

DOI 10.17516/1997-1389-0325

УДК 615.46.015

Synthesis and Characterization of Multicomponent PHAs

**Evgenii G. Kiselev^{*a,b},
Alexander D. Vasiliev^{b,c} and Tatiana G. Volova^{a,b}**

*^aInstitute of Biophysics SB RAS
FRC “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”
Krasnoyarsk, Russian Federation*

*^bSiberian Federal University
Krasnoyarsk, Russian Federation*

*^cL.V. Kirenskii Institute of Physics SB RAS
FRC “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 17.02.2020, received in revised form 02.05.2020, accepted 01.07.2020

Abstract. *Cupriavidus necator* B10646 bacterial cells were cultivated in the mode of synthesis of the reserve polyhydroxyalkanoates (PHAs) in the growth medium that contained, in addition to glucose as the main substrate, precursor substrates of the monomers of various monocarboxylic acids – salts of valeric and hexanoic acids, propionate, and γ -butyrolactone. PHA terpolymers and quaterpolymers with different compositions and proportions of monomers were synthesized, and their physicochemical properties were studied. The terpolymers were composed of monomers of 3-hydroxybutyrate (3HB), 3-hydroxyvalerate (3HV), 4-hydroxybutyrate (4HB), or 3-hydroxyhexanoate (3HHx) and had the following compositions: P(3HB/3HB/4HHx) and P(3HB/3HV/4HHx). The quaterpolymers had the following composition: P(3HB/3HV/4HB/3HHx). All copolymer samples, regardless of the composition and proportions of monomers, had lower molecular weights and higher polydispersity values compared to the highly crystalline 3-hydroxybutyrate homopolymer, but retained thermal stability properties, with a difference between the melting point and thermal degradation of at least 100–110 °C. The inclusion of 3HV, 4HB, and 3HHx monomers in the C-chain of 3HB caused changes in the crystalline to amorphous phase ratio and a significant decrease in the degree of crystallinity (C_x), which depended on the type of monomers and their contents in the copolymer. The maximum decrease in C_x (9–17 %) was detected in the P(3HB/3HV/4HB) terpolymer and the P(3HB/3HV/4HB/3HHx) quaterpolymer (30–36 %). The study confirms that there is the possibility of synthesizing polymers with various compositions, including new ones, which differ significantly in their basic properties.

© Siberian Federal University. All rights reserved

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (CC BY-NC 4.0).

* Corresponding author E-mail address: evgeniygek@gmail.com

ORCID: 0000-0003-4472-7087 (Kiselev E.); 0000-0001-9392-156X (Volova T.)

Keywords: polyhydroxyalkanoates (PHAs), biosynthesis, precursor substrates, copolymers, physicochemical properties.

Acknowledgments. The study was supported by RFBR and KKRF Grant No. 19-43-240012 “Biological and physical principles of production of new-generation biomaterials”. The work was carried out as part of the State Assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation No. FSRZ-2020-0006. Instruments of the Joint Instrument Use Center at the FRC “KSC SB RAS” were used.

Citation: Kiselev E.G., Vasiliev A.D., Volova T.G. Synthesis and characterization of multicomponent PHAs. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2021, 14(1), 97–113. DOI: 10.17516/1997-1389-0325

Синтез и характеристики многокомпонентных ПГА

Е.Г. Киселев^{а,б}, А.Д. Васильев^{б,в}, Т.Г. Волова^{а,б}

^аИнститут биофизики СО РАН

ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»

Российская Федерация, Красноярск

^бСибирский федеральный университет

Российская Федерация, Красноярск

^вИнститут физики им. Л.В. Киренского

ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»

Российская Федерация, Красноярск

Аннотация. В культуре бактерий *Cupriavidus necator* В10646 в режиме синтеза резервных полигидроксиалканоатов при включении в состав ростовой среды, помимо основного субстрата, глюкозы, субстратов-предшественников различных мономеров монокарбоновых кислот – солей валериановой и гексановой кислот, пропионата, γ -бутиролактона, синтезировано семейство трех- и четырехкомпонентных полимеров с различным набором и соотношением мономеров и исследованы физико-химические свойства. Трехкомпонентные образцы были образованы мономерами 3-гидроксibuтирата (ЗГБ), 3-гидроксивалерата (ЗГВ), 4-гидроксibuтирата (4ГБ) или 3-гидроксигексаноата (ЗГГ) и имели следующие составы: П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ/4ГГ); четырехкомпонентные сополимеры имели состав П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ). Все сополимерные образцы, независимо от состава и соотношения мономеров, обладали сниженными значениями молекулярной массы и повышенными значениями полидисперсности по сравнению с высококристаллическим гомополимером 3-гидроксibuтирата, но сохраняли свойства термостабильности, имея разрыв между температурой плавления и термической деградации не менее 100-110 °С. Включение в С-цепь ЗГБ мономеров ЗГВ, 4ГБ и ЗГГ вызывало значительные изменения соотношения кристаллической и аморфной фаз и снижение

степени кристалличности (C_x), зависящие от типа мономеров и их содержания в сополимере. Максимальное снижение C_x (до 9-17 %) зарегистрировано у трехкомпонентных образцов П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ), у четырехкомпонентных сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ) – до 30-36 %. Доказана возможность синтеза полимеров разного, в том числе нового, состава, существенно различающихся базовыми свойствами.

Ключевые слова: полигидроксиалканоаты (ПГА), биосинтез, субстраты-предшественники, сополимеры, физико-химические свойства.

Благодарности. Работа выполнена по гранту № 19-43-240012 «Биологические и физические принципы получения биоматериалов новой генерации» при поддержке РФФИ и ККФН и госзаданию Министерства науки и высшего образования РФ № FSRZ-2020-0006. В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования приборами ФИЦ «КНЦ СО РАН».

Цитирование: Киселев, Е.Г. Синтез и характеристики многокомпонентных ПГА / Е.Г. Киселев, А.Д. Васильев, Т.Г. Волова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2021. 14(1). С. 97–113. DOI: 10.17516/1997-1389-0325

Введение

Открытие и изучение полигидроксиалканоатов (ПГА), полимеров микробиологического происхождения, явилось значимым событием для биотехнологии разрушаемых биоматериалов (Sudesh et al., 2000; Chen, 2010; Volova et al., 2013; Chen et al., 2016; Koller, 2019). Высокие эксплуатационные свойства ПГА, включая термопластичность и возможность переработки в изделия из различных фазовых состояний различными методами, биodeградируемость и высокая биологическая совместимость выдвигают эти полимеры в разряд перспективных материалов, пригодных для различных сфер применения – от коммунального и сельского хозяйства до фармакологии и биомедицины (Tagrahi et al., 2020). Многообещающей представляется перспектива использования этих полимеров для регенерации поврежденных кожных покровов, закрытия дефектов мягких и костной тканей, изготовления шовного материала и различных эндопротезов (Volova et al., 2017; Polyhydroxyalkanoate (PHA) market..., 2017; Singh et al., 2019).

