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

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Т.Г. Волова

« _____» _____2020г

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Синтез поли(3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутирата) бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 в присутствии различных предшественников 4-гидроксибутирата

Направление подготовки 06.04.01 – Биология
Профиль 06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель _____ подпись, дата к.б.н., доцент Н.О. Жила

Выпускник _____ подпись, дата В. С. Безбидо

Рецензент _____ подпись, дата к.б.н., доцент А.Н. Бояндин

Красноярск, 2020

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Синтез поли(3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутирата) бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 в присутствии различных предшественников 4-гидроксибутирата» содержит 63страниц текстового документа, 39 графика2 таблицы, 58использованных источника.

ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ,*CUPRIAVIDUSNECATOR*B-10646, 4-ГИДРОКСИБУТИРАТ, СУБСТРАТЫ, БИОМАССА.

Объект исследования – *Cupriavidus necator* B-10646.

Цель работы:

- исследование роста бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 и синтез полимера, содержащего 4-гидроксибутират, используя различные предшественники синтеза мономера 4ГБ.

Задачи работы:

1. Исследовать накопление биомассы и полимера бактериями *C. necator* B-10646 в присутствии различных концентраций субстратов-предшественников синтеза мономеров 4-гидроксибутирата: ε-капролактона, 1,4-бутандиола, 1,6-гександиола и 4-хлормасляной кислоты.

2. Исследовать влияние различных комбинаций субстратов на накопление биомассы, синтез полимера и включение 4ГБ.

3. Изучить физико-химические свойства синтезированных двухкомпонентных сополимеров П(3ГБ/4ГБ) с различным содержанием 4ГБ, а также структуру поверхности пленок, изготовленных их этих сополимеров.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение 4
1. Обзор литературы 6
1.1 ПГА: характеристика, свойства 6
1.2. Синтез ПГА 7
1.3. Строение ПГА и их классификация 8
1.4. Мономерные звенья в полимерах 9
1.4.1 Характеристика 3ГБ мономера 9
1.4.2 Характеристика 4ГБ мономера 9
1.5 Характеристика сополимера П(3ГБ/4ГБ) 10
1.6 Свойства П(3ГБ/4ГБ) 11
1.7 Синтез П(3ГБ/4ГБ) 12
1.7.1 Использование предшественников 16
1.7.2 Использование технологии смешанных субстратов 19
1.7.3 Использование мутантных штаммов 22
1.7.4 Использование *Cupriavidus necator* B10646 23
2 Материалы и методы 24
2.1 Объект исследования 24
2.2 Культивирование бактерий 24
2.3 Измерение параметров процессов 25
2.4 Определение добавок в среде 26
2.5 Анализ структуры ПГА 28
2.6 Анализ молекулярного веса ПГА 28
2.7 Изготовление плёнок 29
2.8 Исследование структуры поверхности пленок 29
2.9 Определение температуры плавления полимера 29
2.10 Определение степени кристалличности полимера 29
2.11 Исследование микроструктуры поверхности мембран 30
2.12 Статистическая обработка данных 30
3 Результаты и обсуждения 31
ВЫВОДЫ 32
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 33

Введение

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластические полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными элементами (например, азотом, фосфором) и при избыточном содержании источника углерода. В последние годы изучению ПГА уделяется огромное внимание благодаря их потенциальному применению в различных областях – медицине, фармакологии, сельском и коммунальном хозяйстве, пищевой и косметической промышленности, радиоэлектронике и других сферах, так как по сравнению с обычными пластиками, получаемыми из нефти, ПГА разрушаются в аэробных/анаэробных условиях и являются биосовместимыми материалами.

Одним из самых распространённых полимеров среди ПГА является П3ГБ, однако он является высококристалличным полимером, хрупким и малоустойчивым к растяжению. Недостаточные эластичность и термостабильность П3ГБ затрудняют процессы его переработки, что ограничивает возможные области применения.

Одним из перспективных типов ПГА является сополимер 3-гидроксибутирата/4-гидроксибутирата. Включение мономера 4ГБ резко изменяет свойства полимеров от высокомолекулярных и кристаллических до высокопластичных и гибких. Этот сополимер имеет более высокий предел прочности на разрыв в отличие от большинства известных ПГА. Сополимер П(3ГБ/4ГБ) признан многообещающим биоматериалом для применения в медицине и фармацевтической промышленности. На основе данных сополимеров созданы: раневые покрытия; хирургические нити, сетки и пленки. Этот гибкий материал, который легко обрабатывается для образования лекарственных носителей и клеточных скаффолдов. Ожидается, что он будет использоваться в качестве замены нефтехимических пластмасс, включая упаковочные пленки, газовые фильтры.

Однако, синтез сополимера П(3ГБ/4ГБ) представляет собой сложную задачу биотехнологии, так как требуется, чтобы культуральная среда содержала дополнительные источники углерода – предшественники целевых мономеров, большинство из которых ингибирует рост микроорганизмов. Следовательно, концентрация биомассы клеток и выходы ПГА снижаются. Эффекты токсичности предшественников могут быть сведены к минимуму с использованием различных стратегий: подходящего времени добавления, концентрации и режима добавления предшественника.

Цель работы: Исследование роста бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 и синтез полимера, содержащего 4-гидроксибутират, используя различные предшественники синтеза мономера4ГБ.

Задачи:

1. Исследовать накопление биомассы и полимера бактериями *C. necator* B-10646 в присутствии различных концентраций субстратов-предшественников синтеза мономеров 4-гидроксибутирата: ε-капролактона, 1,4-бутандиола, 1,6-гександиола и 4-хлормасляной кислоты.

2. Исследовать влияние различных комбинаций субстратов на накопление биомассы, синтез полимера и включение 4ГБ.

3. Изучить физико-химические свойства синтезированных двухкомпонентных сополимеров П(3ГБ/4ГБ) с различным содержанием 4ГБ, а также структуру поверхности пленок, изготовленных их этих сополимеров.

1. Обзор литературы

1.1ПГА: характеристика,свойства

Научно-технический прогресс привел к множеству великих изобретений и инноваций, которые сформировали мир, в котором мы живем сегодня. Открытие и использование легких, долговечных и недорогих пластмасс было одним из таких нововведений, которые улучшили образ жизни и уровень жизни людей во всем мире. Однако эти синтетические пластмассы стали основным источником твердых бытовых отходов. Их особенности, заключающиеся в неразлагаемости, высоком спросе и использовании практически в каждом секторе, а также их накопление,создали бесконечную циркуляцию пластмасс, которая является проблематичной для окружающей среды. Открытие биоразлагаемых полимеров, к которым относятся ПГА, позволит избавиться от этой проблемы[1].

ПГА синтезируются прокариотическими микроорганизмами в специфических условиях при несбалансированном росте в качестве эндогенного депо энергии и углерода и накапливаются в цитоплазме в виде тел включения (гранулы ПГА),количество которых в клетке и их размеры могут существенно варьировать в зависимости от условий роста микроорганизмов и его систематической принадлежности [2], [3]. Гранулы заключены в мембрану толщиной 2-4 мкм и на 98% состоят из полимера [4]. ПГА выполняют ключевые функции в защите клеток от стрессовых условий окружающей среды, таких как экстремальные температуры, воздействие окислителей, органических растворителей и УФ-облучения [5, 6].

Основными возобновляемыми источниками углерода для синтеза ПГА могут быть

-сахара (глюкоза, фруктоза);

-органические кислоты;

-спирты;

-смеси CO_2 и H_2;

-продукты гидролиза растительного сырья;

-различные масла (оливковое, кукурузное, соевое, рапсовое, пальмовое, подсолнечное) [7].

Классически ПГА получают из ценных субстратов [8], что может вызвать серьезные этические конфликты, учитывая огромное количество людей, голодающих во всем мире [9,10]. Использование дешевых источников углерода, созданных из промышленных или сельскохозяйственных побочных продуктов, может обеспечить снижение цены на ПГА, а также решить существующие проблемы утилизации отходов [11]. Для этой цели используют липиды, агропромышленные отходы, такие как продукты гидролиза целлюлозы, крахмала, неочищенную глицериновую фазу (НГФ) от

производства биодизеля [12], липиды молочной сыворотки, спирты, такие как метанол, метан [13].В случае производства ПГА из отходов промышленностей, возникает проблема выбора бактерии, которые должны быть не только превосходными производителями ПГА, но и обладать ферментативными свойствами, позволяющими гидролизовать сложные соединения. Такие микробы могут быть получены по двум стратегиям: (1) выделение, отбор и характеристика новых природных микробных штаммов, способных эффективно превращать субстраты в ПГА или (2) инженерно сконструированные бактерии, проявляющие высокий выход ПГА. В практике используется преимущественно вторая стратегия, т.к. редко обнаруживается, что выделенный в природе микроорганизм является прекрасным производителем ПГА и подходит для промышленного процесса [14].

ПГА обладают спектром полезных свойств, среди которых наиболее значимыми являются способность разрушаться в биологических средах до безвредных для окружающей среды продуктов и высокая биологическая совместимость с клетками и тканями макроорганизмов. ПГА – биологический аналог синтетических полиолефинов, предназначенный для их постепенной замены в различных сферах [15]. Масштабы производства и стоимость этих полимеров определяют возможные области применения (сельское и коммунальное хозяйство, восстановительная медицина, фармакология) [16].

Свойства ПГА зависят от строения боковых групп в полимерной цепи, а также от расстояния между эфирными группами в молекуле [17]. На базе ПГА имеется принципиальная возможность получения спектра материалов с различными физико-механическими свойствами, от высококристалличных термопластов до термостабильных эластомеров [18].

1.2. Синтез ПГА

Внутриклеточный метаболизм ПГА носит циклический характер, и в клетке одновременно, но с разными скоростями, происходят процессы синтеза и разрушения полимера [19].

