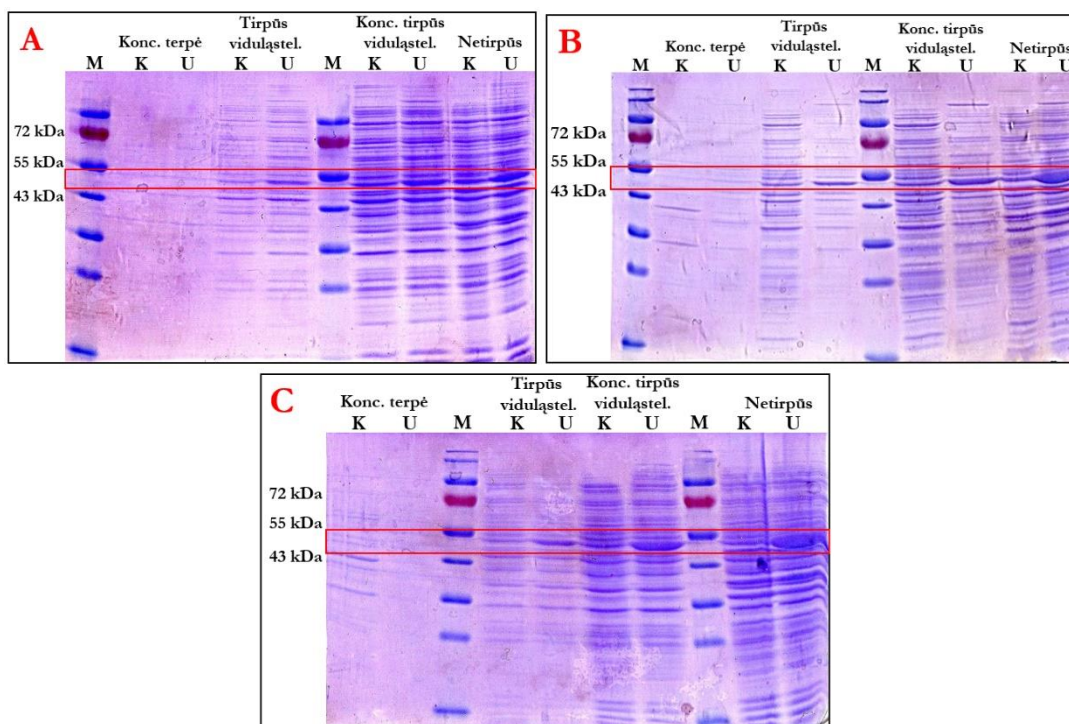
3.12 pav. Uretazinio aktyvumo nustatymas. K1-K5 kontrolinės lėkštelės, E6-eksperimentinė lėkštelė su transformuota *E. coli* BL21(DE3)

Išsiaiškinus, jog rekombinantinė uretazė yra aktyvi, toliau buvo atliktas transformuotos *E. coli* BL21(DE3) baltymų raiškos tyrimas. Uretazės geno raiška vykdyta pagal naudotos pLATE11 plazmidės gamintojo nurodymus, t.y., esant 1 mM IPTG koncentracijai 37 °C temperatūroje 3 val (2.3.16). Surinkta užaugusių ląstelių biomasė buvo ardoma stiklo rutuliukais (2.3.17). Tuomet atskirtos tirpių ir netirpių viduląstelinųjų baltymų frakcijos (2.3.18). Augimo terpė ir tirpūs viduląsteliniai baltymai buvo koncentruojami, naudojant 30 kD koncentruojamuosius mėgintuvėlius (2.3.19): augimo terpė koncentruota 20 kartų, o tirpūs viduląsteliniai baltymai - 6 kartus. Tomis pačiomis sąlygomis buvo atliktas netransformuotos *E. coli* BL21(DE3) auginimas. Netransformuota *E. coli* BL21(DE3) naudojama kaip neigiama kontrolė, kuriai nebūdingas uretazės genas. Atlikus NDS-PAGE baltymų gelio analizę denatūruojančiomis sąlygomis (2.3.21), buvo matomas 51 kDa dydžio rekombinantinis baltymas, lokalizuotas transformuotos *E. coli* BL21(DE3) netirpių baltymų frakcijoje (3.13 pav.).



3.13 pav. Baltymų frakcijų analizė NDS-PAGE gelyje, esant 1 mM IPTG konc., 37 °C temp., 3 val sąlygoms. **K** – netransformuota *E. coli* BL21(DE3), **U** – transformuota *E. coli* BL21(DE3) su uretanazės genu, **M** – molekulinės masės standartas

Taigi, pagal plazmidės gamintojo nurodytas sąlygas, buvo sėkmingai gautas rekombinantinis uretanazės baltymas. Toliau buvo nuspręsta atlikti išsamesnį uretanazės geno raiškos tyrimą, siekiant optimizuoti tirpaus baltymo ekspresiją. Yra žinoma, kad tirpaus rekombinantinio baltymo gamybai *E. coli* sistemoje įtakos gali turėti temperatūra ir trukmė. Žemesnėje temperatūroje gyvybiniai ląstelių procesai sulėtėja, dėl to sumažėja transkripcijos, translacijos ir ląstelių dalijimosi greitis, tuo pačiu sumažėja baltymų agregacija. Mažesnė induktoriaus koncentracija taip pat gali padidinti tirpių baltymų gamybą (Francis D.M. ir Page R., 2010). Todėl indukcija buvo atlikta žemesnėje temperatūroje (**3.14 pav. A**), ilgesnį laiką (**3.14 pav. B**) ir mažinant IPTG koncentraciją iki 0,1 mM (**3.14 pav. C**). Šių parametru keitimo tikslas buvo padidinti tirpios ir aktyvios rekombinantinės uretanazės ekspresiją.