Полигидроксиалканоаты – это класс полимеров различного химического строения, различающихся между собой по структуре и свойствам (кристалличности, температуре плавления, разрушаемости и др.) в зависимости от таксономического положения и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов, условий биосинтеза и типа углеродного субстрата. Более перспективными считаются сополимерные ПГА, которые в отличие от высококристаллического поли-3-гидроксибутирата (П(ЗГБ)) обеспечивают получение более качественных полимерных изделий. Однако синтез сополимеров – сложная биотехнологическая задача, требующая применения субстратов-предшественников, как правило, токсичных для продуцентов и вызывающих ингибирование роста бактерий и синтеза полимеров. Поэтому получение продуктивных процессов одновременно по урожаю биомассы и ПГА при высоких включениях мономеров различного состава проблематично.

Особо перспективными ПГА являются сополимеры, имеющие низкую степень кристалличности и обладающие свойствами эластомеров. Это короткоцепочечные сополимеры 3- и 4-гидроксибутирата, а также сополимеры, содержащие среднецепочечные мономеры 3-гидроксигексаноата (ЗГГ) или 3-гидроксиоктаноата (ЗГО) (Sudesh et al., 2000; Green et al., 2002; Laycock et al., 2013; Chen et al., 2016; Han et al., 2017). Свойства сополимерных ПГА зависят от набора и соотношения мономеров, различающихся строением боковых групп в С-цепи и расстояниями между эфирными группами.

Получение сополимеров – активно развиваемое направление биотехнологии ПГА. Наряду с изучением двухкомпонентных сополимеров, активизируются исследования, направленные на получение более сложных 3- и 4-компонентных ПГА с различным набором мономеров (Matsusaki et al., 2000; Chanprateep & Kulpreecha, 2006; Pignatello et al., 2009; Shozui et al., 2010; Ramachandran et al., 2011; Bonartsev et al., 2013; 2017; Cavaleiro et al., 2013; Mizuno et al., 2014; Aziz et al., 2017; Myung et al., 2017; Cheema et al., 2012; Jung et al., 2019; Kucera et al., 2019). Несмотря на актуальность исследования ПГА различного химического состава, имеющиеся результаты далеки от исчерпывающей картины. Сведения по влиянию состава ПГА на их свойства имеют существенные отличия у разных авторов даже при анализе образцов близкого химического состава. Трудности регламентированного и воспроизводимого синтеза сополимерных ПГА и разноречивость результатов, характеризующих их свойства, сдерживают накопление знаний о взаимосвязи между составом полимеров и их свойствами.

Цель работы – синтез 3- и 4-компонентных ПГА, содержащих макровключения

мономеров 3- и 4-гидроксибутирата, 3-гидроксивалерата и 4-гидроксигексаноата, и изучение их свойств в зависимости от набора и соотношения мономеров.

Материалы и методы

В исследовании использовали штамм бактерий *Cupriavidus necator* B10646, зарегистрированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) и запатентованный в РФ (Патент РФ на изобретение № 2439143 «Штамм бактерий ВКПМ В-10646 – продуцент полигидроксиалканоатов и способ их получения» по заявке № 2010146514 (авторы Т.Г. Волова и Е.И. Шишацкая)).

Музейную культуру выращивали в периодическом двустадийном режиме, используя на первом этапе (30-35 ч) полную солевую среду известного состава (Schlegel et al., 1961); на втором этапе взяли среду аналогичного состава, но не содержащую азота. Основным источником углерода служила глюкоза в исходной концентрации в среде 10 г/л. В качестве субстратов-предшественников в состав среды вносили различные добавки: соли валериановой и гексановой кислот, пропионат калия, γ -бутиролактон («Sigma», США).

Культивирование бактерий проводили в гетеротрофных стерильных условиях в периодическом режиме с использованием термостатируемого шейкер-инкубатора Innova серии 44 («New Brunswick Scientific», США) в колбах объемом от 0,5 до 2,0 л с коэффициентом заполнения 0,5 при 200 об/мин и 30 °С. Периодически отбирали пробы культуры для измерения оптической плотности (фотолориметр КФК-2МП, Россия) при $\lambda=440$ нм. Урожай биомассы бактерий в культуре регистрировали весовым способом после высушивания отмытых проб биомассы при 105 °С

в сушильном шкафу («SANYO», Япония) в течение 24 ч.

Концентрацию глюкозы в среде определяли фотометрически глюкозооксидазным методом с применением набора реагентов «Глюкоза – ФКД» (ООО «Фармацевтика и клиническая диагностика», Россия). Внутриклеточное содержание полимера и состав выделенных из биомассы высокоочищенных образцов полимеров определяли хроматографией предварительно полученных метиловых эфиров жирных кислот на хромато-масс-спектрометре ГХ-МС (7890/5975С, Agilent Technologies, США). Полимер из предварительно лиофилизированной на установке ALPHA 1-2/LD Martin Christ GmbH (Германия) биомассы бактерий экстрагировали дихлорметаном с последующим осаждением этанолом.

Молекулярно-массовые характеристики полимеров (средневесовую (M_w), среднечисловую (M_n) молекулярную массу, полидисперсность (ПД) находили с использованием системы гелипроникающей хроматографии (Agilent 1200 Infinity, США) с набором полистириновых стандартов Agilent PS-H EasiVial (Sigma, США). Термический анализ ПГА выполнен с применением дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 (Mettler Toledo, Швейцария). Образцы нагревали со скоростью 10 °С/мин до 200 °С, выдерживали в течение 3 мин; далее охлаждали до минус 20 °С, выдерживали в течение 5 мин и повторно нагревали до 320 °С. Температуры стеклования ($T_{стекл.}$), кристаллизации ($T_{крист.}$), плавления ($T_{пл}$) и термической деградаци ($T_{дегр}$) определяли после второго нагрева дифференциально сканирующим калориметром (DSC1, Mettler Toledo) на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE». Рентгеновские исследования выполнены на порошковом дифрактометре D8ADVANCE

(Bruker AXS, Германия) с линейным детектором VANTEC. Степень кристалличности (C_x) определяли как величину отношения площади под рентгенограммой с вычтенным фоном к площади без вычитания аморфного фона. Для вычислений использована программа Eva из программного приложения к дифрактометру. Точность измерений 2 %.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с помощью стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты определения урожая биомассы и концентрации полимера в клетках представлены как средние арифметические со стандартным отклонением.

Результаты и обсуждение

Культура бактерий, находящаяся в режиме синтеза сополимерных ПГА, – это сложная и многофакторная система, контролируемая многими факторами. Первое, синтез ПГА реализуется в условиях, исключающих дефицит основного углеродного субстрата в культуре; при этом концентрация субстрата должна контролироваться в границах физиологического действия для конкретного штамма, исключающих возникновение как лимитирующих, так и ингибирующих условий. Второе, для накопления ПГА один из субстратов конструктивного обмена (для исследуемого штамма – азот) должен лимитировать рост бактерий. Третье, в составе среды должен присутствовать субстрат-предшественник в концентрациях, обеспечивающих образование мономеров, отличных от 3-гидроксibuтирата, но не вызывающих глубокого ингибирования культуры. Варьируя условия углеродного питания и дозированный режим подачи субстратов-предшественников в культуру, реализовали режимы, обеспечившие синтез сополимеров с различным набором и соотношением мономеров.