В биосинтезе ПГА участвуют три фермента – β-кетотиолаза (КТ), ацетоацетил-КоА-редуктаза (АА-КоА-редуктаза) и ПГА-синтаза, которые кодируются генами phbA, phbB, phbC, соответственно, образуя один оперон, phbCAB. Активность β-кетотиолазы в бактериях, выращенных в условиях лимитирования роста азотом или углеродом, одинакова, что позволило авторам сделать вывод о конститутивном характере синтеза этого фермента [19].

ПГА-синтаза является ключевым и наиболее изученным ферментом биосинтеза полимера, определяющая тип ПГА. В настоящее время описано более 50 структурных генов синтаз, выделенных из разных микроорганизмов.

Все ПГА-синтазы различаются субстратной специфичностью и первичной структурой.

В клетке ПГА-синтаза находится в двух формах – растворимой и связанной с гранулами полимера. В условия лимита по углероду*Cupriavidus necator (*ранее*A. eutrophus, Ralstoniaeutropha, Wautersiaeutropha)* синтезирует преимущественно растворимую форму фермента, при переносе культуры в условия лимита по азоту активность растворимой ПГА-синтазы резко падает и в клетках в основном определяют гранулозависимую форму фермента. При этом суммарная активность фермента остается на одном и том же уровне [20].

1.3. Строение ПГА и их классификация

В зависимости от строения С-цепи мономеров, образующих ПГА, они подразделены на три группы полимеров: короткоцепочечные, образованные мономерами с длиной С-цепи от C_3 до C_5; среднецепочечные (C_6–C_{16}) и длинноцепочечные (C_{17} и выше) [16].

В зависимости от набора мономеров, образующих полимеры, ПГА классифицируют как гомополимеры, состоящие только из одного типа мономера; гетерополимеры, состоящие из двух или более типов мономеров, отличающихся своими боковыми цепями (сополимеры); или, как и вбоковых цепях, так и в основных цепях (терполимеры)[21]. Изменение состава ПГА на мономерном уровне дает возможность тонкой настройки свойств полимера (температураплавления T_{melt}, температура стеклования T_g, степень кристалличности X_c, разлагаемость, удлинение при разрыве или прочность на растяжение) [22].

Поли(3гидроксибутират) П3ГБ был первым ПГА, идентифицированным и выделенным из *Bacillussp*. С тех пор в химической структуре ПГА было изучено и описано более 150 отдельных мономеров[16].

П3ГБ –высококристалличныйполимер (степень кристалличности – свыше 70%). Недостаток этого типа ПГАзаключается в том, что он не кристаллизуется упорядоченно, его весьма сложно перерабатывать в изделия, которые характеризуются низкой ударной прочностью и жесткостью [18].

Особо перспективными, но трудносинтезируемыми ПГА, являются сополимеры, обладающие свойствами эластомеров, содержащие в своем составе помимо 3ГБ мономера 4-гидроксибутират (4ГБ). Сополимеры П(3ГБ/4ГБ) характеризуются более низкими значениями степени кристалличности, температуры плавления и термической деградации [23].

1.4. Мономерные звенья в полимерах

1.4.1 Характеристика 3ГБ мономера

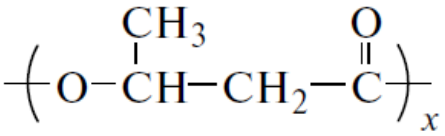

Рисунок 1 – Структурная формула 3-гидроксибутирата

Доминирующим мономером в ПГА, синтезируемых природными штаммами *R. eutropha*, является короткоцепочечный 3-гидроксибутират, выходы которого могут достигать в специализированных режимах до 80–90% от веса сухой биомассы[24]. Химический состав П3ГБ был сообщен Lemoneeще в 1925 г [25] (Рисунок 1). Для промышленного применения было выделено несколько высокопродуктивных и перспективных микроорганизмов, эффективно синтезирующих П3ГБ: *Cupriavidus necator* (ранее *A. eutrophus, Ralstoniaeutropha, Wautersiaeutropha*), *Alcalygeneslatus(*ранее*Alcaligeneslatus),* азотфиксаторы *Azotobactervinelandii, Pseudomonasoleovorans, Comamonastestosteronii, Chromobacterimsp., Rhodococcusrubber*[26]. Однако П3ГБ является полукристаллическим, жестким и хрупким материалом (около 3,5 ГПа модуль Юнга, прочность на растяжение около 43 МПа) с высокой температурой плавления (178°C) и низкой эластичностью (растяжение на разрыв около 5%, тогда как для изотактического полипропилена это значение составляет 400%) [2].

Из-за своей хрупкости и высокой температуры плавления, близкой к температуре термического разложения, П3ГБ имеет препятствия для технологической обработки [27]. В последние годы были предложены многочисленные стратегии для преодоления этих недостатков, например, с использованием пластификаторов, добавления термических и антиоксидантных стабилизаторов, модификации полимерной цепи или смешивания с другими биополимерами [28], [29], [30].

1.4.2Характеристика 4ГБ мономера

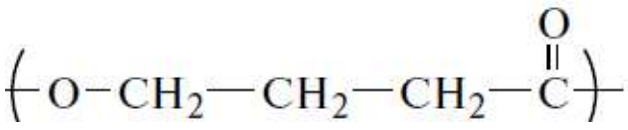

Рисунок 2 – Структурная формула 4-гидроксиутирата

Мономер 4ГБ структурно отличается от мономера 3ГБ (Рисунок 2).Для него характерно отсутствие алкильной боковой группы, присоединенной к полимерной основе. Согласно Уильямсу и Мартину, для П4ГБ характерно большее расстояние между сложноэфирными группами по сравнению с П3ГБв полимерной основной цепи. Это резко изменяет свойства от высокомолекулярных и кристаллических у П3ГБ до высокопластичных и гибких у П4ГБ. Таким образом, гомополимер П4ГБможно гидролизовать не только с помощью деполимераз, но также с помощью различных липаз и эстераз из разных микроорганизмов [31].

Среди разнообразия полученных полимеров (4ГБ) гомополимер или его сополимер представляют интерес для различных биомедицинских применений. Это прочныйгибкий, термопластичный материал, который легко обрабатывается для образования каркасов, сердечных клапанов или сердечно-сосудистой ткани[32], [33].

1.5Характеристика сополимера П(3ГБ/4ГБ)

СополимерП(3ГБ/4ГБ) способны синтезировать представители таксонов: *Cupriavidus,Comamonas, Hydrogenophaga, Chromobacterim, Rhodococus* при росте на средах, содержащих сопутствующие субстраты [18].

Сополимер П(3ГБ/4ГБ) представляет собой ПГА с короткой цепью. Синтез данного сополимера протекает,под действием ПГА-синтазы которая сополимеризует метаболически продуцируемые 3ГБ и 4ГБ мономеры (Рисунок 3).

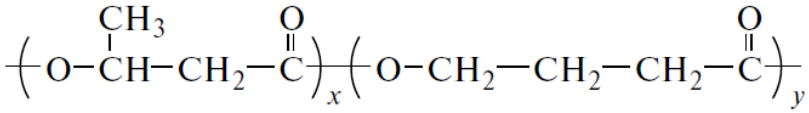

Рисунок 3 – Структурная формула П(3ГБ/4ГБ)

Включение мономеров 4ГБ в полимерную цепьиндуцируется добавлением источников углерода в среду, которая включает: γ-бутиролактон, 4-гидроксимасляную кислоту, 1,4-бутандиол, 1,6- гександиол, 1,8-октандиол, 1,10-декандиол, 1,12-додекандиол и т.д. Однако эти источники углерода приводят к синтезу не только гомополимера П4ГБ, но и сополимера П(3ГБ/4ГБ) благодаря тому, что включаются в мономеры 3ГБ. Это объясняется тем, что 4-гидроксимасляная кислота также может быть катаболизирована до 3-гидроксибутирил-КоА [34].

С увеличением содержания мономеров 4ГБ в П(3ГБ/4ГБ) возрастает эластичность получаемых изделий и их привлекательность для получения биоразрушаемых пленочных раневых покрытий. В работе Н.В Боровковой

ссоавт. (2016) разработаны и охарактеризованы экспериментальные раневые покрытия в виде гладких наливных пленок и нетканых мембран, сформированных ориентированными и неориентированными ультратонкими волокнами, полученных методом электростатического формования растворов сополимера П(3ГБ/4ГБ). Было показано, что пленочные образцы и нетканые мембраны из П(3ГБ/4ГБ) пригодны для конструирования биотрансплантатов в качестве раневых покрытий[35].

Следует отметить, что деградация П(3ГБ-со-4ГБ) высвобождает 3-гидроксибутановую кислоту и 4-гидроксибутановую кислоту, которые присутствуют в телах млекопитающих в виде природных метаболитов. Это объясняется его использованием в медицинских и фармацевтическойпромышленности [31].

Благодаря своим физическим и механическим свойствам(более низкие температуры плавления и стеклования по сравнению с гомополимером П3ГБ, что является следствием снижении хрупкости данных полимеров) П(3ГБ/4ГБ) считается одним из лучших ПГА и ожидается, что он будет использоваться в качестве заменынефтехимических пластмасс и биомедицинских материалов, включая упаковочные пленки, газовые фильтры, лекарственные носители и клеточные скаффолды[33].

На основе сополимеров, содержащих мономеры 4ГБ,компанией «Tepha» разработан зарегистрированный и одобренный FDA продукт Tepha FLEX®, используемый для создания коммерческих продуктов – хирургических нитей, сеток и пленок [36].

Этот биополимер был первым материалом на основе ПГА, одобренным для клинического применения в качестве рассасывающегося шовного материала. Opitz и его коллеги успешно произвели замену кровеносных сосудов аорты у овец, используя биоабсорбируемые каркасы на основе полимеров, в состав которых входит 4ГБ мономер.

1.6 СвойстваП(3ГБ/4ГБ)

П(3ГБ/4ГБ) – этот сополимер, являющийся эластомером, который имеет более высокие показатели удлинения при разрыве и относительновысокий предел прочности на разрыв в отличие отбольшинства известных ПГА. В одной из работ было показано, что самая высокая степень кристалличности (76 %) характерна для гомополимера П3ГБ; у сополимера П(3ГБ/4ГБ) – существенно ниже (39%) [23].Так же характерно, что наиболее активно разрушаются образцы сополимера П(3ГБ/4ГБ), имеющие самую низкую степень кристалличности, для которых зарегистрировано значительное падение молекулярной массы по мере разрушения [23].