3.14 pav. Baltymų frakcijų analizė NDS-PAGE gelyje, esant **A:** 1 mM IPTG konc., 25 °C temp., 3 val; **B:** 1 mM IPTG konc., 25 °C temp., 18 val; **C:** 0,1 mM IPTG konc., 25 °C temp., 18 val. **K** – netransformuota *E. coli* BL21(DE3), **U** – transformuota *E. coli* BL21(DE3) su uretanazės genu, **M** – molekulinės masės standartas

NDS-PAGE gelyje matoma, kad didžiausia tirpaus viduląstelinio rekombinantinio baltymo ekspresija buvo gauta esant 0,1 mM induktoriaus koncentracijai, ląsteles auginant ilgesnį laiką žemesnėje temperatūroje (**3.14 pav. C**). Tačiau buvo būtina patikrinti ar ši sintetinė uretanazė yra aktyvi. Skirtingų baltymų frakcijų uretanazinis aktyvumas buvo tirtas Berthelot reakcija (2.3.22). Berthelot reakcijos metu yra įvertinamas amoniako kiekis, kuris susidaro fermentinės reakcijos metu, skaidant uretaninę jungtį. Berthelot reakcijos metu amoniakas reaguoja su hipochloritu, o susidaręs monochloraminas reaguoja su fenoliu. Taip gaunamas benzokinono chloraminas, kuris toliau reaguodamas su fenoliu sudaro mėlynos spalvos indofenolį, kuris gali būti stebimas spektrofotometriškai. Naudojamas natrio nitrofericianido dihidratas pagreitina šią reakciją. Fermentinio aktyvumo vienetas (U) apibūdinamas kaip fermento kiekis, reikalingas suskaidyti etilkarbamatai iki 1 μmol amoniako, per 1 min, esant atmosferiniam slėgiui 37 °C temperatūroje, kai pH 7,0. Pasitelkiant Berthelot metodą, buvo nustatyta, kad didžiausias rekombinantinio baltymo uretanazinis aktyvumas gaunamas geno raišką vykdant B sąlygomis, t.y. žemesnėje temperatūroje ir ilgesnį laiką (**3.4 lentelė B**). Tačiau šiomis sąlygomis, tik dalis rekombinantinės uretanazės pereina į tirpių baltymų frakciją, didžioji tikslinio baltymo dalis išlieka ląstelių nuolaužų frakcijoje. Taigi, buvo daroma išvada, kad optimalios uretanazės geno raiškos sąlygos, gaunant aktyvų baltymą, yra esant 1 mM IPTG koncentracijai, 25 °C temperatūrai ir indukciją vykdant 18 val.

3.4 lentelė. Uretanazinis aktyvumas nustatytas Berthelot reakcija*, U/mg

Geno raiškos sąlygos	Ląstelių baltymų frakcija		
	Tirpūs viduląst. baltymai	Konc. tirpūs viduląst. baltymai	Netirpūs viduląst. baltymai
1 mM IPTG konc., 37 °C temp., 3 val	0,15	0,85	3,22
A: 1 mM IPTG konc., 25 °C temp., 3 val	-	-	0,40
B: 1 mM IPTG konc., 25 °C temp., 18 val	1,38	0,82	4,44
C: 0,1 mM IPTG konc., 25 °C temp., 18 val	0,36	0,08	2,14

*Atlikti trys pakartojimai, santykinis standartinis nuokrypis neviršijo 5 %

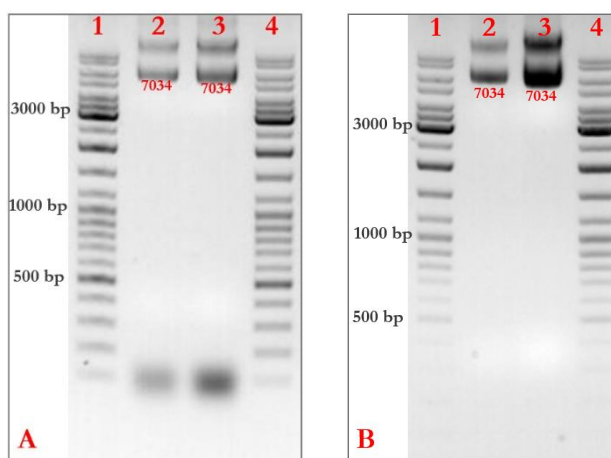
Sekančiame tyrimo etape buvo patikrintas transformuotos *E. coli* BL21(DE3) gebėjimas tiesiogiai skaidyti agarizuotoje terpėje esantį PDF. Transformuota *E. coli* BL21(DE3) buvo auginama agarizuotose MSM ir MSM+N terpėse su 0,3 % PDF tirpalo ir ampicilinu 37 °C temperatūroje (2.2.4). Ląstelėms užaugus, ant terpės buvo užliejamas plonas sluoksnis agaro tirpalo su 1 mM IPTG. Vėliau Petri lėkštelės buvo inkubuojamos 25 °C temperatūroje. Kaip neigiama kontrolė naudotas *E. coli* BL21(DE3) kamienas. Tačiau, net po ilgesnio nei 2 sav. inkubacinio periodo, poliuretano skaidymo zonos nesusidarė. Todėl buvo nuspręsta atlikti detalesnį tyrimą, kurio metu buvo patikrintas skirtingų rekombinantinės *E. coli* BL21(DE3) baltymų frakcijų gebėjimas skaidyti poliuretana. Ląstelės buvo suardytos (2.3.17), atskirtas grubus lizatas, tirpūs viduląsteliniai baltymai ir netirpūs viduląsteliniai baltymai (2.3.18). Agare

su 0,3 % PDF buvo padaromi šulinėliai ir įnešama po 15 μ l lizato. Tačiau nei viena frakcija neparodė vizualiai pastebimo praskaidrėjimo. Prieš tai atlikto eksperimento su terpėje esančiu etilkarbamatu rezultatai patvirtino, kad transformuota *E. coli* BL21(DE3) geba skaidyti mažamolekulinių junginių uretaninę jungtį (**3.12 pav.**). Šio tyrimų etapo metu gauti rezultatai, leidžia daryti prielaidą, kad viduląstelinė rekombinantinė uretanazė, negali pasiekti poliuretano kristaliniame segmente esančios uretaninės jungties ir sukelti jos skilimo. Todėl buvo nuspręsta pabandyti kitą plazmidinį vektorių, skirtą didesnei tirpaus rekombinantinio baltymo sintezei ir jo ekspresijai.