Синтез и свойства трехкомпонентных ПГА

Исследованы условия синтеза трехкомпонентных ПГА П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ/4ГГ) штаммом *C. necator* B10646, позволившие реализовать режимы получения сополимеров различного химического строения при внесении в культуру одновременно двух субстратов-предшественников.

Дозирование предшественников выполняли исходя из ранее исследованного влияния их концентраций на скорость роста бактерий и полученных значений предельно допустимых концентраций; для снижения токсичности использовали ранее разработанный режим дробного дозирования в культуру бактерий (Volova et al., 2007, 2008). Концентрация разовой дозы пропионата составляла 2,0 г/л, γ -бутиролактона – от 2 до 5 г/л; количество добавок варьировало. Внесение в культуру субстратов-предшественников незначительно сказывалось на продукционных характеристиках процесса; во всех вариантах урожай биомассы клеток (X , г/л) был несколько ниже, но не менее 5,0-5,5 г/л, по сравнению

с ростом в контроле на глюкозе ($6,5 \pm 0,5$ г/л). В качестве примера на рис. 1 приведен один из вариантов опыта с различным количеством добавок предшественников в культуру бактерий.

Варьируя режим подачи в культуру *C. necator* B10646 субстратов-предшественников, при незначительном снижении урожая биомассы бактерий и достаточно высоких общих выходах ПГА (до 66-68 % от сухой биомассы) синтезирована линейка сополимеров с макровключениями мономеров ЗГВ (от 7,2 до 18,5 мол. %) и 4ГБ (от 26,3 до 60,4 мол. %). Наличие мономеров ЗГБ, ЗГВ и 4ГБ подтверждено снятыми масс-спектрами (рис. 2).

Анализ публикаций показывает активизацию исследований сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ), однако с различной результативностью. Изучен рост культур *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 на олеиновой кислоте с добавками пентанола и бутиролактона (Aziz et al., 2017), *Cupriavidus necator* DSM545 на глицерине с добавками γ -бутиролактона и пропионовой кислоты (Cavalheiro et al., 2013), *Cupriavidus malaysiensis* USMAA2-4 (DSM

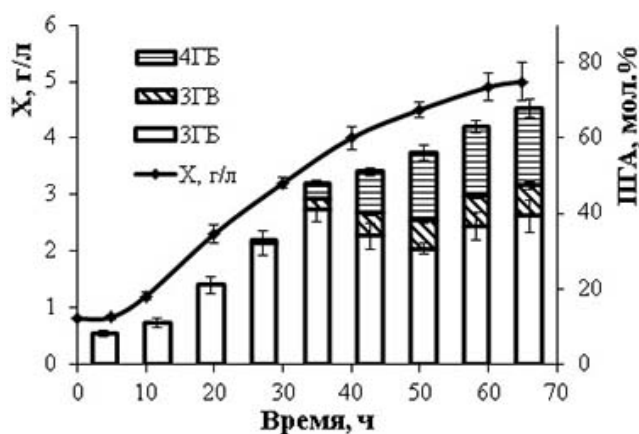


Рис. 1. Рост и синтез 3-компонентных сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) в культуре *C. necator* B10646 при подаче γ -бутиролактона (5 г/л) и пропионата (2 г/л)

Fig. 1. The growth and synthesis of the P(3HB/3HV/4HB) terpolymers in the culture of *C. necator* B10646 supplemented with γ -butyrolactone (5 g/L) and propionate (2 g/L)

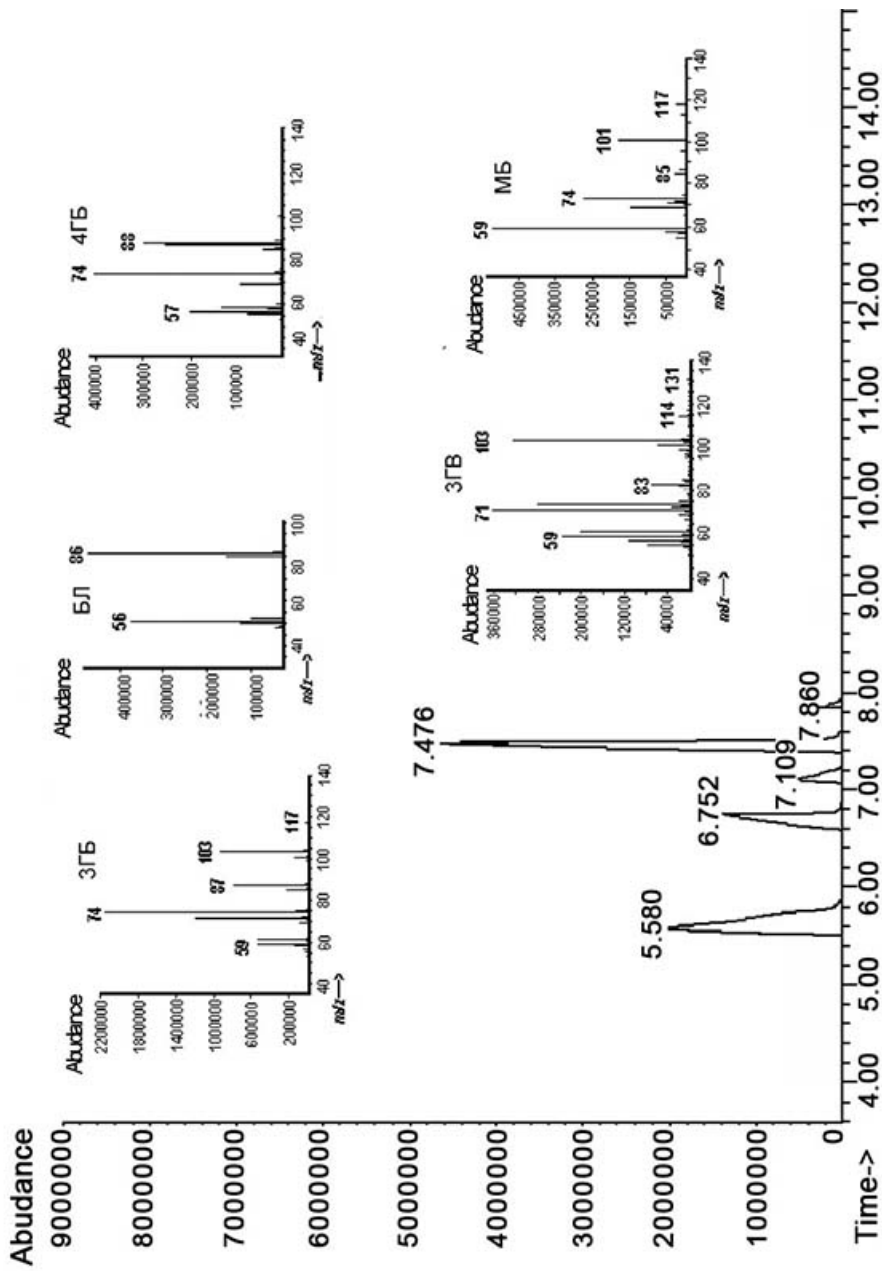


Рис. 2. Ионная хроматограмма и масс-спектры метиловых эфиров мономеров, входящих в состав П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ), с временами удерживания: метил-3-гидроксибутират (ЗГБ) – 5,580; бутиролактон (БЛ) – 6,752; метил-4-метоксибутират (МБ) – 7,109; метил-3-гидроксивалерат (ЗГВ) – 7,476; метил-4-гидроксибутират (4ГБ) – 7,860 мин. Содержание мономеров ЗГБ 47,3 мол. %, ЗГВ – 17,7 мол. %, 4ГБ – 35,0 мол. %