Разброс данных по величине среднечисловой молекулярной массы (Mn) для сополимера 3ГБ с 4-гидроксибутиратом (4ГБ) с одинаковым соотношением звеньев мономеров значительно варьирует: например, для Mn образцов с содержанием 4ГБ порядка 23–24 мол. %приводятся значения от 104 до 590 кДа.

Важным свойством ПГА, определяющим условия получения изделий из расплавов, являются температуры плавления $T_{пл}$и термической деградации $T_{дегр}$. Гомополимер П3ГБ имеет$T_{пл}$ от 159 до 197°С.Исходя из литературных данных, $T_{пл}$ образцов сополимеров П(3ГБ/4ГБ) с содержанием звеньев 4ГБ от 2 до 7 мол. % может составлять от 114 до172°С. Понижение $T_{пл}$ до 40–54°С зарегистрировано при увеличении содержания 4ГБ в сополимере до 75–100 мол. %.

Сополимеры П(3ГБ/4ГБ), в отличие от П3ГБ являются высокоэластичными полимерами, у которых удлинение приразрыве составляет до 1000%, т.е. на два порядкавыше, чем у П3ГБ. Включение 4ГБ в полимерную цепь 3ГБ резко влияет на соотношение кристаллической и аморфной фаз всополимере, значительно понижая кристалличность последнего.

Значимым показателем, характеризующимгидрофильно/гидрофобный баланс поверхности, служит величина краевого угла смачивания водой. Измерение этой величины позволяетвычислить также такие важные характеристикиповерхности, как величину сил сцепления, поверхностное натяжение и свободную энергиюмежфазовой поверхности. Самое высокое значение краевого угла имеют мембраны, полученныеиз П3ГБ (70.0 ± 0.4°). Величина краевого угла поверхности мембран из сополимера П(3ГБ/4ГБ) ниже и составляет 57.4 ± 0.6° [18].

1.7СинтезП(3ГБ/4ГБ)

Синтез сополимеров ПГА представляет собой сложную задачу биотехнологии, так как обычно требуется, чтобы культуральная среда содержала дополнительные источники углерода – предшественники целевых мономеров, большинство из которых ингибирует рост микроорганизмов [37]. Следовательно, концентрация биомассы клеток и выходы ПГА снижаются [38], [39].

Трудности в достижении регулируемого и воспроизводимого синтеза сополимеров ПГА препятствуют накоплению данных о влиянии мономерной композиции на физико-химические свойства сополимеров ПГА[40]. Эффекты токсичности предшественников могут быть сведены к минимуму с использованием различных стратегий: подходящего времени добавления, концентрации и режима добавления предшественника [41].

В литературе достаточно информации о синтезе полимеров, содержащих в своем составе 4-гидроксибутират. Однако нет оптимальной стратегии, которая приводила бы к высокому накоплению биомассы бактериальных клеток и одновременно к синтезу полимера с высоким содержанием 4ГБ мономера. Это связано с ингибирующем действием субстратов-предшественников на рост микроорганизмов. В связи с этим в исследованиях по получению П(3ГБ/4ГБ) используются различные предшественники целевых мономеров, а в качестве организмов-продуцентов как природные, так и генетически сконструированные штаммы.Большинствонаучных статей содержат информацию об использовании различных предшественников для синтеза П(3ГБ/4ГБ) таких как: γ-бутиролактон, 1,6-гександиол, 1,4-бутандиол и т.д.

Возможный путь получения П(3ГБ/4ГБ) из сахаров и γ-бутиролактона в клетках бактерий включает превращение его в ацетил-КоА или 4-гидроксибутирил-КоА и метаболизм сахаров в ацетил-КоА по пути Энтнера Дудорова (гексозы) или через пентозофосфатный путь (пентозы). Во время метаболизма лактонное кольцоγ-бутиролактона открывается и превращается в 4-гидроксимасляную кислоту. Путь синтеза П(3ГБ/4ГБ) включает только частичную конверсию 4-гидроксимасляной кислоты в 4-гидроксибутирил-КоА. Основная фракция 4-гидроксимасляной кислоты катаболизируется далее до полуальдегида янтарной кислоты и превращается в ацетил-КоА, из которого синтезируется 3-гидроксибутирил-КоА. Аналогично включается в 4ГБ мономер 4-хлормасляная кислота и 1,4-бутандиол, предварительно превратившись в 4-гидроксибутират. Бактерии так же способны синтезировать П(3ГБ/4ГБ) в присутствии ε-капролактона в среде, лактонное кольцо которого в процессе метаболизма превращается в 3-гидроксибутирил-КоА и 4-гилроксибутирил-КоА. В качестве последнего шага 3-гидроксибутирил-КоА и 4-гидроксибутирил-КоА полимеризуются с образованием сополимера П(3ГБ/4ГБ) посредством действия ПГА-синтазы (Рисунок 4) [42].

В последнее время все чаще начали появляться работы, в которых для синтеза полимера с высоким содержанием 4ГБ мономера используются комбинации субстратов-предшественников.Включение субстрата в мономер 4ГБ можно объяснить в соответствии с его числом атомов углерода. Среди используемых углеродных источниковγ-бутиролактон, 4-хлормасляная кислота и 1,4-бутандиол имеют в своей структуре четыре атома углерода; тогда как 1,6-гександиол состоит из шести атомов углерода. Широко известно, что ω-алкандиолы с более длинной углеродной цепочкой и четным количеством атомов углерода окисляются в соответствующую ω-гидроксикислотную кислоту и КоА [34]. В этом случае 1,6-гександиол окисляется в 6-гидроксигексановую кислоту, а затем в 6-гидроксигексаноил-КоА. Образование 4-гидроксибутирил-КоА требует, чтобы 6-гидроксигексаноил-КоА с шестью атомами углерода восстановился до четырех атомов углерода. Восстановление

происходит через процесс β-окисления, в результате высвобождается два атома углерода в виде ацетил-КоА, который является важным промежуточным продуктом как для бактериального роста, так и для образования 3ГБ-мономера [37]. В одностадийном культивировании, включающем одновременный рост бактерий и синтез П(3ГБ/4ГБ), ацетил-КоА имеет жизненно важное значение для инициирования роста клеточной массы. Кроме того, образование 3ГБ-мономера связано с ростом штамма. 4-гидроксибутирил-КоА, образующиеся в результате расщепления 6-гидроксигексаноил-КоА, готов для полимеризации с 3ГБ-КоА с образованием сополимеров П(3ГБ/4ГБ). Поэтому предполагается, что использование нескольких субстратов-предшественников отвечает за сохранение мономерного состава 4ГБ при более высоких отношениях. Это согласуется с результатами, в соответствии с которыми смесь субстрата, содержащая 1,6-гександиол, образует сополимер с более высоким содержанием мономерной композиции 4ГБ. γ-бутиролактон и 1,4-бутандиол, имеющие 4 атома углерода, могут быть использованы через β-окисление с образованием ацетил-КоА, чтобы инициировать рост бактерий в одностадийном ферментации. Это может впоследствии уменьшить его способность производить сополимер с более высокими мономерными композициями 4ГБ [43].

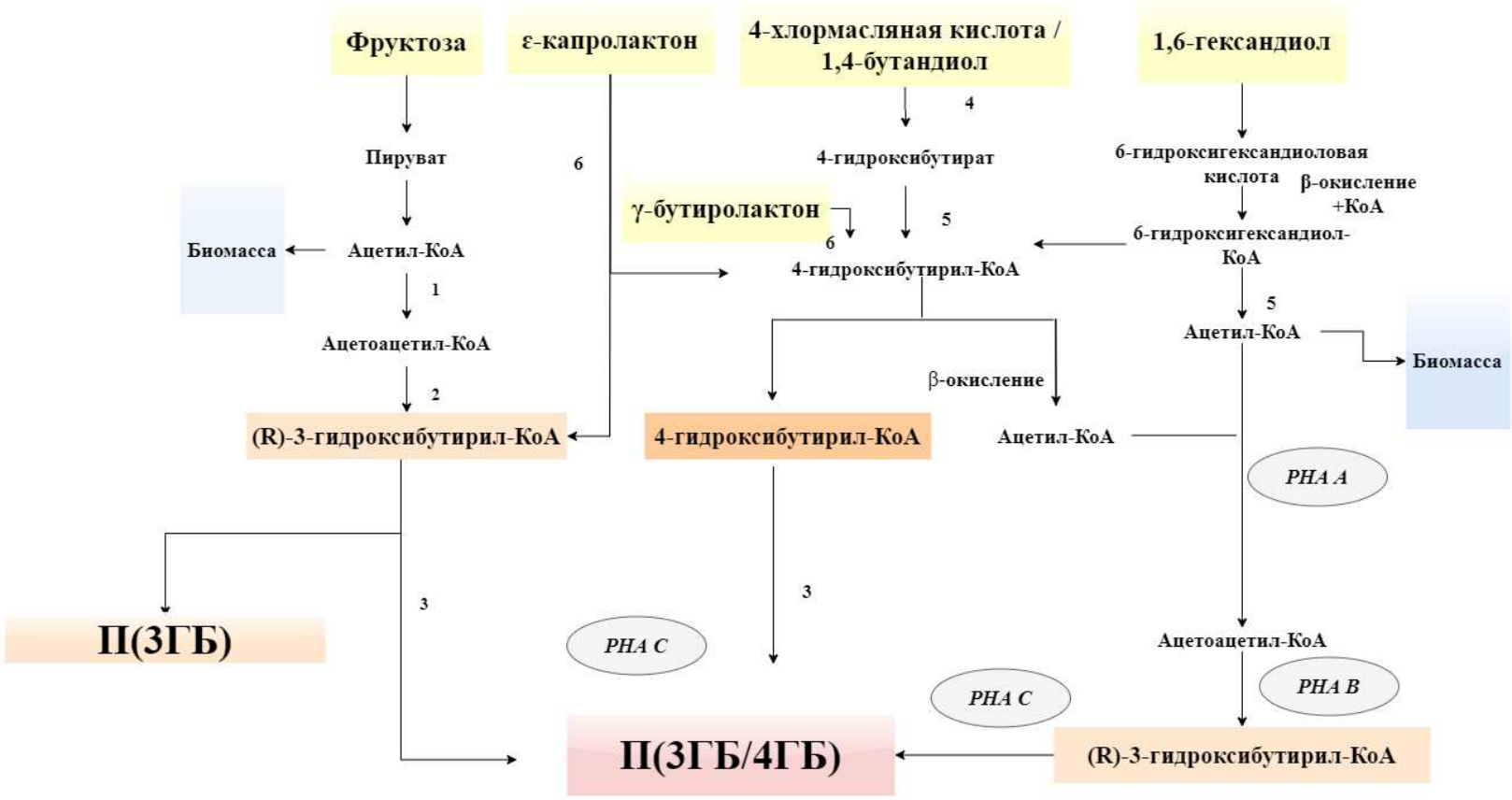

Рисунок 4 – Биосинтез П(3ГБ/4ГБ) из различных источников углерода: (1) β-кетотиолаза; (2) НАДФ ацетоацетил-Коа-редуктаза; (3) ПГА-синтаза; (4) дегидрогеназа; (5) гидроксиацил-Коа-синтаза; (6) эстераза[25, 35]