pET28-MBP-TEV plazmidinis vektorius

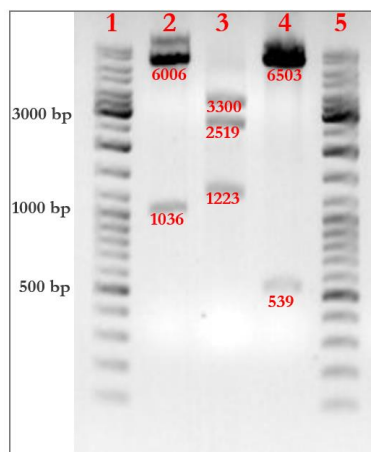
pET28-MBP-TEV vektoriaus pagrindą sudaro pET28 plazmidė, kuri yra modifikuota prijungiant MBP (*angl.* Maltose Binding Protein) ir TEV (*angl.* Tobacco Etch Virus) fragmentus. Įterpus norimo geno seką plazmidiniame vektoriuje gaunamas konstruktas, kuriame yra MBP, TEV proteazė ir tikslinis baltymas. MBP žyma skirta baltymų ekspresijai į citozolį arba periplazmą. Be to, MBP laikoma viena veiksmingiausių sintezės žymų, skatinančių baltymų tirpumą. Galiausiai, kai baltymas susintetinamas, MBP gali būti pašalinamas naudojant TEV proteazę, kuri skirta žymės pašalinimui nuo rekombinantinių baltymų *in vitro* ir *in vivo* (Francis D.M. ir Page R., 2010). Taigi, tokia sukonstruota sistema, tikėtina, turėtų būti efektyvi tirpios rekombinantinės uretanazės ekspresijai.

Pirmiausia buvo pagausinta pET28-MBP-TEV plazmidė: paruoštos kompetentinės *E. coli* DH5 α ląstelės (2.3.11), atlikta transformacija temperatūriniu šoku (2.3.12), pDNR išskirta šarminės lizės metodu (2.3.13). Buvo atlikta DNR elektroforezė gelyje, tikintis gauti 7034 bp fragmentą (**3.15 pav. A**). Vėliau, išskirta pDNR nuo RNR priemaišų buvo išvalyta, naudojant PEG8000/MgCl₂ tirpalą (2.3.14) (**3.15 pav. B**).



3.15 pav. DNR elektroforezė gelyje: **A** - Po šarminės lizės; **B** - Po valymo PEG8000/MgCl₂. **1, 4** - DNR dydžio standartas; **2** – 1 μ l plazmidės mėginio.; **3** – 2 μ l plazmidės mėginio

Siekiant įsitikinti ar teisingai išskirta pDNR, buvo atlikta restrikcinė analizė (2.3.15), naudojant *NcoI*, *MluI*, *PvuI* ir *BglIII* restrikcijos endonukleazes. Jei plazmidė buvo išskirta tinkamai, restriktuojant su *NcoI*, turėjo būti gaunami 6006 bp ir 1036 bp fragmentai, restriktuojant su *MluI* ir *PvuI* – 3300 bp, 2519 bp, 1223 bp fragmentai, o su *BglIII* – 6503 bp ir 539 bp fragmentai. Restrikcinė analizė patvirtino, kad plazmidė buvo išskirta teisingai, kadangi buvo gauti visi teoriškai apskaičiuoti fragmentai (**3.16 pav.**).



3.16 pav. DNR elektroforezė po restrikcinės analizės: **1, 5** - DNR dydžio standartas; **2** – *NcoI*; **3** – *MluI*+*PvuI*; **4** – *BglIII*

Toliau buvo užsakyti specifiniai P615 ir P616 pradmenys (2.2.5), kurie skirti uretanazės geno iš *Lysinibacillus* sp. įterpimui į pET28-MBP-TEV plazmidę PGR metodu (2.3.6). Atlikus šias paruošiamąsias procedūras, darbą teko sustabdyti dėl susidariusios COVID-19 situacijos ir šalyje paskelbto karantino. Taigi, reikalingi tolimesni tyrimai, tikintis gauti fermentinę *E. coli* sistemą, kurioje tikslinis uretanazės baltymas būtų ekspresuojamas tirpioje būsenoje. Be to, kaip ir pLATE11 vektoriaus atveju, gali būti reikalingas tikslinio geno raiškos optimizavimas, siekiant gauti aktyvią rekombinantinę uretanazę, gebančią skaidyti terpėje esantį poliuretaną.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šio darbo metu, išanalizavus kitų mokslinių tyrimų rezultatus, buvo pasirinkta naudoti selektyvias MSM ir MSM+N terpės su poliuretanu (Nakajima-Kambe T. ir kt., 1995; Nair S. ir Kumar P., 2007; Peng Y.H. ir kt., 2014). Naudojantis šiomis terpėmis, buvo sėkmingai izoliuoti mikroorganizmai skaidantys poliuretaną, tarp kurių buvo identifikuoti *Paenibacillus* sp. ir *Stachybotrys* sp. genčių atstovai, kurie pirmą kartą šiame darbe minimi kaip gebantys degraduoti PES-PU. Poliuretano mikrobiologinės biodegradacijos mechanizmas vis dar nėra visiškai ištirtas, nors literatūroje pateikiama vis daugiau tyrimų, kurių metu bandoma išsiaiškinti degradacijos vyksmus. Dėl tyrimų gausos, atrandami vis nauji poliuretano skaidantys mikroorganizmai. Bakterijos ir grybai, kurie nustatyti kaip gebantys skaidyti poliuretano, apibendrinti Priede Nr. 2 pateiktoje lentelėje. Svarbu atkreipti dėmesį, jog mikroorganizmai naudoja skirtingus poliuretano substratus, t.y. PES-PU ir PE-PU kilmės poliuretano dangas arba putas. Žinoma, kad poliuretanoi gali būti labai įvairios kompozicijos: poliuretano tirpalai, naudojami dangoms, lanksčios ar standžios putos. Skirtinga PU cheminė struktūra sąlygoja hidrolizei jautrių jungčių kiekį bei mikroorganizmų ir jų ekspresuojamų fermentų prieinamumą prie substrato. Taigi, poliuretano cheminės struktūros įvairovė apsunkina PU biodegradacijos tyrimus, kadangi skirtingos struktūros poliuretanų biologinio skaidymo mechanizmas gali skirtis.

Fermentinės poliuretano degradacijos tyrimų etape, buvo nustatyti komerciniai fermentai „*Lipase LPS L*“, „*Lipolase 100 L*“ ir „*Novozym 435*“ dalyvaujantys PES-PU depolimerizavime. Pratęsus fermentinio poliuretano skaidymo tyrimus ir nustačius susidarius PU skilimo produktus, juos būtų galima vėl panaudoti procesuose, pvz., to pačio PU sintezėje. Be to, tyrimus galima vykdyti ir kita linkme, t.y. naudoti kelių fermentų kokteilių tirpalus, pasižyminčius skirtingu fermentiniu aktyvumu. Pavyzdžiui, *Magnin A. ir kt. (2019)* nustatė, kad poliuretano veikiant esteraze vyksta minkštajame segmente esančių esterinių jungčių hidrolizė, dėl ko išsiskiria mažos molekulinės masės molekulės, turinčios uretano ryšius, kurios vėliau yra hidrolizuojamos amidaze. Toks tyrimas taip pat galimas derinant fermentus, pasižyminčius skirtingais fermentiniais aktyvumais, pvz., lipaziniu, ureaziniu, proteaziniu.