Fig. 2. Ion chromatogram and mass spectra of methyl esters of monomers constituting P(3HB/3HV/4HB) with retention times: methyl-3-hydroxybutyrate (3HB) - 5.580; butyrolactone (BL) - 6.752; methyl-4-methoxybutyrate (MB) - 7.109; methyl-3-hydroxyvalerate (3HV) - 7.476; methyl-4-hydroxybutyrate (4HB) - 7.860 min. The contents of monomers: 3HB - 47.3 mol.%, 3HV - 17.7 mol.%, 4HB - 35.0 mol.%

19379) на глицерине с γ -бутиролактоном или 1,4-бутандиолом (Kusega et al., 2019). Однако выходы сополимеров и содержание в них ЗГВ и 4ГБ уступали показателям представленной работы. Более высокий результат получен в культуре *Alcaligenes* sp. A-04 на фруктозе с добавками валериановой кислоты и натриевой соли γ -масляной кислоты или 1,4-бутандиола; авторам удалось повысить включение мономеров 4ГБ до 93 мол. % при включениях ЗГВ (от единиц до 30-40 мол. %), но при снижении общего выхода сополимера от 68 до 30-50 % (Chanprateer & Kulpreecha, 2006).

Результаты сравнительного исследования физико-химических свойств трехкомпонентных ПГА представлены в табл. 1.

При исследовании молекулярно-массовых характеристик трехкомпонентных полимеров П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) показана значительная вариабельность значений средневесовой молекулярной массы (M_w) и полидисперсности (ПД) без наличия четкой связи между содержанием тех или иных мономеров в сополимере и этими показателями. Зарегистрированные значения M_w и M_n для образцов П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) с различным соотношением

мономеров лежали в интервале от 450 до 724 и от 138 до 181 кДа соответственно (табл. 1). В целом, эти показатели ниже, чем у гомополимера П(ЗГБ) (920 и 368 кДа). Наиболее низкие значения M_w и M_n характерны для образцов, в которых доля ЗГБ колебалась от 26,2 до 59,4 мол. %, а суммарное содержание 4ГБ и ЗГВ – от 40,6 до 73,8 мол. % (образцы № 3 – 5, табл. 1). Хроматограммы распределения молекулярных масс трехкомпонентных ПГА с различным соотношением мономеров свидетельствуют о возрастании полидисперсности, позволяющей оценить соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризации, от 3,0 до 4,0, что в целом также выше, чем у П(ЗГБ) (табл. 1). Аналогичное снижение молекулярной массы сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) по сравнению с гомополимером П(ЗГБ) зарегистрированы другими авторами. В работе (Aziz et al., 2017) в зависимости от режима дозирования предшественников, по-разному влияющего на содержание мономеров ЗГВ и 4ГБ в сополимере, и по мере их увеличения зарегистрировано снижение M_w до 128–377 кДа. Колебания средневесовой молекулярной массы (от 148 до 774 кДа) и по-

Таблица 1. Химический состав и физико-химические свойства 3-компонентных ПГА П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) с различным соотношением мономеров ЗГБ, ЗГВ, 4ГБ

Table 1. The chemical composition and physicochemical properties of the P(3NB/3NV/4NB) terpolymers with different proportions of 3NB, 3NV, and 4NB monomers

№	Состав ПГА, мол. %			M_w , кДа	M_n , кДа	ПД	C_x , %	$T_{стекл}$, °C	$T_{крист}$, °C	$T_{пл}$, °C	$T_{дегр}$, °C
	ЗГБ	ЗГВ	4ГБ								
	100,0	0,0	0,0	920	368	2,5	76	-	-	178	295
1	55,2	18,5	26,3	669	176	3,8	21	-4	70	171	282
2	57,6	11,9	30,5	724	181	4,0	20	-5	71	168	283
3	59,4	7,2	33,4	450	150	3,0	22	-4	70	161	275
4	47,3	17,7	35,0	483	138	3,5	9	-	83	172	284
5	26,2	13,4	60,4	507	149	3,4	17	-	21	163	292

Примечание: «-» – не обнаружено, M_w – средневесовая молекулярная масса, M_n – среднечисловая молекулярная масса, ПД – полидисперсность, C_x – степень кристалличности, $T_{стекл}$ – температура стеклования, $T_{крист}$ – температура кристаллизации, $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{дегр}$ – температура термической деградации.

лидисперности (от 1,93 до 3,64) в образцах с различным включением 4ГБ показано в работе (Cavalheiro et al., 2013). Более выраженные изменения получены в работе (Chanprateer & Kulpreecha, 2006), где П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) по сравнению с гомополимером П(ЗГБ), у которого полидисперность составила 1,8, а среднечисловая молекулярная масса (M_n) 782 кДа, имели пониженные на порядок значения M_n и повышенную полидисперность (до 2-3 и выше). Еще в одной работе получен иной результат: образцы П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) с различным соотношением мономеров ЗГВ и 4ГБ имели близкие значения полидисперности (2,0-3,5) и очень большой разброс значений M_w (от 177 до 559-819 кДа) независимо от соотношения мономеров; а у нескольких образцов показатель достиг 1457 и 1710 кДа, что в принципе не характерно для сополимерных ПГА (Ramachandran et al., 2011).