1.7.1Использование предшественников

В работе Raposo с соавтор. (2017) описано добавление γ-бутиролактона в начале накопления полимера культуре бактерий *Burkholderiasacchari,* выращиваемой на фруктозе. Из приведенных результатов наблюдается увеличение производства полимера до 51% при концентрацияхγ-бутиролактона в10 г/л. Концентрация γ-бутиролактона выше 15 г/л вызывает небольшое снижение содержания полимера, накопленного в клетках (49%), что отражает токсическое действие ко-субстрата выше 10 г/л. Однако включение мономера 4ГБ в полимере показывает постоянное его увеличение при более высокой концентрации γ-бутиролактона, достигающее максимальных значений 3,6 % при 15 г/л предшественника. Хороший компромисс между включением 4ГБ и производительностью сополимера был достигнут, когда включение γ-бутиролактона происходила на ранней стадии накопления и, когда концентрация предшественника поддерживалась ниже токсичных концентраций (<10 г/л) в процессе культивирования. Наилучший результат составил 7,1% 4ГБ [44].

В другой работе использовался штамм *Burkholderiasacchari* IPT 101 (DSM 17165). Синтез П(3ГБ/4ГБ) был успешно продемонстрирован при росте на сахарозе с предшественниками 4ГБ: γ-бутиролактон и натриевая соль 4-гидроксибутирата (Na-4ГБ). При использовании γ-бутиролактона в качестве предшественника 4ГБ, содержание ПГА было несколько ниже, чем в случае использования Na-4ГБ (30% и 35% соответственно). Содержание 4ГБ в ПГА различаются в зависимости от применяемого предшественника; с использованием γ-бутиролактона это значение составляло 20,8%, тогда как при использовании Na-4ГБ оно составляло только 14,1%. Значения накопления биомассы к концу выращивания в присутствии какγ-бутиролактона, так и натриевой соли 4-гидроксибутирата оказались сопоставимыми и составили 5 г/л. [22].

Галофильная бактерия, выделенная из образца мангровых почв в Северном Вьетнаме, *Yangiasp*. ND199 способна производить не только гомополимер П3ГБ, но также и сополимер П(3ГБ/4ГБ). Биосинтез П(3ГБ/4ГБ) был достигнут благодаря использованию 1,4-бутандиола, γ-бутиролактона или 4-гидроксибутирата натрия в качестве предшественников 4ГБ. Наивысшеесодержание 4ГБ, равное 7,1 %, было получено при использовании 0,5 г/л γ-бутиролактона, затем в присутствии 1,4-бутандиола (5,7 %) и с добавлением 4-гидроксибутирата натрия содержание 4ГБ мономера в полимере составило лишь 4,0 %. В отличие от этого, в присутствии 4-гидроксибутирата натрия было получено наибольшее содержание сухой массы 2,47 г/л и содержание П(3ГБ/4ГБ) 55,2 %. Свойства полиэфиров варьировались в зависимости от поставляемых источников углерода: средневесовая молекулярная масса составила от $1,3\times10^6$ до $2,2\times10^6$Дальтон; среднечисловая от

4,2 × 10^5 до 6,9 × 10^5Дальтон. Значения молекулярной массы, температуры стеклования, а также температуры плавления гомополимера ПЗГБ оказались выше, чем температуры сополимера П(3ГБ/4ГБ). Эти результаты доказывают, что *Yangiasp.* ND199 так же способна включать 4ГБ мономер с образованием сополимера П(3ГБ/4ГБ) [45].

Первый отчет о представителе рода *Aquitaleasp. USM4(JCM 19919)* в качестве нового производителя ПГА был опубликован в работе Lee-MeiNg и KumarSudesh (2016), которые впервые использовали в качестве продуцента *Aquitaleasp*. USM4. Результаты биосинтеза ПГА показали, что мочевина является наилучшим источником азота, благодаря чему *Aquitaleasp*. USM4 накопила до 55% ПГА, когда 10 г/л сахарозы и 0,3 г/л мочевины были использованы в качестве источников углерода и азота, соответственно. Добавление производных источников углерода обычно проводится в целях определения способности нового штамма синтезировать различные типы ПГА. Результаты показали, что 4ГБ мономер был успешно включен, содержание которого на 48 час выращивания составило 21 % в присутствии 4-гидроксимасляной кислоты натрия, содержание биомассы и накопление полимера в клетках составило 1,6 г/л и 33% соответственно [46].

Сообщается также, что алкандиолы с более длинной углеродной цепью являются потенциальными субстратами-предшественниками для П(3ГБ/4ГБ). Chai с соавтор.(2009) продемонстрировали получение сополимера с использованием алкандиолов, таких как 1,8-октандиол, 1,10-декандиол и 1,12-додекандиол в двухстадийной культивации, однако эти субстраты обладают высокой токсичностью по отношению к бактериальным клеткам. Среди этих исходных субстратов использование 1,8-октандиола привело к получению сополимера с высокой мономерной композицией 4ГБ (92%), однако отрицательно сказалось на накопление биомассы и синтез полимера, значения которых на 48 час выращивания составили 1,0 г/л и 9% соответственно. При добавлении в среду 1,10-декандиола в качестве предшественника мономера 4ГБ значения концентрации биомассы, накопления полимера и содержания 4-гидроксибутирата в конце культивирования составили 10,0 г/л,74% и 7% соответственно. Использование 1,12-додекандиола привело к накоплению сополимера 64% от веса сухой биомассы (9,2 г/л) с содержанием 4ГБ мономера в 11%[47].

Использование метана (CH_4) в качестве сырья для производства ПГА может значительно снизить затраты и негативное воздействие на окружающую среду [48,49]. В исследованииMyungссоавтор. (2017) было произведено выращиваниеметанотрофных бактерий *Methylocystisparvus* OBBP, когда первичный субстрат представляет собой CH_4, а в качестве предшественника 4ГБ мономера использовался γ-бутиролактон. При концентрации предшественника в 1,2мМ доля 4ГБ мономера составила 9,5%. Однако, не смотря на низкое содержание 4ГБ мономера в П(3ГБ/4ГБ), данный полимер

имел более низкие температуры плавления и стеклованияпо сравнению с гомополимером П3ГБ, что является следствием снижении хрупкости данных полимеров [33].

В одном из исследований TeresaCesárioac соавтор.(2014) выращивались бактерии *Burkholderiasacchari* DSM 17165 в условиях периодической культуры. В качестве источника углерода использовались глюкоза или гидролизат пшеничной соломы, богатый гексозами и пентозами; в качестве стимуляторов синтеза 4ГБ использовалисьпропионовая или уксусная кислоты, которых добавляли одновременно с предшественником 4ГБ мономера – γ-бутиролактоном.Было доказано, что концентрации γ-бутиролактона выше 5 г /л являются токсичными для роста бактерий.При культивировании бактерий на глюкозев отсутствии стимуляторов, накопление 4ГБ мономера составило 4,7%, что ниже, чем в присутствии пропионовой кислотыи уксусной кислоты 6,3% и 12 % соответственно. Это исследование показывает, что добавление небольшого количества уксусной или пропионовой кислот усиливает включение 4ГБ и направляет метаболизм γ-бутиролактонав сторону продуцирования единиц 4ГБ, что нельзя сказать о накоплении биомассы и ПГА, значения которых оказались ниже, чем в отсутствии стимуляторов синтеза 4ГБ.При выращивании на гидролизате пшеничной соломы в присутствии γ-бутиролактона содержание4ГБ достигло значений 5,5 и 5% в присутствии пропионовой кислоты и без стимулятора соответственно. Более низкая продуктивность была получена при использовании гидролизата в качестве С-источника. Это связано с наличием пентоз, а именно ксилозы и арабинозы в гидролизате (29% от общего количества сахаров), которые потребляются с меньшей скоростью по сравнению с глюкозой. Снижение молекулярной массы,температур плавления, кристаллизации и деградации наблюдалось с более высокими молярными фракциями 4ГБ[50].