Literatūroje pateikiama labai mažai rekombinantinės uretanazės tyrimų. Įprastai autoriai vykdo poliuretanazių, tokių kaip esterazės ar lipazės, tyrimus, kurių metu šių poliuretano skaidančių fermentų genai klonuojami į raiškos sistemas (Stern R.V. ir kt., 2000; Howard G.T. ir kt., 2001; Akutsu Y. ir kt., 1998). Šiame darbe ištirta *E. coli* su heterologiniu uretanazės genu ir nustatyta, kad rekombinantinė uretanazė yra aktyvi skaidant mažamolekulinių junginių uretaninę jungtį, tačiau PU esančios uretaninės jungties neskaido. Be to, keičiant indukcijos

parametrus, dalis rekombinantinės uretanazės iš netirpios formos pereina į tirpią. Taigi, reikalingi išsamesni tyrimai, siekiant gauti aktyvią rekombinantinę uretanazę, tiesiogiai vykdančią kietajame poliuretano segmente esančios uretaninės jungties depolimerizavimą. Tikimasi, jog tokia uretanazė bus aktyvi tiek PES-PU, tiek PE-PU skaidyme.

Skirtingais šio darbo etapais gauti rezultatai, patvirtina literatūroje pateikiamą informaciją, kuria teigiama, kad PES-PU jautresnis mikroorganizmų ir fermentų poveikiui, nei PE-PU. Akivaizdu, kad poliuretano cheminė struktūra yra pagrindinis veiksnys turintis įtakos jo biologiniam skaidymui. Reikalingi tolimesni poliuretano degradacijos tyrimai, apimantys platų skirtingos struktūros poliuretanų spektrą. Sėkmingai įvykdžius šiuos tyrimus, gali būti sukurti tvarūs, aplinkai saugūs poliuretano atliekų perdirbimo ar jų pakartotinio naudojimo procesai. Idealiu atveju būtų galima poliuretano atliekas paversti cheminiais junginiais, turinčiais pridėtinę vertę.

IŠVADOS

1. Izoluoti ir identifikuoti aštuoni bakterijų kamienai, gebantys augti ant polieterinio poliuretano, ir trys mikroorganizmai, viena bakterija ir du grybai, skaidantys poliesterinį poliuretaną. Vieno iš identifikuotų mikroorganizmų *Kocuria* sp. 16S rRNR geno seka patalpinta NCBI GenBank duomenų bazėje (prieigos numeris MN038066).
2. Nustatyta, kad komercinės lipazės „*Lipase LPS L*“, „*Lipolase 100 L*“ ir „*Novozym 435*“ geba skaidyti poliesterinį poliuretaną.
3. Atlikus uretanazės geno raiškos tyrimus *E. coli* BL21(DE3) kamienne, nustatyta, kad didžioji dalis rekombinantinio baltymo yra lokalizuota ląstelių nuolaužų frakcijoje. Keičiant indukcijos parametrus (vykdant geno raišką esant 1 mM IPTG konc. 25 °C temp., 18 val sąlygoms), dalis rekombinantinio baltymo perėjo į tirpių baltymų frakciją, kurioje nustatytas uretanazinis aktyvumas buvo 1,38 U/mg.

REZULTATŲ SKLAIDA

Konferencijos:

Ž. Deksnytė, J. Krutkevičius I. Matijošytė, R. Šiekštelė. *Biodegradation of Polyurethane*, 2020.02.25-2020.02.27 The Coins 2020, Vilnius, Lietuva, *stendinis pranešimas*, <https://thecoins.eu/wp-content/uploads/2020/02/abstract-book-word-2020.pdf>

J. Krutkevičius, A. Veteikytė, R. Šiekštelė, Ž. Deksnytė, I. Matijošytė. *Degradation of Polyether Polyurethane by Soil Bacteria*, 2019.02.26-2019.02.28 The Coins 2019, Vilnius, Lietuva, *stendinis pranešimas*; <https://thecoins.eu/wp-content/uploads/2019/02/Abstract-book-of-The-COINS-2019-1.pdf>

J. Krutkevičius, A. Veteikytė, R. Šiekštelė, Ž. Deksnytė, I. Matijošytė. *Investigation of Microbial and Enzymatic Degradation of Polyether Polyurethane*, 2019.07.7-2019.07.11 Biotrans2019, Groningenas, Nyderlandai, *stendinis pranešimas pristatytas*;

PADĖKA

Nuoširdžiai norėčiau padėkoti VU Biotechnologijos instituto Taikomosios biokatalizės sektoriaus kolektyvui už draugišką darbo aplinką, pagalbą ir patarimus. Ypatingai dėkinga esu darbo vadovei dr. Ingai Matijošytei už kantrybę, atsidavimą ir suteiktas žinias. Taip pat norėčiau padėkoti Jokūbui Krutkevičiui ir Rimantui Šiekštelei už visokeriopą pagalbą ir atsakymus į visus iškilusius klausimus.

Linkiu sėkmės ateities darbuose.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INTITUTAS

Žydrūnė Deksnytė

Magistro baigiamasis darbas

Poliuretano degradacijos biotechnologiniais metodais tyrimas

SANTRAUKA

Plastiko atliekų tvarkymas ir jų perdirbimas yra vienas didžiausių XXI amžiaus iššūkių. Tarp plačiai naudojamų plastikų, poliuretanai, pagal gamybos kiekius, yra penktoji plastikų rūšis Europoje ir septintoji pasaulyje. Iki šiol jokie perdirbimo procesai neleidžia veiksmingai pakartotinai naudoti poliuretano atliekų dėl didelio jų atsparumo ir neefektyvių perdirbimo metodų. Todėl ieškoma naujų perdirbimo sprendimų, siekiant nutraukti poliuretano atliekų kaupimąsi sąvartynuose ar jų deginimą. Vienas iš plačiai tiriamų poliuretano perdirbimo būdų, siekiant sukurti aplinką tausojančią technologiją, yra biodegradacija. Biodegradacija, tai biotechnologiniais metodais paremtas skaidymas, kurį vykdo mikroorganizmai ir/ar jų išskiriami fermentai.