Температуры последовательных фазовых переходов, определенные методом ДСК для 3-компонентных ПГА, приведены в табл. 1. У большинства образцов П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) температура кристаллизации ($T_{крис.}$), температура плавления ($T_{пл}$) и температура деградации ($T_{дегр.}$) имели сниженные значения по сравнению с гомополимером П(ЗГБ), у которого диапазон температуры плавления лежит в области 160-185 °С, а собственно пик $T_{пл}$ при 178 °С; температура термического разложения 295 °С. Для сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) температура плавления была ниже пика плавления гомогенного П(ЗГБ) и имела тенденцию к снижению с увеличением содержания мономеров ЗГВ и 4ГБ в сополимере на фоне сокращения содержания мономеров ЗГБ. Самые низкие значения $T_{пл}$ (161 – 163 °С) зарегистрированы для образцов, содержащих от 7 до 13 мол. % мономеров ЗГВ и от 33 до 60 мол. % мономеров 4ГБ. Самые низкие значения $T_{дегр.}$ зарегистрированы для образца 3, содержа-

щего 33 мол. % 4ГБ. Для других образцов отмечены более высокие температуры деградации, что, вероятно, может быть обусловлено образованием продуктов полураспада ПГА с их последующей деструкцией. Важно отметить, что, несмотря на выявленные отличия термических характеристик, заключающиеся в некотором снижении значений $T_{пл}$ и $T_{дегр.}$ у всех исследованных образцов сохранялся разрыв (от 110 до 130 °С) между этими параметрами. Таким образом, исследованные типы трехкомпонентных ПГА, независимо от набора и содержания мономеров в них, сохраняли одно из важных свойств ПГА – термопластичность. Для всех образцов, кроме образца № 4, не зафиксировано пиков кристаллизации при охлаждении. Кристаллизация образцов № 1, 2, 3, 5 происходила при повторном нагревании. У образцов № 4, 5, как и у П(ЗГБ), не зафиксирована температура стеклования. Стеклование образцов ($T_{стекл.}$) № 1 – 3 происходило при низких температурах (минус 4–5 °С).

Литературные данные о влиянии соотношения мономеров на температурные показатели полимера весьма противоречивы. Например, имеются сведения, что в зависимости от соотношения мономеров температура плавления ($T_{пл}$) сополимеров снижалась у одних образцов незначительно (до 159 °С), а у других очень резко, до 50 – 63 °С (Aziz et al., 2017). Резкое снижение температуры плавления в отличие от представленных результатов также зарегистрировано в другой публикации (Chanprateer & Kulpreecha, 2006) у образцов П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ); при возрастании содержания мономеров 4ГБ свыше 50 мол. % и при колебании ЗГВ в диапазоне от единиц до 30-40 мол. % температура плавления была значительно снижена (50-90 °С). Опубликованы также иные результаты, практически неизменные и сопоставимые с П(ЗГБ) темпе-

ратурные показатели ($T_{пл}$ и $T_{дегр}$) сополимеров с различным соотношением мономеров ЗГБ, ЗГВ и 4ГБ (Kucera et al., 2019). Есть публикации, в которых не обнаружено влияния на температурные показатели возрастающего содержания в сополимерах мономеров, отличных от ЗГБ, и не выявлено связи между составом П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) и температурными свойствами (Ramachandran et al., 2011).

Включение мономеров 4ГБ и ЗГВ оказывало существенное влияние на соотношение аморфной и кристаллической фаз в сополимере (табл. 1), более выраженное по сравнению с влиянием на C_x мономеров 4ГБ в двухкомпонентных сополимерах П(ЗГБ/4ГБ). Возможно, это связано с аддитивностью влияния двух мономеров на способность ПГА кристаллизоваться, включая торможение формирования кристаллических зон в полимере. Самые низкие значения степени кристалличности (9 и 17 %) получены для сополимеров, в которых суммарное содержание мономеров 4ГБ и ЗГВ было выше 50 мол. %, а содержание мономера ЗГБ, соответственно, ниже 50 мол. % (образцы № 4 и 5, табл. 1). У остальных образцов с суммарным содержанием мономеров 4ГБ и ЗГВ на уровне 40-45 мол. % C_x составила порядка 20 % (образцы № 1 – 3). На примере исследованных сополимеров, образованных мономерами ЗГБ, ЗГВ и 4ГБ, показана возможность получения материала с различной степенью кристалличности, включая образцы с величиной C_x ниже 10 %, практически близких к аморфной структуре. Полученные результаты не представляется возможным сопоставить с опубликованными ввиду отсутствия данных, установленных с привлечением рентгеноструктурного анализа и определения степени кристалличности ПГА.

Для синтеза второго типа трехкомпонентных сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) в качестве предшественника синтеза мономеров

ЗГГ использовали гексаноат, предшественников мономеров ЗГВ – валерат или пропионат в различных концентрациях (0,5, 0,7 и 1,0 г/л), которые вносили в культуру однократно на 38–42 ч культивирования. Гексаноат подавали в культуру через 6–8 ч в течение эксперимента в концентрациях 0,5 г/л. В реализованном режиме дозирования субстратов-предшественников общий выход сополимера и содержание в нем мономеров ЗГВ и ЗГГ практически не зависели от количества добавок. Внутриклеточная концентрация сополимера была сниженной (38–44 %), однако при высоком суммарном содержании мономеров ЗГВ и ЗГГ (43,0–48,0 мол. %). Доля мономеров ЗГВ варьировала от 33,0 до 41,0 мол. %, мономеров ЗГГ – от 7,0 до 15,0 мол. %. При замене валерата пропионатом (рис. 3) общий выход П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) увеличился до 45–52 % при урожае биомассы не ниже 4,5–5,0 г/л. Содержание мономеров ЗГГ в сополимере составило от 12,0 до 16,0 мол. %, ЗГВ – 14,0–15,0 мол. %. Физико-химические свойства П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) изменялись аналогично сополимерам П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ). Для образцов также характерно снижение молекулярной массы по сравнению с гомополимером П(ЗГБ), но более значительное повышение полидисперсности, до 7,02, т.е. снижение M_w сопровождалось гетерогенностью полимера по величине молекулярной массы, в полимере наблюдали две фракции – низко- и высокомолекулярного полимера. Снижение степени кристалличности 3-компонентных П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) было менее выражено (максимально до 43–47 %), что связано, по всей видимости, с невысокими включениями мономеров ЗГГ (от 12 до 16 мол. %) и доминированием высококристаллических мономеров 3-гидроксипропионата. Сопоставление полученных результатов с опубликованными затруднительно в силу ограниченности информации об этом типе ПГА. С использо-



Рис. 3. Синтез 3-компонентных сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) в культуре *C. necator* B10646 при концентрациях пропионата калия 0,5, 0,7 и 1,0 г/л

Fig. 3. Synthesis of the P(3NB/3NV/3NHx) terpolymers in a culture of *C. necator* B10646 at concentrations of potassium propionate 0.5, 0.7, and 1.0 g/L

ванием в качестве субстрата роста фруктозы и добавок жирных кислот (пропионат и бутират) в культуре рекомбинантного штамма *Ralstonia* показана возможность синтеза сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) с содержанием мономеров ЗГВ (от 12 до 36 мол. %) и ЗГГ (от 10 до 22 мол. %) при крайне низких показателях урожая биомассы бактерий (0,8–1,5 г/л) (Jung et al., 2019). Известна неудачная попытка синтеза П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) метанотрофными бактериями *Methylocystis parvus* ОВВР на метане (Myung et al., 2017) при общем выходе сополимера на уровне 48 % при минорном содержании мономеров 4 ГВ и 6ГГ соответственно 1,0 и 1,4 мол. %.