Sylvaine Le Meurccоавтор. (2014) так же продемонстрировали, что при использовании глицерина в качестве основного источника углерода и 4-гидроксибутирата натрия в качестве предшественника 4ГБ, добавление уксусной кислотыстимулирует накопление 4ГБ *E.coli*. При добавлении уксусной кислоты в начале культивирования, содержание 4ГБ составило 31%; если уксусную кислоту добавляли дважды: в начале, а затем в конце фазы роста, содержание 4ГБ составило 30%; и наконец, добавление уксусной кислоты на 48 ч культивирования позволило синтезировать полимер с долей 4ГБ мономера в 9%. Культура без добавления уксусной кислоты достигла максимального значения 4ГБ в 10%. Причина, по которой добавление уксусной кислоты в конце фазы роста не способствует синтезу 4ГБ может заключаться в том, что клеточный метаболизм в стационарной фазе недостаточно активен для превращения уксусной кислоты в ацетил-КоА. Когда уксусная кислота добавляется в начале фазы роста, она может быть преобразована в ацетил-КоА, который затем может быть направлен на рост и поддержание клеток (во время

фазы роста) или синтез П4ГБ (во время фазы накопления).Эти результаты показали, что добавление уксусной кислоты в начале культивирования резко увеличивает накопление 4ГБ в полимере. Это высокая производительность 4ГБ снизит общую стоимость производства, что позволит продолжить разработку П4ГБ[51].

TeresaCesárioai SylvaineLeMeurдоказали, что амины (источник аминокислот) в избытке ингибировали накопление П(3ГБ/4ГБ), что указывает на то, что ограничение в некоторых пулах аминокислот способствует синтезу П4ГБ. Это было подтверждено путем обеспечения экзогенной уксусной кислоты клеткам, что, привело к уменьшению количества внутриклеточного аминокислотного пула. Полученные результаты подтвердили гипотезу, что пути роста клеток и синтеза П4ГБ конкурируют друг с другом. Когда доступные питательные вещества и энергия используются для роста клеток, П4ГБ вряд ли можно синтезировать. Когда рост клеток замедляется / останавливается из-за недостатка питательных веществ (например, аминокислот), кроме углеродного голодания, может быть начат синтез 4ГБ. Сообщается, что экзогенное добавление уксусной кислоты увеличивает активность ацетил-КоА-синтетазы, чтобы достичь равновесия между концентрацией ацетата и ацетил-КоА. Увеличение содержания ацетил-КоА в клетках бактерий, являющийся донором КоА для 4ГБ, увеличивает накопление П4ГБ.

1.7.2Использование технологии смешанных субстратов

Способность предшественников в соответствии с их эффективностью включаться в 4ГБ отражается следующим образом: γ-бутиролактон, затем 1,4-бутандиол и, наконец, 1,6-гександиол. Поэтому рационально, что комбинация γ-бутиролактона и 1,4-бутандиола дает сополимеры с более низким содержанием мономера 4ГБ; тогда как комбинация двух диолов, 1,4-бутандиола и 1,6-гександиола образует сополимер с более высоким содержанием мономеров 4ГБ. Комбинация γ-бутиролактон и 1,6-гександиол позволяет получить сополимер как с высокой, так и с низкой мономерной композицией 4ГБ[43].

В одной из работ Huong с соавт. (2014) изучалось влияние различных смесей субстрата на производство полимеров в одностадийном культивировании*Cupriavidus sp.* USMAA1020. Ферментацию проводили с использованием разных предшественников синтеза мономера 4ГБ, а именно γ-бутиролактон (γ), 1,4-бутандиол (1,4) и 1,6-гександиол (1,6). Среди всех используемых субстратовна 48 час выращивания смесь γ +1,4 зафиксировала наивысший рост биомассы в 6,2 г/л. Это сочетание субстратов также привело к высокому накоплению ПГА (55 %), из этого следует, что эта комбинация обеспечивает не только благоприятное и оптимальное условие для роста

бактерий, но и для синтеза ПГА. Стратегия выращивания с одновременным использованием нескольких предшественников 4ГБ мономера привела к синтезуП(3ГБ/4ГБ) с различными 4ГБмономерными композициями, с 12 до 55 мол%. Использование γ-бутиролактона и 1,4-бутандиола привело к синтезу сополимера с более низким диапазоном 4ГБ мономера (12-20 мол%); смесь 1,4-бутандиол и 1,6-гександиол обеспечила синтез сополимеров с более высоким диапазоном 4ГБ (35-40 моль%); при внесении в среду γ-бутиролактона и 1,6-гександиоласинтезировались сополимеры с более широким диапазоном 4ГБмономера (25-55 мол%). Комбинация углерода γ+1,6 зафиксировала наивысший 4ГБ мономерный состав 55 %. При проведении обширной характеристики синтезированных сополимеров результаты показали, что характеристики и качества полимеров в основном затрагиваются характером субстратов и стратегией сочетания субстратов, независимо от 4ГБ мономера. Сополимеры, изготовленные из смесей субстратов γ + 1,6 и 1,4 + 1, 6, обладают более низкими значениями модуля Юнга, поэтому можно предположить, что эти сополимеры более эластичные. Однако, сополимеры, полученные из субстратной смеси γ +1,4, обладали более высокими значениями удлинения на разрыв, от 331,5 до 494,8, 1%. Однако для полимеров, изготовленных из других смесей субстрата, максимальное удлинение на разрыв составило лишь 477,2%. Это доказало отсутствие корреляции между 4ГБмономерными композициями и механическими свойствами. В случае термических свойств сополимера было отмечено, что смесь субстрата 1,4-бутандиол и 1,6-гександиол привела к снижению значений температуры плавления, следовательно такие сополимеры могут быть полезны для промышленной переработки, поскольку в процессе литья требуется меньшее потребления энергии. В этом исследовании средняя молекулярная масса, сополимеров колебалась от 40,0 до 110,0 кДа[52].

В следующем исследовании Huong с соавт. (2014) было доказано, что в одностадийной ферментации *Cupriavidus sp.* USMAA1020 может производить П(3ГБ/4ГБ) с различным составом мономеров 4-гидроксибутирата в пределах от 3 % до 75 %. Усилия были направлены на увеличение содержания мономеров 4-гидроксибутирата путем изменения условий культивирования.Были объединены два источника углерода с различными концентрациями (низкой (L), средней (M)и высокой (H)) по отношению к массовойдоле углерода: L= 0,1725 мас. % C; M = 0,345 мас. % C; H= 0,5175 мас.% C.Сополимер с максимальным содержанием 4-гидроксибутирата (70%) был получен в присутствии средних концентраций 1,6-гександиола и γ-бутиролактона ($M_{1,6}$+M_{γ}). Однако, данная комбинация негативно отразилась на накопление биомассы и синтез полимера, значения которых на 48 час составили 2,7 г/л и 13% соответственно[53].

В следующей работе Huong с соавт. (2017) удалось синтезировать высокоэластомерный термопластик П(3ГБ/4ГБ) с использованием одностадийной ферментации *Cupriavidus sp*. USMAA1020 в присутствии

нескольких субстратов-предшественников.Предыдущие исследования [52,53]показали, что изменение общей концентрации углерода значительно повлияло на накопление сополимера. В целом, наиболее эффективной комбинацией была смесь субстрата γ-бутиролактон и 1,6-гександиола, что привело к накоплению 4ГБ мономера в 51%. Макроскопическая кинетическая модель показала, что образование сополимеров в основном синтезируется в фазе экспоненциального роста при культивировании различных субстратных смесей. Кроме того, добавление 1,4-бутандиола и 1,6-гександиола привело к высокому молекулярному весу и превосходному удлинениюна разрыв 927 кДа и 1637% соответственно. Было обнаружено, что этот сополимер обладает высокоэластомерными свойствами, благодаря чему повышается устойчивость сополимера к деформации при растяжении. Такое свойство еще не сообщалось о сополимере с 4ГБ, что свидетельствует о том, что стратегия культивирования с использованием нескольких предшественников не только улучшает производство сополимеров, но также приводит к синтезу сополимера с полезными свойствами [31].

Резкий рост мономеров 4-гидроксибутирата был достигнут Syafiq с соавт. (2017) путем введения дополнительных копий гена ПГА-синтазы (phaC), ответственного за полимеризацию [П(3ГБ/4ГБ)]. *phaC Cupriavidus sp.* USMAA1020 и*Cupriavidus sp.*USMAA2-4 были клонированы и введены в организм дикого штамма *Cupriavidus sp.* USMAA1020. Культивирование трансформантов осуществлялась в одностадийной ферментации с добавлением предшественников 4-гидроксибутирата, а именно 1,6-гександиола и γ-бутиролактона в разных концентрациях по отношению к массовой доли углерода: низкой (L = 0.1725% C); средней (M = 0.345% C) и высокой (H = 0.5175 %C).Введение гена заключалось в накоплении 93% мономера 4ГБв присутствии высокой концентрации1,6-гександиола и низкой концентрацией γ-бутиролактона; для данной комбинации характерно и самое высокое содержание полимера (34%). Чуть меньше мономеров 4ГБ было произведено при культивировании с низкой концентрацией 1,6-гександиола и высокой концентрацией γ-бутиролактона (89 %), однако для данной смеси характерно наибольшее значение биомассы (3,1 г/л). И при равных концентрациях 1,6-гександиола и γ-бутиролактона было получено 83% 4ГБ. В целом, оба трансформанта были способны производить сополимер П(3ГБ/4ГБ) с молярной фракцией 4-гидроксибутирата выше, чем молярная фракция диких штаммов *Cupriavidus sp.* Возможности ПГА-синтазы у обоих трансформантов были почти в 2 раза выше, чем у дикого штамма [54].

В другом исследовании было продемонстрировано использование 1,8-октандиола *Cupriavidus malaysiensi*s USMAA1020 для получения сополимера П(3ГБ/4ГБ). Была проведена ферментация с подачей различных комбинаций субстратов 1,8-октандиола с γ-бутиролактоном или 4-гидроксибутиратом натрия. Комбинация 1,8-октандиола с обоими субстратами увеличивает

мономерную композицию 4ГБ полимере, по сравнению с культивированием в присутствии только 1,8-октандиола. Содержание 4ГБ мономера составляло от 33 до 43%. Максимальное накопление биомассы и полимера на 48 час выращивания составило 4,0 г/л и 62 % соответственно в присутствии 1,8-октандиола и γ-бутиролактона[1].

1.7.3Использование мутантных штаммов

Генетически-модифицированные бактерии с измененным метаболизмомиспользуются в качестве мощного подхода для увеличения производства новых сложных полимеров[55]. Подход, основанный на синтетической биологии, также может позволить точно контролировать состав ПГА. Использование рекомбинантной *E. coli* позволило эффективно продуцировать поли(4-гидроксибутират) с использованием глюкозы в качестве единственного источника углерода [56].