Šio darbo tikslas - ištirti poliuretano degradaciją biotechnologiniais metodais. Darbo metu vykdoma poliuretano skaidančių mikroorganizmų paieška ir jų identifikavimas. Taip pat tiriamas komercinių fermentų ir rekombinantinės uretanazės gebėjimas skaidyti poliuretano.

Tyrimo metu buvo izoliuoti ir pagal 16S rRNR ir ITS genų sritis identifikuoti aštuoni bakterijų kamienai, gebantys augti ant polieterinio poliuretano ir trys – viena bakterija ir du grybai – skaidantys poliesterinį poliuretano. Poliesterinio poliuretano skaidytojai *Paenibacillus* sp. ir *Stachybotrys* sp. genčių nariai, pirmą kartą šiame darbe minimi kaip gebantys skaidyti poliuretano. Atliekant fermentinės degradacijos tyrimus, GC analizės metu nustatyta, kad komercinės lipazės „*Lipase LPS L*“, „*Lipolase 100 L*“ ir „*Novozym 435*“ geba depolimerizuoti poliesterinį poliuretano. O atlikus uretanazės geno raiškos tyrimus *E. coli* BL21(DE3) kamienne, NDS-PAGE analize nustatyta, kad rekombinantinis baltymas lokalizuotas ląstelių nuolaužų frakcijoje. Keičiant indukcijos parametrus (vykdant geno raišką 1 mM IPTG konc. 25 °C temp., 18 val sąlygomis) dalis rekombinantinio baltymo pereina į tirpių baltymų frakciją.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Žydrūnė Deksnytė

Master thesis

Investigation of Polyurethane Degradation by Biotechnological Methods

SUMMARY

Management and recycling of plastic waste are one of the greatest challenges of the 21st century. Polyurethane (PU), in terms of production volumes, is the 5th plastic in Europe and the 7th in the world. To date, there is no recycling processes to integrate efficient reuse of polyurethane waste due to its high resilience and inefficient recycling methods. Therefore, new PU waste management solutions are being sought-after to stop the accumulation of polyurethane waste in landfills and its incineration. In order to create environmentally friendly technology, one of the studied methods of recycling polyurethane is biodegradation. Biodegradation is based on biotechnological methods during which the breakdown of polyurethane is performed by microorganisms and/or its secreted enzymes.

The aim of the thesis is to investigate the degradation of polyurethane by biotechnological methods. During the study, the search for polyurethane-degrading microorganisms and their identification was carried out. The ability of commercial enzymes and recombinant urethanase to degrade polyurethane was also explored.

During this study, eight bacterial strains capable of growing on polyether polyurethane and three – one bacterium and two fungi – degrading polyester polyurethane were isolated and identified according to the 16S rRNA and ITS gene regions. For the first time, *Paenibacillus* sp. and *Stachybotrys* sp. were identified as degrading polyester polyurethane. During the enzymatic degradation studies, GC analysis showed that the commercial lipases “*Lipase LPS L*”, “*Lipolase 100 L*” and “*Novozyme 435*” were able to depolymerise polyester polyurethane. Recombinant urethanase gene expression was performed in the *E. coli* BL21(DE3) strain. NDS-PAGE analysis revealed that the recombinant protein was localised in the insoluble proteins fraction. By changing the induction parameters (in performing gene expression at 1 mM IPTG concentration at 25 °C for 18 hours), part of the recombinant protein was transferred to the soluble proteins fraction.

LITERATŪROS ŠARAŠAS

Akindoyo J.O., Beg M.D.H., Ghazali S., Islam M.R., Jeyaratnam N., Yuvaraj A.R., **2016**, Polyurethane types, synthesis and applications – a review, *Royal Society of Chemistry*, 6, 114453-114482. <https://doi.org/10.1039/C6RA14525F>

Akutsu Y., Nakajima-Kambe T., Nomura N., Nakahara T., **1998**, Purification and properties of a polyester polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1, 62-67. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87663-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87663-X)

Akutsu-Shigeno Y., Adachi Y., Yamada C., Toyoshima K., Nomura N., Uchiyama H., Nakajima-Kambe T., **2006**, Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 422-429. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0071-1>

Alvarez-Barragan J., Dominguez-Malfavon L., Vargas-Suarez M., Gonzalez-Hernandez R., Aguilar-Osorio G., Loza-Tavera H., **2016**, Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams, *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 17, 5225-5235. <https://doi.org/10.1128/AEM.01344-16>

Barrioni B.R., Carvalho S.M., Orefice R.L., Oliveira A.A.R., Magalhaes Pereira M., **2015**, Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane films based on HDI with hydrolyzable crosslinked bonds and a homogeneous structure for biomedical applications, *Materials Science and Engineering: C*, 52, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.027>

Bazioli J.M., Amaral L.S., Fill T.P., Rodrigues-Filho E., **2017**, Insights into *Penicillium brasilianum* secondary metabolism and its biotechnological potential, *Molecules*, 22, 6, 858. <https://doi.org/10.3390/molecules22060858>

Beniag G., Heath W.H., Torkelson J.M., **2017**, Functionalization of hydroxyl groups in segmented polyhydroxyurethane eliminates nanophase separation, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 55, 20. <https://doi.org/10.1002/pola.28722>

Berntsen J.F., Morin D., Clausen A.H., Langseth M., **2019**, Experimental investigation and numerical modelling of the mechanical response of a semi-structural polyurethane adhesive, *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 95, 102-395. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2019.102395>

Bialkowska A., Bakar M., Marchut-Mikolajczyk, **2019**, Biodegradation of linear and branched nonisocyanate condensation polyurethanes based on 2-hydroxy-naphthalene-6-sulfonic acid and phenol sulfonic acid, *Polymer Degradation and Stability*, 159, 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.11.011>

Biffinger J.C., Barlow D.E., Cockrell A.L., Cusick K.D., Hervey W.J., Fitzgerald L.A., Nadeau L.J., Hung C.S., Crookes-Goodson W., Russell J.N., **2015**, The applicability of Impranil®DLN for gauging the biodegradation of polyurethanes, *Polymer Degradation and Stability*, 120, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.020>