Синтез и свойства четырехкомпонентных ПГА

Относительно возможности синтеза и свойств 4-компонентных ПГА информация ограничена. Доступные публикации содержат описание 4-компонентных ПГА, не имеющих в составе мономеров 4-гидроксibuтирата и 3-гидроксигексаноата, получению и исследованию которых посвящена

настоящая работа. Так, в конце 90-х годов прошлого столетия была описана способность бактерий *Pseudomonas putida* PGA1 синтезировать многокомпонентные ПГА, содержащие среднецепочечные мономеры с четной длиной C-цепи (C_6 , C_8 , C_{10} , C_{12} , C_{14}) при росте на омыленных производных пальмового масла и жирных кислот (Tan et al., 1997). В работах (Abe et al., 1998; Fukui & Doi, 1998; Matsusaki et al., 2000) показано, что рекомбинантные штаммы *Pseudomonas* с клонированными генами синтеза короткоцепочечных ПГА из *Ralstonia* способны синтезировать сополимеры 3-гидроксibuтирата с разнообразными среднецепочечными мономерами, механические свойства которых близки низкоплотному полиэтилену. С использованием рекомбинантного штамма *Ralstonia eutropha* ПГБ-4 с геном синтазы из *Pseudomonas* sp. (PhaC1Ps), который культивировали на комплексном углеродном субстрате, содержащем набор различных предшественников, синтезированы 4-компонентные ПГА, содержащие в основном мономеры ЗГБ (92-99 мол. %) и минорные включения мономеров 5-фенилва-

лерата, 4-метилвалерата, 3-фенилгексаноата (Mizuno et al., 2014).

В культуре бактерий *C. necator* B10646 с регламентированной подачей субстратов – предшественников удалось синтезировать 4-компонентные ПГА, в составе которых, помимо мономеров ЗГБ, ЗГВ и 4ГБ, содержатся макровключения мономеров 3-гидроксигексаноата (ЗГГ) при наличии в среде трех субстратов-предшественников (пропионата, γ -бутиролактона и гексаноата). В связи с возможным усилением токсичности при сочетанной подаче в культуру сразу трех субстратов-предшественников пропионат калия и γ -бутиролактон вносили на 24 ч культивирования, а гексаноат калия – на 36 ч эксперимента. Концентрация разовой дозы последнего варьировала от 0,1 до 0,5 г/л. Подачу пропионата для синтеза мономеров ЗГВ осуществляли в концентрации 0,5 и 1,0 г/л (рис. 4).

С увеличением концентрации вносимого в культуру *C. necator* B10646 γ -бутиролактона от 2 до 4 г/л содержание мономеров 4ГБ в П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ) увеличивалось. Максимальное включение 4ГБ

(12,3 мол. %) зарегистрировано при подаче в культуру γ -бутиролактона в концентрации 4 г/л и пропионата 1 г/л. Однако при этом общий выход сополимера (50 %) и урожай биомассы (3,5-4,0 г/л) были ниже, чем при синтезе 3-компонентных ПГА. С увеличением концентрации пропионата, вносимого в культуру, от 0,5 до 1,0 г/л содержание мономеров ЗГВ возросло от 4,5 до 24,6 мол. %. Увеличение концентрации вносимого в культуру гексаноата до 0,5 г/л сопровождалось незначительным возрастанием фракции ЗГГ (до 3,8-4,8 мол. %).

При варьировании концентрации субстратов-предшественников в культуре *C. necator* B10646 синтезирована серия четырехкомпонентных ПГА с содержанием ЗГБ от 63,5 до 89,7 мол. %; ЗГВ от 4,5 до 24,6, 4ГБ от 2,4 до 12,3 и ЗГГ от 0,4 до 4,8 мол. %. Наличие мономеров ЗГВ, 4ГБ и ЗГГ в 4-компонентных сополимерах в различном соотношении подтверждено хроматограммой с масс-спектрами (рис. 5). Результаты сравнительного исследования физико-химических свойств четырехкомпонентных ПГА, образованных

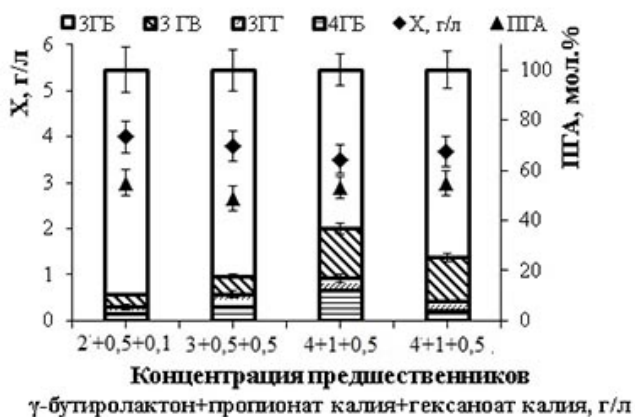


Рис. 4. Синтез 4-компонентных сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ) в культуре *C. necator* B10646 при различных концентрациях γ -бутиролактона, пропионата калия и гексаноата калия

Fig. 4. Synthesis of the P(3HB/3HV/4HB/3HHx) quaterpolymers in the culture of *C. necator* B10646 at various concentrations of γ -butyrolactone, potassium propionate, and potassium hexanoate