Галофильная бактерия *Halomonas*, выделенная из озера Айдингол, провинции Синьцзян в Китае, является производителем ПГА, выращиваемая в нестерильных и непрерывных процессах при высоком pH и высоких концентрациях солей. Промышленная биотехнология нового поколения использует экстремофилыдля производства химических веществ в открытых и непрерывных условиях. В одном из исследовании галофильный штамм *H.bluephagenesis* TD01 был успешно спроектирован путем введения трех дополнительных генов, кодирующих 2-оксоглутаратдекарбоксилазу, 4-гидроксибутиратдегидрогеназу и 4-гидроксибутират-КоА-трансферазу и удаление **gabD**-гена, кодирующегосукцинатныеполуальдегиддегидрогеназы,что привело к значительному увеличению фракции 4ГБ мономера от 13 до 25% с использованием глюкозы в качестве единственного источника углерода. Среда только с глюкозой значительно снижает стоимость производства П(3ГБ/4ГБ) и, таким образом, позволяет избежать сложности процесса подачи токсичных и дорогостоящихсубстратов-предшественников к культурам [57].

Использование жирных отходов, полученных из скотобойни и обрабатывающей промышленности,вызывает большой интерес для синтеза ПГА, поскольку эти остатки доступны в огромных количествах. В одном из исследований возможность превращения таких отходов в ПГА была достигнута в одностадийном процессе ферментации путем генетической модификации нелиполитического бактериального штамма *Delftiaacidovorans* DSM39. Результаты работыRomanelli с соавтор. доказали способность рекомбинантного штамма *D. acidovorans* продуцировать ПГА до 40% от веса сухой биомассы со значительным процентом 4ГБ (33%) непосредственно из сала животных без использования какого-либо предшественника 4ГБ мономера [40].

1.7.4 Использование *Cupriavidus necator* B10646

Ранее природный штамм бактерий *Cupriavidus necator* B10646(ранее *Cupriaviduseutrophus* B10646) культивировали в гетеротрофных условиях, где в качестве основного углеродного субстрата использовали масляную кислоту, а в качестве субстрата-предшественника для синтеза мономера 4-гидроксибутирата (4ГБ) – γ-бутиролактон. Варьируя концентрацию и время добавок получили П(3ГБ/4ГБ) с включением 4ГБ от 3 до 75 мол.%. Было установлено, что пленки, исследованных сополимерных ПГА, имеют более высокие показатели прочности и эластичности по сравнению с П3ГБ. Однако, добавка негативно влияла, как на накопление биомассы, так и на синтез полимера [58].

Поэтому целью нашей работы является исследование других возможных косубстратов.

2 Материалы и методы

2.1 Объект исследования

В работе использовали природный штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus necator*B10646(ранее *Cupriavidus eutrophus* B10646,*Ralstoniaeutropha*) депонированный во Всероссийской коллекциипромышленных микроорганизмов (ВКПМ).

Особенности штамма: грамотрицательная подвижная палочка, способная синтезировать ПГА.

2.2 Культивирование бактерий

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 0.5 л, заполненных культурой на 50% объема с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «IncubatorShakerInnova® серии 44 («NewBrunswickScientific», США) при температуре 30ºС и 200rpm. Для выращивания бактерий за основу была принята среда Шлегеля, состоящая из: $Na_2HPO_4*H_2O$ – 9,1; KH_2PO_4 – 1,5; $MgSO_4*H_2O$ – 0,2; $Fe_3C_6H_5O_7*$ $7H_2O$ – 0,25; NH_4Cl – 1.0 (г/л) и раствор микроэлементов (H_3BO_3 – 0,288; $CoCl_2*$ $6H_2O$ – 0,030; $CuSO_4*5H_2O$ – 0,008; $MnCl_2*4H_2O$ – 0,008; $ZnSO_4.*7H_2O$ – 0,176; $NaMoO_4.$ – 0,05; $NiCl_2$ – 0,008 (г/л)). В качестве источника углерода использовали фруктозу, начальная концентрация которой составляла 10-12 г/л.

Для определения константы ингибирования была рассчитана удельная скорость роста на 6-ой час выращивания в присутствии добавок в концентрациях 0,5 – 5 г/л.

Для синтеза сополимера, содержащего мономеры 4ГБ, использовали следующие предшественники: 1,4-бутандиол, ε-капролактон 1,6-гександиол и 4-хлормасляная кислота, которые добавляли вначале выращивания в концентрациях 1 – 5 г/л. Длительность культивирования составляла 24 часа.

1,6-гександиол готовили следующим образом: 10 г порошка растворяли в 100 мл дистиллированной воды, наливали в стеклянные колбы на 200 мл. 1,4-бутандиол, ε-капролактон и 4-хлормасляную кислоту наливали в стеклянные колбы, объемом 100 мл. Все предшественники автоклавировались при 0,5 атм 121º С 15мин.

Далее, для синтеза П(3ГБ/4ГБ) с максимальным содержанием мономера 4ГБ использовали смеси субстратов, добавляя комбинации из 4ГБ-производных, а именно: ε-капролактон, 1,4-бутандиол, 1,6-гександиол или 4-хлормасляная кислота. Предшественники поступали в среду с бактериями на 24 час выращивания. Длительность культивирования составляла 72 часа.

И на конец, чтобы получить высокие содержания биомассы бактерий, полимера и доли 4ГБ, на следующем этапе работы было произведено дробное добавление субстратов-предшественников. ε-капролактон и 1,4-бутандиол были добавлены на 24, 48 и 72 часы по 1 г/л. Длительность культивирования составляла 96 часов.

По ходу роста культуры и исчерпания фруктозы в культуру бактерий добавляли субстрат в концентрациях, аналогичных исходных.

2.3 Измерение параметров процессов

Урожай биомассы клеток в ходе развития культуры бактерий регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры. Периодически отбирали пробы культуры и измеряли их оптическую плотность на ФЭКе (UNICO2100, США) при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и λ=440 нм с использованием кюветы на 1мм.

Определение урожая проводили следующим образом: 25 мл культуры центрифугировали10 мин при 6000g на центрифугеEppendorf 5810R (США). Затем дважды отмывали клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы сушили при температуре 105°C в сушильном шкафу в течение суток, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Биомассу бактерий определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом пустого бюкса.

Для определения концентрации фруктозы 1 мл культуры разводили в 25 мл дистиллированной воды. Из этого разведения 1мл пробы наливали в пробирку, куда добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (1 г резорцина растворяли в 1000 мл 95%-ого этилового спирта) и 3 мл смеси соляная кислота:дистиллированная вода=5:1. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Пробирки с контролем и пробой помещали на водяную баню (t=80°C) на 20 минут. По истечении этого времени контроль и пробу охладили до комнатной температуры. Концентрацию фруктозы измеряли на ФЭКе (UNICO2100, США) при длине волны 540 нмс использованием кюветы на 5 мм.

2.4 Определение добавок в среде

Содержание 1,4-бутандиола в культуральной среде определяли следующим образом: отбирали 20 мл культуральной среды в пластиковые пробирки и центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R (США) при 6000 оборотов/мин в течение 5 минут. По завершении центрифугирования к 200 мкл среды добавляли 800 мкл дистиллированной воды и 1 мл 1-пентанола. Когда происходило расслоение фаз, из нижнего слоя отбирали по 1 мл пробы и запускали на хромато-масс-спектрометр GCD plus (“HewlettPackard”, США). По построенному калибровочному графику (Рисунок 5) определяли текущее содержание 1,4-бутандиола в среде.

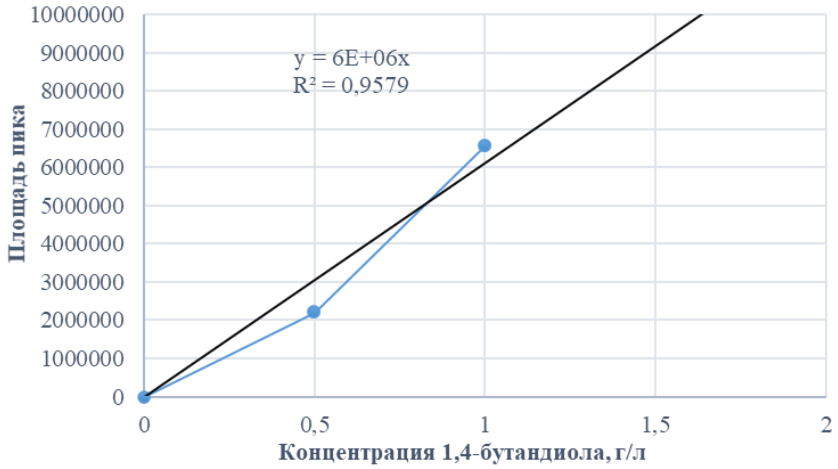

Рисунок 5 – Калибровочный график для определения 1,4-бутандиола в среде

Содержание ε-капролактона в культуральной среде определяли следующим образом: отбирали 20 мл культуральной среды в пластиковые пробирки и центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R (США) при 6000 оборотов/мин в течение 10 минут. По завершении центрифугирования 5 мл среды после осаждения клеток подкисляли несколькими каплями концентрированной серной кислоты до значения pH=2-3, добавляли 3 мл хлороформа, перемешивали. Когда происходило расслоение фаз, из нижнего слоя отбирали по 1 мкл пробы и запускали на хромато-масс-спектрометре GCD plus (“HewlettPackard”, США). По построенному калибровочному графику (Рисунок 6) определяли текущее содержание ε-капролактона в среде.