Cornille A., Auverge R., Figovsky O., Boutevin B., Caillol S., **2017**, A perspective approach to sustainable routes for non-isocyanate polyurethanes, *European Polymer Journal*, 87, 535-552. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.11.027>

Cregut M., Bredas M., Durand M.J., Thouand G., **2013**, New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process, *Biotechnology Advances*, 31, 8, 1634-1647. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.011>

Darby R.T. ir Kaplan A.M., **1968**, Fungal susceptibility of polyurethanes, *Applied Microbiology*, 16, 6, 900-905. <https://aem.asm.org/content/aem/16/6/900.full.pdf>

Desroches M., Escouvois M., Auvergne R., Caillol S., Boutevin B., **2012**, From vegetable oils to polyurethanes: synthetic routes to polyols and main industrial products, *Polymer Reviews*, 52, 38-79. <https://doi.org/10.1080/15583724.2011.640443>

Engels H.W., Pirkl H.G., Albers R., Albach R.W., Krause J., Hoffmann A., Casselmann H., Dormish J., **2013**, Polyurethanes: versatile materials and sustainable problem solvers for today's challenges, *Angewandte Chemie*, 52, 36. <https://doi.org/10.1002/anie.201302766>

Fernandes I.P., Barbosa M., Amaral J.S., Pinto V., Rodrigues J.L., Ferreira M.J., Barreiro M.F., **2016**, Biobased additives as biodegradability enhancers with application in TPU-based footwear components, *Journal of Renewable Materials*, 4, 1, 47-56. <https://doi.org/10.7569/JRM.2015.634126>

- Ferri C.,** Violante de Paz M., Zamora F., Galbis J.A., **2010**, Dithiothreitol-based polyurethanes. Synthesis and degradation studies, *Polymer Degradation and Stability*, 95, 9, 1480-1487. <https://doi.org/10.1016/j.polyimdegradstab.2010.06.021>
- Fiorani G.,** Perosa A., Selva M., **2018**, Dimethyl carbonate: a versatile reagent for a sustainable valorization of renewables, *Green Chemistry*, 20, 288-322. <https://doi.org/10.1039/C7GC02118F>
- Francis D.M. ir Page R.,** **2010**, Strategies to optimize protein expression in *E. coli*, *Current Protocols in Protein Science*, 61, 1. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61>
- Garrido A.,** Font R., Conesa J.A., **2016**, Pollutant emissions during the pyrolysis and combustion of flexible polyurethane foam, *Waste Management*, 52, 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.04.007>
- Hahladakis J.N.,** Velis C.A., Weber R., Iacovidou E., Purnell R., **2018**, An overview of chemical additives present in plastics: migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling, *Journal of Hazardous Materials*, 344, 15, 179-199. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.014>
- Hooman J.J.,** **2010**, Understanding soil microbes and nutrient recycling. <https://ohioline.osu.edu/factsheet/SAG-16>
- Howard G.,** **2002**, Biodegradation of polyurethane: a review, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 49, 4, 245-252. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00051-3](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00051-3)
- Howard G.T. ir Blake R.C.,** **1998**, Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester–polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase–protease enzyme, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 42, 4, 213-220. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00051-1)
- Howard G.T. ir Hilliard N.P.,** **1999**, Use of Coomassie blue polyurethane interaction in screening of polyurethanase proteins and polyurethanolytic bacteria, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 43, 23-30.
- Howard G.T.,** **2011**, Polyurethane biodegradation, *Microbial Degradation of Xenobiotics*, 371-394. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23789-8_14
- Howard G.T.,** Crother B., VicknaR j., **2001**, Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (*pueB*) from *Pseudomonas chlororaphis*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47, 3, 141-149. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00042-7)
- Howard G.T.,** Vicknair J., Mackie R.I., **2001**, Sensitive plate assay for screening and detection of bacterial polyurethanase activity, *Letters in Applied Microbiology*, 32, 211-214. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00887.x>
- Hung C.S.,** Zingarelli S., Nadeau L.J., Biffinger J.C., Drake C.A., Crouch C.A., Barlow D.E., Russell J.N., Crookes-Goodson W.J., **2016**, Carbon catabolite repression and imranil polyurethane degradation in *Pseudomonas protegens* strain Pf-5, *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 20, 6080-6090. <https://doi.org/10.1128/AEM.01448-16>
- Jirakittidul K.,** **2013**, Structure-property relationships polyurethane-carbon particle nanocomposites, 5-35. <https://pdfs.semanticscholar.org/843f/69fb9c627260ee6d6da8a233c99ad9d19c19.pdf>
- Kang C. H.,** Oh K.H., Lee M.H., Oh T.K., Kim B.H. Yoon J.H., **2011**, A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library, *Microbial Cell Factories*, 10, 41, <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-41>
- Ke J.,** Li X., Wang F., Jiang S., Kang M., Wang J., Li Q., Wang Z., **2017**, Non-isocyanate polyurethane/epoxy hybrid materials with different and controlled architectures prepared from a CO₂-sourced monomer and epoxy via an environmentally-friendly route, *RSC Advances*, 46, 7. <https://doi.org/10.1039/C7RA04215A>
- Krasowska K.,** Heimowska A., Rutkowska M., **2015**, Environmental degradability of polyurethanes, *Thermoplastic Elastomes – Synthesis and Applications*, 75-94. <http://dx.doi.org/10.5772/60925>
- Kupka V.,** Benesova P., Obruca S., Brtnikova J., Marova I., Jancar I., Vojtova L., **2018**, Biodegradation of polyurethane-polyhydroxybutyrate elastomeric composite investigated from morphological and structural viewpoint, *Journal of Applied Polymer Science*, 136, 1. <https://doi.org/10.1002/app.46909>
- Llevot A. ir M. Meier,** **2018**, Perspective: green polyurethane synthesis for coating applications, *Polymer International*, 68 (5). <https://doi.org/10.1002/pi.5655>
- Loredo-Trevino A.,** Gutierrez-Sanchez G., Rodriguez-Herrera R., Aguilar C.N., **2012**, Microbial enzymes involved in polyurethane biodegradation: a review, *Journal of Polymers and the Environment*, 20, 1, 258-265. <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0390-5>