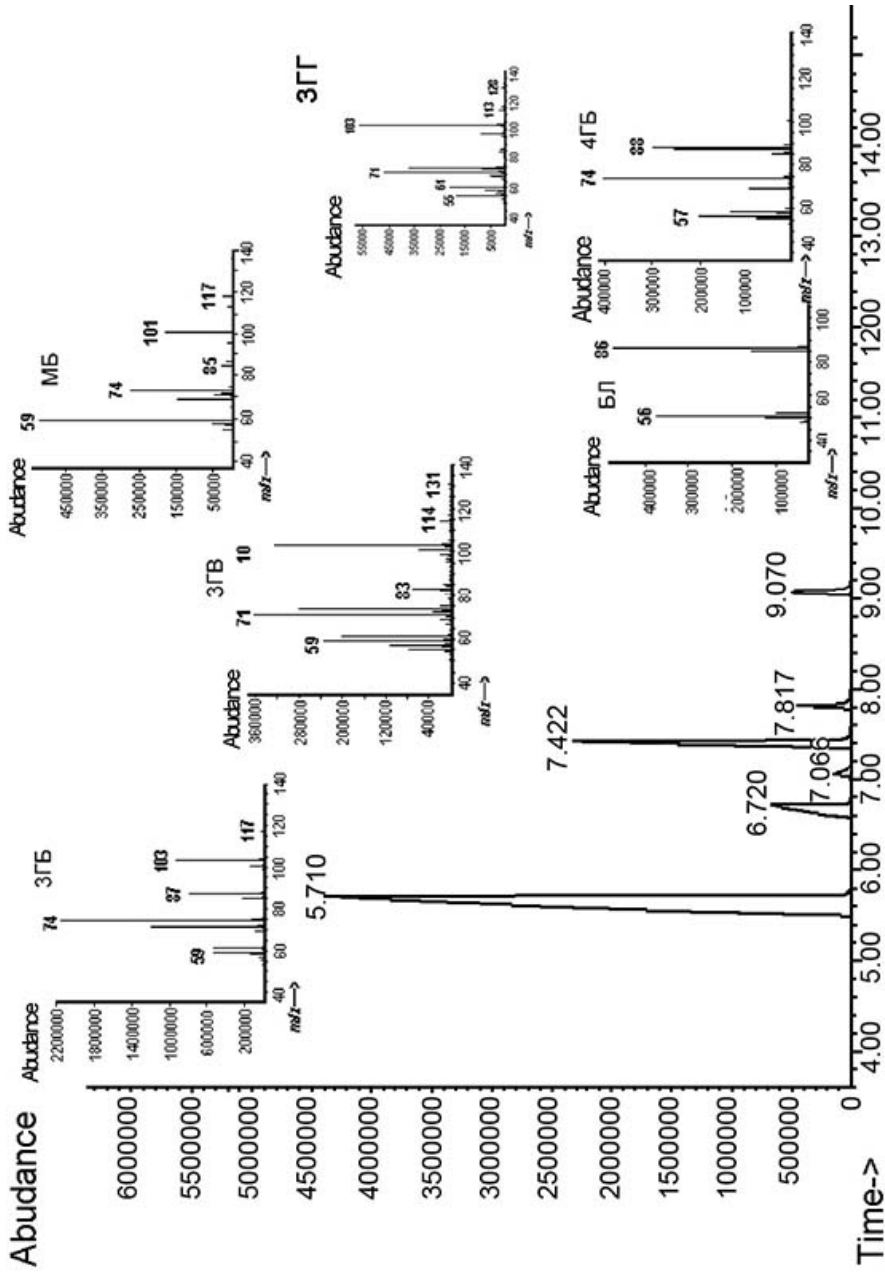


Рис. 5. Ионная хроматограмма с масс-спектрами метиловых эфиров мономеров, входящих в состав П(3ГБ/3ГВ/4ГБ/3ГГ), с временами удерживания: метил-3-гидроксибутират (3ГБ) – 5,710; бутиролактон (БЛ) – 6,720; метил-4-метоксибутират (МБ) – 7,066; метил-3-гидроксивалерат (3ГВ) – 7,422; метил-4-гидроксибутират (4ГБ) – 7,817; метил-3-гидроксигексаонат (3ГГ) – 9,070 мин. Содержание мономеров 3ГБ – 63,5 мол. %, 3ГВ – 19,4 мол. %, 4ГБ – 12,3 мол. %, 3ГГ – 4,8 мол. %

Fig. 5. Ion chromatogram with mass spectra of methyl esters of monomers contained in P(3НВ/3НУ/4НВ/3ННх) with retention times: methyl-3-hydroxybutyrate (3НВ) - 5.710; butyrolactone (БЛ) - 6.720; methyl-3-hydroxyvalerate (3НВ) - 7.066; methyl-3-hydroxybutyrate (3НВ) - 7.422; methyl-4-hydroxybutyrate (4НВ) - 7.817; methyl-3-hydroxyhexanoate (3ННх) - 9.070 min. The contents of monomers: 3НВ - 63.5 mol.%, 3НУ - 19.4 mol.%, 4НВ - 12.3 mol.%, 3ННх - 4.8 mol.%

Таблица 2. Химический состав и физико-химические свойства 4-компонентных ПГА П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ) с различным соотношением мономеров ЗГБ, ЗГВ, 4ГБ и ЗГГ

Table 2. The chemical composition and physicochemical properties of the P(3NB/3NV/4NB/3NHx) quaterpolymers with different proportions of 3NB, 3NV, 4NB, and 3NHx monomers

№	Состав ПГА, мол. %				M _в , кДа	M _с , кДа	ПД	C _х , %	T _{стекл} , °C	T _{крист} , °C	T _{пл} , °C	T _{дегр} , °C
	ЗГБ	ЗГВ	4ГБ	ЗГГ								
	100,0	0,0	0,0	0,0	920	368	2,5	76	-	-	178	295
1	89,7	4,9	2,9	2,5	787	178	4,5	42	-0,7	53	168	295
2	86,5	4,5	8,6	0,4	554	183	3,0	45	-	-	169	297
3	85,2	7,4	5,3	2,1	562	121	4,6	36	-4,7	75	167	295
4	83,2	7,0	8,5	1,3	814	133	6,1	41	-3,2	62	165	296
5	77,5	19,6	2,4	0,5	817	223	3,7	37	-1,3	69	171	297
6	74,7	17,8	3,7	3,8	542	126	4,3	37	-2,3	56	173	287
7	63,5	19,4	12,3	4,8	439	72	6,1	30	-8,6	84	168	299

Примечание: «-» – не обнаружено, M_в – средневесовая молекулярная масса, M_с – среднечисловая молекулярная масса, ПД – полидисперсность, C_х – степень кристалличности, T_{стекл} – температура стеклования, T_{крист} – температура кристаллизации, T_{пл} – температура плавления, T_{дегр} – температура термической деградации.

мономерами ЗГБ, ЗГВ, 4ГБ и ЗГГ, в которых доминирующими были мономеры ЗГБ, а суммарное содержание трех других мономеров варьировало от 10,3 до 36,5 мол. %, представлены в табл. 2.

Исследование молекулярно-массовых характеристик 4-компонентных ПГА показало отсутствие четкой связи между химическим составом и величинами M_в и M_с. Разброс значений для средневесовой и среднечисловой молекулярных масс составил 439 – 817 и 72 – 223 кДа соответственно. В целом, эти показатели у исследованных 4-компонентных образцов ниже, чем у гомополимерного П(ЗГБ) (920 и 368 кДа). Снижение содержания мономеров ЗГБ в сополимере до 63,5 мол. % сопровождалось падением молекулярных масс у образца (M_в – 439 и M_с – 72 кДа), что ниже данных показателей у гомополимера в 2 и 5 раз соответственно (образец № 7, табл. 2).

При исследовании температурных характеристик сополимеров показано снижение T_{пл} относительно гомополимера (178 °C)

и варьирование в пределах 165–173 °C. T_{дегр} у сополимеров (287–299 °C) была сопоставима с таковой у П(ЗГБ) – 295 °C. Определение термических характеристик 4-компонентных ПГА подтвердило наличие разрыва между T_{пл} и T_{дегр} у разных образцов, который сохранялся у всех исследуемых образцов и составлял 117–125 °C (табл. 2). Относительно невысокое содержание в сополимере мономеров ЗГВ, 4ГБ, ЗГГ для синтезированных образцов П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ) обеспечило снижение значений степени кристалличности C_х (30–45 %).

Заключение

Реализованы режимы культивирования бактерий *S. necator* В10646 при контролируемой подаче в состав ростовой среды субстратов-предшественников, обеспечивших продуктивный синтез трех- П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ), П(ЗГБ/ЗГВ/4ГГ) и четырехкомпонентных сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ) новой структуры с различным соотношением и макровключениями мономеров, отличных от ЗГБ.