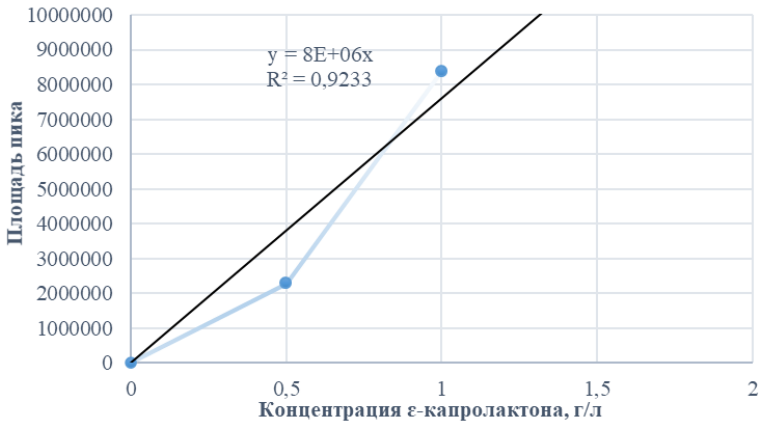

Рисунок 6 – Калибровочный график для определения ε-капролактона в среде

Содержание 1,6-гександиола в культуральной среде определяли следующим образом: отбирали 20 мл культуральной среды в пластиковые пробирки и центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R (США) при 6000 оборотов/мин в течение 5 минут. По завершении центрифугирования к 1 мл среды добавляли 9 мл дистиллированной воды. Из разведения брали 1 мл полученного раствора и добавляли 0,5 мл хлороформа. Когда происходило расслоение фаз, из нижнего слоя отбирали по 1 мл пробы и запускали на хромато-масс-спектрометре GCD plus (“HewlettPackard”, США). По построенному калибровочному графику (Рисунок 7) определяли текущее содержание 1,6-гександиола в среде.

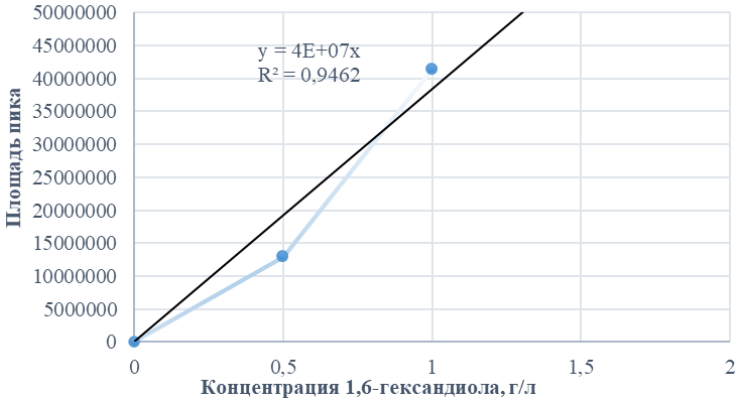

Рисунок 7 – Калибровочный график для определения 1,6-гександиолав среде

Содержание 4-хлормасляной кислоты в культуральной среде определяли следующим образом: отбирали 20 мл культуральной среды в пластиковые пробирки и центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R при 6000 оборотов/мин в течение 5 минут. По завершении центрифугирования 1 мл среды подкисляли несколькими каплями концентрированной серной кислоты до значения pH=2-3, после этого добавляли 0,5 мл хлороформа. Когда происходило расслоение фаз, из нижнего слоя отбирали по 1 мл пробы и запускали на хромато-масс-спектрометре GCD plus (“HewlettPackard”, США).

По построенному калибровочному графику (Рисунок 8) определяли текущее содержание 4-хлормасляной кислоты в среде.

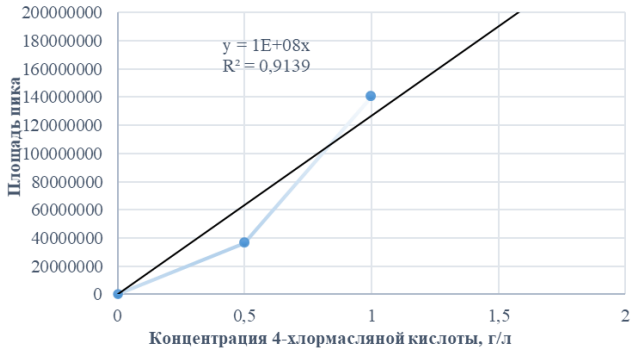

Рисунок 8 – Калибровочный график для определения 4-хлормасляной кислотыв среде

Условия хроматографирования: колонка FFAP капиллярная длиной 30 метров и диаметром 0,25 мм, фаза полярная. Температура ввода пробы составляла 120 ◦С. В течение 3 минут изотермальный режим, затем 15 ◦С/мин до 230 ◦С/мин. Время проведения хроматографирования 16 минут. Запуск проб производили в режиме «split» с расщеплением потока. Температура интерфейса 230◦С, спектрометра 150◦С.

2.5 Анализ структуры ПГА

Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза образца (навеска 4 мг) на хромато-масс-спектрометре GCD plus (“HewlettPackard”, США). Метанолиз проводили следующим образом. Для этого к 4 мг пробы добавляли 1 мл внутреннего стандарта (0.5 мг бензойной кислоты/1 мл хлороформа), 0,85 мл метанола и 0,15 мл конц. серной кислоты и кипятили под обратными холодильниками в течение 2 часов 40 минут. По окончании метанолиза, в колбу добавляли 1 мл дистиллированной воды.

Для корректного определениясоотношения мономеров 3- и 4-гидроксибутирата всополимере, помимо регистрации масс-спектров,сняты 1H-ЯМР спектры растворов сополимера вCHCl3 (ЯМР-спектрометр Avance III 600 “Bruker”(Германия)).

2.6 Анализ молекулярного веса ПГА

Молекулярно-массовые характеристикиобразцов ПГА исследовали методомгель-проникающей хроматографии (модель1260 Infinity, «AgilentTechnologies», США)с детектором показателя преломления, используя колонку AgilentPLgelMixed-C.Определяли средневесовую (Мв) и среднечисловую молекулярную массу (Мч), а также полидисперсность (ПД =

Мв/Мн), позволяющую оценить соотношение в полимере фрагментовс различной степенью полимеризуемости.

2.7 Изготовление плёнок

Для изготовления пленок 100 мг полимера растворяли в 5 мл дихлорметана с использованием магнитной мешалки (HeidolphMRHei-Connect, Германия) до полного растворения. Далее разливали в чашки Петри, предварительно обезжиренные спиртом,и ставили под стеклянный колпак на сутки.

2.8 Исследование структуры поверхности пленок

Для изучения свойств поверхности через краевой угол смачивания работали на аппарате «KRUSS» (США).

Использовались образцы пленок двухкомпонентных полимеров различного состава. Плёнки нарезали тонкими полосками шириной 1-2 см и закрепляли на подложке аппарата «KRUSS». На плёнки наносили поочередно воду и дийодметан в 4-5 повторностях. Таким образом, реализовался способ измерения динамических краевых углов методом “сидячей капли”. Процесс растекания фиксировался скоростной видеокамерой. Полученные видеокадры обрабатывались при помощи программного обеспечения КРУСС, в котором использовался метод Юнга-Лапласа для определения динамики краевого угла смачивания. Данная программа распознаёт профиль капли и определяет её химические параметры, такие как краевой угол, общая поверхностная энергия, дисперсионная составляющая и полярная составляющая.

2.9 Определение температуры плавления полимера

Термический анализ проводили с применением дифференцмально-сканирующего калориметра DSC-1 («MettlerToledo», Швейцария).Температуру плавления и термическойдеградации определяли по экзотермическимпикам на термограммах. Термограммы анализировали с помощью программного обеспечения STARev11.0 (METTLERTOLEDO,Швейцария).

2.10 Определение степени кристалличности полимера

Определение степени кристалличности образцов проводили на рентгеноспектрометреD8 ADVANCE (Bruker, Германия). Степенькристалличности (Cx) вычисляли как соотношение общей площади кристаллическихпиков к общей площади радиограммы (кристалличные + аморфные компоненты).

2.11Исследование микроструктуры поверхности мембран

Микроструктуру поверхности пленоканализировали с применением растровой электронной микроскопии (Phillips SEM 525 M, Нидерланды).

2.12 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам с использованием программного пакета MicrosoftExcel.

[изъято 26 страниц]

ВЫВОДЫ

1. Исследовано влияние различных субстратов на рост биомассы бактерий и синтез полимера. Показано, что все используемые субстраты являются предшественниками синтеза мономеров 4ГБ. Максимальное содержание 4ГБ мономера в полимере составило 24,2 мол. % при концентрации 4-хлормасляной кислоты в 5 г/л.

2. Совместное добавление субстратов существенно повлияло как на накопление биомассы, так и на синтез полимера. Использование субстратных смесей с 4-хлормасляной кислотой не привело к синтезу П(3ГБ/4ГБ). Использование смесей прекурсоров 1,6-гександиола, 1,4-бутандиола и ε-капролактона привело к синтезу сополимера П(3ГБ/4ГБ) с различным содержанием 4ГБ от 2,3 до 38,3 мол.%. Дробная подача субстратов-предшественников положительно влияет на накопление биомассы бактерий (до 7,1 г/л) и синтез полимера (до 86%).

3.Исследованы свойства полученных сополимеров.Установлено снижение молекулярной массы у сополимеров, содержащих 4ГБ. Показано, что температуры плавления, стеклования и кристаллизации у двухкомпонентных полимеров ниже, чем у гомополимера П3ГБ. Температура деградации же практически не изменялась. С увеличением содержания 4ГБ мономера увеличивается гидрофильность поверхностей плёнок сополимеров с 4ГБ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huong, K.H. Production of high molecular weight poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by Cupriavidus malaysiensis USMAA1020 utilising substrate with longer carbon chain / Kai-Hee Huong, K. A. R. Elina, A. A. Amirul // Biological Macromolecules. – 2018. – №116. – P.217-223.

2. Gao, X. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels / X.Gao, J. C. Chen, Q. Wu, G. Q.Chen //Current opinion in biotechnology. – 2011. – Т. 22. – №. 6. – P. 768-774.

3. Higuchi-Takeuchi, M. Synthesis of High-Molecular-Weight Polyhydroxyalkanoates by Marine Photosynthetic Purple Bacteria / Mieko Higuchi-Takeuchi, Kumiko Morisaki, Kiminori Toyooka,Keiji Numata // JOURNAL PLOS ONE. – 2016. – №10. – P. 1-17.