- Ma Z.**, Li C., Fan H., Wan J., Luo Y., Li B.G., **2017**, Polyhydroxyurethanes (PHUs) derived from diphenolic acid and carbon dioxide and their application in solvent- and water-borne phu coatings, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 56, 47, 14089-14100. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b04029>
- Magnin A.**, Hoornaert L., Pollet E., Laurichesse S., Phalip V., Averous L., **2018**, Isolation and characterization of different promising fungi for biological waste management of polyurethanes, *Microbial Biotechnology*, 12, 3, <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13346>
- Magnin A.**, Pollet E., Perrin R., Ullmann Ch., Persillon C., Phalip V., Averous L., **2019**, Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: Synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks, *Waste Management*, 85, 15, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.12.024>
- Magnin A.**, Pollet E., Phalip V., Averous L., **2019**, Evaluation of biological degradation of polyurethanes, *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107457>
- Mahajan N. ir Gupta P.**, **2015**, New insights into the microbial degradation of polyurethanes, *RSC Advances*, 52, 41839-41854. <https://doi.org/10.1039/C5RA04589D>
- Matsumiya Y.**, Murata N., Tanabe E., Kubota K., Kubo M., **2010**, Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp., *Journal of Applied Microbiology*, 108, 6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04600.x>
- Milan D.A.**, Valdes O., Mirabal-Gallardo Y., Torre A.F., Bustamante C., Contreras J., **2018**, Preparation of renewable bio-polyols from two species of colliguaja for rigid polyurethane foams, *Materials*, 11, 2244. <https://doi.org/10.3390/ma11112244>
- Naik R.K.**, Naik M.M., D'Costa M., **2019**, Microplastics in ballast water as an emerging source and vector for harmful chemicals, antibiotics, metals, bacterial pathogens and HAB species: A potential risk to the marine environment and human health, *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110-525. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.110525>
- Nair S. ir Kumar P.**, **2007**, Molecular characterization of a lipase-producing *Bacillus pumilus* strain (NMSN-1d) utilizing colloidal water-dispersible polyurethane, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1441-1449. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9388-5>
- Nakajima-Kambe T.**, Onuma F., Kimpara N., Nakahara T., **1995**, Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source, *FEMS Microbiology Letters*, 129, 1, 39-42. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00131-N](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00131-N)
- Nakajima-Kambre T.**, Shigeno-Akutsu Y., Nomura N., Onuma F., Nakahara T., **1999**, Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 2, 134-140. <https://doi.org/10.1007/s002530051373>
- Nakjima-Kambe T.**, Onuma F., Akutsu Y., Nakahara T., **1997**, Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 456-460, 83, 5. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)83000-0](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)83000-0)
- Nohra B.**, Candy L., Blanco J.F., Guerin C., Raoul Y., Mouloungui Z., **2013**, From petrochemical polyurethanes to biobased polyhydroxyurethanes, *Macromolecules*, 46, 10, 3771-3792. <https://doi.org/10.1021/ma400197c>
- Nomura N.**, Shigeno-Akutsu Y., Nakajima-Kambe T., Nakahara T., **1998**, Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 4, 339-345. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(99\)89001-1](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(99)89001-1)
- Oprea S.**, **2010**, Dependence of fungal biodegradation of PEG/castor oil-based polyurethane elastomers on the hard-segment structure, *Polymer Degradation and Stability*, 95, 12, 2396-2404. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.013>
- Ozsagiroglu E.**, Iyisan B., Guvenilir Y.A., **2012**, Biodegradation and characterization studies of different kinds of polyurethanes with several enzyme solutions, *Polish Journal of Environmental Studies*, 21, 6, 1777-1782. <https://pdfs.semanticscholar.org/35c6/2a507161f62a630cc7cc446aff3e4ffe513d.pdf>
- Peng Y.H.**, Shih Y., Lai Y.Ch., Liu Y.Z., Liu Y.T., Lin N.Ch., **2014**, Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain, *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 16, 9529-9537. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2647-8>
- Petry do Conto V.**, Thompson C.E., Netz P.A., **2019**, Polyurethanases: three-dimensional structures and molecular dynamics simulations of enzymes that degrade polyurethane, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 89, 82-95. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2019.03.001>

- Pignede G., Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M., Nicaud J.M., 2000**, Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*, *Journal of Bacteriology*, 182, 10. <https://doi.org/10.1128/jb.182.10.2802-2810.2000>
- Pilch-Pitera B., 2013**, Examination of the enzyme resistance of polyurethane powder coatings, *Journal of Polymers and the Environment*, 21, 1, 215-223. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0519-1>
- Prociak A., Szczepkowski L., Ryszkowska J., Kuranska M., Auguscik M., Malewska E., Gloc M., Michalowski S., 2019**, Influence of chemical structure of petrochemical polyol on properties of bio-polyurethane foams, *Journal of Polymers and the Environment*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01527-7>
- Rehman F.U., 2010**, Synthesis and characterization of speciality polyurethane elastomers, http://www.pmahome.org/files/8714/1468/0979/Synthesis_and_Characterization.pdf
- Ruiz C. ir Howard G.T., 1999**, Nucleotide sequencing of a polyurethanase gene (*pulA*) from *Pseudomonas fluorescens*, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 44, 2-3, 127-131. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(99\)00074-8](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(99)00074-8)
- Santerre J.P., Woodhouse K., Laroche G., Labow R.S., 2005**, Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials, *Biomaterials*, 26, 35, 7457-7470. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.079>
- Shah Z., Gulzar M., Hasan F., Shan A.A., 2016**, Degradation of polyester polyurethane by an indigenously developed consortium of *Pseudomonas* and *Bacillus* species isolated from soil, *Polymer Degradation and Stability*, 134, 349-356. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.11.003>
- Shan Z., Hasan F., Krumholz L., Aktas D.F., Shan A.A., 2013**, Degradation of polyester polyurethane by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85 and analysis of degradation products by GC-MS, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77, 114-122. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.11.009>
- Simón D., Borreguero A.M., de Lucas A., Rodríguez J.F., 2018**, Recycling of polyurethanes from laboratory to industry, a journey towards the sustainability, *Waste Management*, 76, 147-171. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.03.041>
- Stern R.V., Howard G.T., 2000**, The polyester polyurethanase gene (*pueA*) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase, *FEMS Microbiology Letters*, 185, 2, 163-168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09056.x>
- Thirunavukarasu K., Purushothaman S., Gowthaman M.K., Nakajima-Kambe T., Rose C., Kamini N.R., 2015**, Utilization of fish meal and fish oil for production of *Cryptococcus* sp. MTCC 5455 lipase and hydrolysis of polyurethane thereof, *Journal of Food Science and Technology*, 5772-5780, 52. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1697-8>
- Touchet T.J. ir Cosgriff-Hernandez E.M., 2016**, Hierarchal structure–property relationships of segmented polyurethanes, *Advances in Polyurethane Biomaterials*, 3-22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100614-6.00001-9>
- Vega R.E., Main T., Howard G.T., 1999**, Cloning and expression in *Escherichia coli* of a polyurethane-degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43, 12, 49-55. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(98\)00068-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(98)00068-7)
- Velthoven J., Gootjes L., Es D.S., Noordocer B.A.J., Meuldijk J., 2015**, Poly(hydroxy urethane)s based on renewable diglycerol dicarbonate, *European Polymer Journal*, 70, 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.07.011>
- Wu Q., Tao H., Wong M.H., 2019**, Feeding and metabolism effects of three common microplastics on *Tenebrio molitor* L., *Environmental Geochemistry and Health*, 41, 17-26. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0161-5>
- Zevenhoven R., 2004**, Treatment and disposal of polyurethane wastes: options for recovery and recycling, Helsinki University of Technology, ISBN 951-22-7161-3, 24-36.