Исследованы физико-химические свойства сополимеров. Показано снижение у всех сополимерных образцов молекулярно-массовых характеристик без четкой связи с составом сополимеров и сохранение термостабильности при разрыве между $T_{пл}$ и $T_{дегр}$ не менее 100-110 °C. Включение мономеров, отличных от 3ГБ, в полимерную С-цепь вызывало изменение соотношения кристаллической и аморфной фаз и аморфизацию полимера при значительном снижении степени кристалличности, до 9–17 % у трехкомпонентных П(3ГБ/3ГВ/4ГБ) и до 30–36 % у четырехкомпонентных П(3ГБ/3ГВ/4ГБ/3ГТ).

Список литературы / References

Abe H., Doi Y., Aoki H., Akehata T. (1998) Solid-state structures and enzymatic degradability for melt-crystallized films of copolymers of (*R*)-3-hydroxybutyric acid with different hydroxyalkanoic acids. *Macromolecules*, 31(6): 1791-1797

Aziz N.A., Huong K.H., Sipaut C.S., Amirul A.A. (2017) A fed-batch strategy to produce high poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer yield with enhanced mechanical properties in bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(11): 1643–1656

Bonartsev A., Yakovlev S., Boskhomdzhev A., Zharkova I., Bagrov D., Myshkina V., Mahina T., Kharitonova E., Samsonova O., Zernov A., Zhuikov V., Efremov Y., Voinova V., Bonartseva G., Shaitan K. (2013) The terpolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B: effect of surface properties on cell attachment. *PLoS One*, 8(2): e57200

Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Mahina T.K., Voinova V.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. (2017) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by *Azotobacter chroococcum* 7B: A precursor feeding strategy. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(2): 173–184

Cavalheiro J.M.B.T., Pollet E., Diogo H.P., Cesario M.T., Averous L., de Almeida M.C.M.D., da Fonseca M.M.R. (2013) On the heterogeneous composition of bacterial polyhydroxyalkanoate terpolymers. *Bioresource Technology*, 147: 434-441

Chanprateep S., Kulpreecha S. (2006) Production and characterization of biodegradable terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(1): 51-56

Cheema S., Bassas-Galia M., Sarma P.M., Lal B., Arias S. (2012) Exploiting metagenomic diversity for novel polyhydroxyalkanoate synthases: production of a terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate-co-3-hydroxyoctanoate) with a recombinant *Pseudomonas putida* strain. *Bioresource Technology*, 103(1): 322-328

Chen G.Q., Jiang X.R., Guo Y. (2016) Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA). *Synthetic and Systems Biotechnology*, 1(4): 236-242

Chen G.Q. (2010) Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. *Plastics from bacteria: natural functions and applications*. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 17–37

Fukui T., Doi Y. (1998) Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plants oils by *Alcaligenes eutrophus* and recombinant strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(3): 333-336

Green P.R., Kemper J., Schechtman L., Guo L., Satkowski M., Fiedler S., Steinbuchel A., Rehm B.H.A. (2002) Formation of short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid beta-oxidation inhibited *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules*, 3(1): 208-213

Han J., Wu L.P., Liu X.B., Hou J., Zhao L.L., Chen J.Y., Zhao D.H., Xiang H. (2017) Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers. *Biomaterials*, 139: 172-186

Jung H.R., Jeon J.M., Yi D.H., Song H.S., Yang S.Y., Choi T.R., Bhatia S.K., Yoon J.J., Kim Y.G., Brigham C.J., Yang Y.H. (2019) Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolymer production from volatile fatty acids using engineered *Ralstonia eutropha*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138: 370-378

Koller M. (2019) Polyhydroxyalkanoate biosynthesis at the edge of water activity haloarchaea as biopolyester factories. *Bioengineering (Basel)*, 6(2): 34

Kucera D., Novackova I., Pernicova I., Sedlacek P., Obruca S. (2019) Biotechnological production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379. *Bioengineering (Basel)*, 6(3): 74

Laycock B., Halley P., Pratt S., Werker A., Lant P. (2013) The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, 38(3-4): 536–583

Matsusaki H., Abe H., Taguchi K., Fukui T., Doi Y. (2000) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas* sp. 61-3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(4): 401-409

Mizuno S., Katsumata S., Hiroe A., Tsuge T. (2014) Biosynthesis and thermal characterization of polyhydroxyalkanoates bearing phenyl and phenylalkyl side groups. *Polymer Degradation and Stability*, 109: 379-384

Myung J., Flanagan J.C.A., Waymouth R.M., Criddle C.S. (2017) Expanding the range of polyhydroxyalkanoates synthesized by methanotrophic bacteria through the utilization of omega-hydroxyalkanoate co-substrates. *AMB Express*, 7: 118

Pignatello R., Musumeci T., Impallomeni G., Carnemolla G.M., Puglisi G., Ballistreri A. (2009) Poly(3-hydroxybutyrate-co- ϵ -caprolactone) copolymers and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co- ϵ -caprolactone) terpolymers as novel materials for colloidal drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37: 451-462

Polyhydroxyalkanoate (PHA) market by type, manufacturing technology & application – global forecast to 2021 – research and markets. Research and markets – Jul 26, 2017. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/pha-market-395.html>

Ramachandran H., Iqbal N.M., Sipaut C.S., Abdullah A.A. (2011) Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer with various monomer compositions by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(6): 867-877

Schlegel H.G., Gottschalk G., Von Bartha R. (1961) Formation and utilization of poly- β -hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature*, 191: 463-465

Shozui F., Matsumoto K., Nakai T., Yamada M., Taguchi S. (2010) Biosynthesis of novel terpolymers poly(lactate-co-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)s in lactate-overproducing mutant *Escherichia coli* JW0885 by feeding propionate as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4): 949-954

Singh A.K., Srivastava J.K., Chandel A.K., Sharma L., Mallick N., Singh S.P. (2019) Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into

recent advances, bottlenecks, and solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(5): 2007-2032

Sudesh K., Abe H., Doi Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10): 1503-1555

Tan I.K.P., Kumar K.S., Theanmalar M., Gan S.N., Gordon B. (1997) Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(3): 207-211

Tarrahi R., Fathi Z., Seydibeyoglu M.O., Doustkhah E., Khataee A. (2020) Polyhydroxyalkanoates (PHA): from production to nanoarchitecture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146: 596-619

Volova T.G., Kalacheva G.S., Kozhevnikov I.V., Steinbüchel A. (2007) Biosynthesis of multicomponent polyhydroxyalkanoates by *Wautersia eutropha*. *Microbiology*, 76(6): 704–711

Volova T.G., Kalacheva G.S., Steinbuechel A. (2008) Biosynthesis of multi-component polyhydroxyalkanoates by the bacterium *Wautersia eutropha*. *Macromolecular Symposia*, 269: 1-7

Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sinsky A.J. (2013) *Degradable polymers: Production, properties, applications*. NY, Nova Science Pub. Inc., 380 p.

Volova T.G., Vinnik Yu.S., Shishatskaya E.I., Markelova N.M., Zaikov G.E. (2017) *Natural-based polymers for biomedical applications*. Canada, Apple Academic Perss, 460 p.