Kocuria sp. TBS 102 16S rRNR geno seka

GenBank prieigos numeris: **MN038066**

```
CGCTGAAGCTTGGGTGCTTGCATCTGGGTGGATGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACGTGAGTAACCTGC
CCTTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACTGGATACTACAYTCTCTCGCATGGGGGTGT
GTGGAAAGGGTTTTACTGGTTTTGGATGGGCTCACGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACC
AAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGAT
GACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCACGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACGTGCAGAAGAAGCG
CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
AAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCTGCTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGTGGTGTGCAGTGGGT
ACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGG
AGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATAACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGGACATTCCACGTTT
TCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAGTGCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAA
TTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGG
CTTGACATACACCAGACCGGCCAGAGATGGGTTTTCTCTTTGAGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGT
TGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCC
AGCACGTGATGGTGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
TCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACCGTG
AGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCTGGTCTCAGTTCGGATCGTGGTCTGCAACTCGACCACGTGAAGTCGG
AGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC
AAGTCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCTTGTGGGGGGAGCC
```

P-1 lentelē. Poliuretana skaidantys mikroorganizmai ir naudojami PU substratai, pagal *Magnin A. ir kt., 2019*

Bakterijos		Grybai	
Rūšis ir/ar kamienas	PU substratas	Rūšis ir/ar kamienas	PU substratas
<i>Acinetobacter gerveri</i> P7	PES-PU danga	<i>Alternaria sp.</i>	Termoplastinis PES-PU
<i>Alicyciphilus sp.</i> BQ1	PES-PU danga	„ <i>Alternaria Solani</i> “ numeris Ss.1-3	Termoplastinis PES-PU
<i>Alicyciphilus sp.</i> BQ8	PES-PU danga PES-PU putos	<i>Alternaria sp.</i> PURDK2	PE-PU putos
<i>Arthrobacter sp.</i>	Termoplastinis PES-PU	<i>Alternaria tenuissima</i>	Termoplastinis PE-PU
<i>Arthrobacter calcoaceticus</i> ATCC 31012	PES-PU danga	<i>Aspergillus sp.</i>	PES-PU putos
<i>Arthrobacter calcoaceticus</i> NAV-2	PES-PU danga	<i>Aspergillus flavus</i>	Termoplastinis PES-PU
<i>Arthrobacter globiformis</i>	PES-PU danga	<i>Aspergillus fumigatus</i>	PES-PU danga PE-PU putos Termoplastinis PES-PU
<i>Bacillus sp.</i>	PES-PU danga Termoplastinis PES-PU	<i>Aspergillus niger</i>	PE-PU putos
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Termoplastinis PE-PU	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	Termoplastinis PES-PU
<i>Bacillus pumilus</i> NMSN-1d	PES-PU danga	<i>Aspergillus section flavi</i>	Termoplastinis PES-PU
<i>Bacillus subtilis</i> MZA-75	Termoplastinis PES-PU	<i>Aspergillus tubingensis</i>	Termoplastinis PES-PU
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	PES-PU putos	<i>Aureobasidium pullulans</i>	PES-PU danga
<i>Corynebacterium sp.</i>	Termoplastinis PES-PU PES-PU putos	<i>Chaetomium globosum</i>	Termoplastinis PE-PU
<i>Delftia acidovorans</i> TB-35	Termoplastinis PES-PU	<i>Cladosporium sp.</i>	PES-PU danga PE-PU putos
<i>Escherichia coli</i>	Termoplastinis PE-PU	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	PES-PU danga PE-PU putos
<i>Micrococcus sp.</i>	Termoplastinis PES-PU Termoplastinis PE-PU	<i>Cladosporium asperulatum</i>	PES-PU danga PE-PU putos
<i>Pseudomonas sp.</i>	PES-PU putos Termoplastinis PES-PU	<i>Cladosporium herbarum</i>	PE-PU putos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PES-PU PES-PU danga PES-PU putos	<i>Cladosporium montecillanum</i>	PES-PU danga PE-PU putos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 13388	PES-PU putos	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	PES-PU danga PE-PU putos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Termoplastinis PES-PU	<i>Cryptococcus laurentii</i>	PES-PU danga
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 7814	PES-PU	<i>Curvularia senegalensis</i>	PES-PU danga
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MZA-85	Termoplastinis PES-PU	<i>Exophiala jeanselmei</i>	Poli(N-tolilkarbamatas)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NAV-6	PES-PU danga	<i>Fusarium solani</i>	PES-PU danga
<i>Pseudomonas cepacia</i>	PES-PU danga	<i>Gliocladium roseum</i>	Termoplastinis PES-PU
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC 55729	PES-PU putos	<i>Penicillium chrysogenum</i>	PES-PU danga Polietileno PU putos
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PE-PU danga PES-PU danga	<i>Penicillium section lanata-divaricata</i>	Termoplastinis PES-PU
<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	PES-PU danga Termoplastinis PE-PU	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	PES-PU danga
<i>Pseudomonas putida</i>	PES-PU danga		
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17484	PES-PU danga		
<i>Rhodococcus equi</i> TB-60	Poli(toluen-2,4-dikarbamo rūgštis dibutilo esteris)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	PE-PU		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KH 11	Termoplastinis PE-PU		