4. Miguel, D. Fed-Batch Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate) from Sucrose and 4-Hydroxybutyrate Precursors by Burkholderia sacchari Strain DSM 17165 / Miranda de Sousa Dias Miguel, Martin Koller, Dario Puppi, Andrea Morelli, Federica Chiellini, Gerhart Braunegg // Bioengineering. – 2017. – Vol. 36

5. Obruca, S. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly (3-hydroxybutyrate) accumulating cells / S. Obruca, P. Sedlacek, F. Mravec, O. Samek, //Applied microbiology and biotechnology. – 2016. – Т. 100. – №. 3. – P. 1365-1376.

6. Obruca, S. Effect of ethanol and hydrogen peroxide on poly (3-hydroxybutyrate) biosynthetic pathway in Cupriavidus necator H16 / S. Obruca, I. Marova, M. Stankova, L. Mravcova, Z. Svoboda//World Journal of microbiology and biotechnology. – 2010.– Т. 26. – №. 7. – P. 1261-1267.

7. Волова, Т.Г. Биомедицинский потенциал разрушаемых полигидроксиалканоатов: экспериментально-клинические исследования/ Волова, Т.Г., Винник, Ю.С., Шишацкая, Е.И., Маркелова, Н.М.// Красноярск: Версо – 2014. – С. 332.

8. Gomez, J. G. C. Making green polymers even greener: towards sustainable production of polyhydroxyalkanoates from agroindustrial by-products / J. G. Méndez Gomez, P. I. Nikel, M. J. Pettinari,M. A. Prieto, L. F. Silva//Advances in applied biotechnology. – 2012. – P. 41-62.

9. Sudesh, K. Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications / K. Sudesh, K. Bhubalan, J. A. Chuah // Applied Microbiology and Biotechnology/ – 2011. – Vol. 89. – № 5. – P. 1373–1386.

10. Titz, M.Process optimization for efficient biomediated PHA production from animal-based waste streams / M. Titz, K. H. Kettl, K. Shahzad, M. Koller, H. Schnitzer, M. Narodoslawsky // Clean Technologies and Environmental Policy. – 2012. – V. 14. – №3. – P. 495–503.

11. Povolo, S. Polyhydroxyalkanoates production by engineered Cupriavidus necator from waste material containing lactose / S. Povolo, P. Toffano, M. Basaglia, S. Casella //Bioresource technology. – 2010. – Т. 101. – №. 20. – P. 7902-7907.

12. Hájek, M. Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production / M. Hájek, F. Skopal // Bioresource Technology. – 2010. – V.101. – № 9. – P. 3242–3245.

13. Hermann-Krauss, C. Archaeal Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Co- and Terpolyesters from Biodiesel Industry-Derived By-Products / C. Hermann-Krauss, M. Koller, A. Muhr, H. Fasl // Archaea. – 2013. – P. 1-10.

14. Povolo, S.Production of polyhydroxyalkanoates from fatty wastes / S. Povolo, M. G. Romanelli, F. Fontana, M. Basaglia //Journal of Polymers and the Environment. – 2012. – Т. 20. – №. 4. – P. 944-949.

15. Faezah, A. N. Regulating the molar fraction of 4-hydroxybutyrate in poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by biological fermentation and enzymatic degradation / A.N. Faezah, A. Rahayu, S. Vigneswari, M. I. A. Majid, M. I.A., A. A. Amirul//World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Т. 27. – №. 10. – P. 2455-2459.

16. Волова, Т. Г. Физико-химические свойства многокомпонентных полигидроксиалканоатов: новые аспекты / Т.Г. Волова, О.Н. Виноградова, Н. О. Жила, Е. Г. Киселев // Высокомолекулярные соединения. – 2017. – Т.59. – № 1. – С. 76–85.

17. Laycock, B.The chemomechanical properties of microbial Polyhydroxyalkanoates / B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker, P. Lant // Progress in Polymer Science. – 2013. – Vol. 38. – P. 536-583.

18. Шишацкая, Е. И. Синтез и исследование сополимеров 3-гидроксибутирата/4-гидроксибутирата / Е. И. Шишацкая, Н. О. Жила, Е. Д. Николаева, Д. А. Сырвачева // Перспективные материалы. – 2013. – №3. – С. 20-26.

19. Прудникова, С. В. Экологическая роль полигидроксиалканоатов – аналога синтетических пластмасс: закономерности биоразрушения в природной

среде и взаимодействия с микроорганизмами / С. В. Прудникова, Т. Г. Волова // Красноярск: Красноярскийписатель. – 2012. – С.184

20. Kalacheva, G. S. Fatty Acid Composition of Wautersia eutropha Lipids under Conditions of Active Polyhydroxyalkanoates Synthesis / G. S. Kalacheva, T. G. Volova // Microbiology. – 2007. – V. 76. – №5. – P. 535–540.

21. Muzaiyanah, A.R. Studies on the Microbial Synthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Containing 4-Hydroxyvalerate Using γ-Valerolactone/ A. R. Muzaiyanah,A. A. Amirul// Applied biochemistry and biotechnology. – 2013. V.170. – P.1194-1215.

22. Dia, Miguel Miranda de Sousa Fed-Batch Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate) from Sucrose and 4-Hydroxybutyrate Precursors by Burkholderia sacchari Strain DSM 17165 / Miguel Miranda de Sousa Dias, M. Koller, D. Puppi, A. Morelli // Bioengineering. – 2017. – №4. – P. 1-19.

23. Виноградова, О. Н. Лабораторные исследования деградации полигидроксиалканоатов различной химической структуры в почве / О. Н. Виноградова, Д. А. Сырвачева // Биология – 2015. – №2. – С. 210-219.

24. Волова, Т.Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов / Т.Г. Волова // Журнал Сибирского Федерального Университета. Биология. – 2014. – № 2. - С. 103-133

25.Zhang,J.Mechanical properties, structure analysis and enzymatic degradation of uniaxially cold-drawn films of poly [(R)-3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate]/ J. Zhang, K. Kasuya, T. Hikima, M. Takata, A. Takemura, T. Iwata // Polymerdegradationandstability. – 2011. – Т. 96. – №. 12. – P. 2130-2138

26. Волова, Т.Г. Синтез сополимеров3-гидроксибутирата-Со-4-гидроксибутирата водородокисляющими бактериями / Т. Г Волова, Н. О. Жила, Г. С. Калачёва, В. А. Соколенко// Прикладная биохимия и микробиология – 2011. – Т. 47. – С. 544–550.

27. Cavalheiro, J. M. B. T. On the heterogeneous composition of bacterial polyhydroxyalkanoate terpolymers / João M.B.T.Cavalheiro, EricPollet, Hermínio P.Diogo, M. TeresaCesário, LucAvérous, M. Catarina M.D.de Almeid, M.M.R.da Fonseca//Bioresource technology. – 2013. – Т. 147. – P. 434-441.

28. Arza, C. R. Effect of additives on the melt rheology and thermal degradation of poly [(R)-3-hydroxybutyric acid] / Carlos R. Arza, Patric Jannasch, Peter Johansson, Per Magnusson, Alan Werker Frans, H. J. Maurer//Journal of Applied Polymer Science. – 2015. – Т. 132. – №. 15.

29. Kolahchi, A. R. Chain extended poly (3-hydroxybutyrate) with improved rheological properties and thermal stability, through reactive modification in the melt state / A. R. Kolahchi, M. Kontopoulou //Polymer Degradation and Stability. – 2015. – T. 121. – P. 222-229.

30. Larsson, M. Melt processability and thermomechanical properties of blends based on polyhydroxyalkanoates and poly (butylene adipate-co-terephthalate) / M. Larsson, O. Markbo, P. Jannasch //RSC advances. – 2016. – T. 6. – №. 50. – P. 44354-44363.

31. Huong, Kai-Hee Microbial-based synthesis of highly elastomeric biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) thermoplastic / Kai-Hee Huong, Chin-Hoe Teh, A. A. Amirul // Biological Macromolecules. – 2017. – №101. – P. 983-985.

32. Williams, S. F.Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB): a new generation of resorbable medical devices for tissue repair and regeneration / S. F. Williams, S. Rizk, D. P. Martin //Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering. – 2013. – T. 58. – №. 5. – P. 439-452.

33. Myung, J. Expanding the range of polyhydroxyalkanoates synthesized by methanotrophic bacteria through the utilization of omega-hydroxyalkanoate co-substrates/ J. Myung, J. C. A. Flanagan, R. M. Waymouth, C. S. Criddle // AMB Express. – 2017. – №7. – P. 1-10.

34. Steinbüchel, A.Lütke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms / A. Steinbüchel, T. Lütke-Eversloh//Biochemical engineering journal. – 2003. – T. 16. – №. 2. – P. 81-96.

35. Боровкова, Н. В. Исследование биологической совместимости пленок и нетканых мембран из сополимера 3-гидроксимасляной и 4-гидроксимасляной кислот в культурах клеток in vitro / Н. В. Боровкова, А. К. Евсеев, М. С. Макаров, И. В. Горончаровская // Биология. – 2016. – №1. – С. 43-52.

36. Николаева, Е.Д. Биополимеры для клеточной и тканевой инженерии / Е.Д. Николаева // Журнал Сибирского Федерального Университета. Биология. – 2014. – №2. – С. 222-233

37. Volova, T. A Glucose-Utilizing Strain, Cupriavidus euthrophus B-10646: Growth Kinetics, Characterization and Synthesis of Multicomponent PHAs / T. Volova, E. Kiselev, O. Vinogradova, E. Nikolaeva // PLoS One. – 2014. – №9.

38. Chanprateep, S. Characterization of new isolated Ralstoniaeutropha strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyester poly (3-hydroxybutyrate-co-4-

hydroxybutyrate) production / hydroxybutyrate) production / S. Chanprateep, Y. Katakura, S. Visetkoop, H. Shimizu, S. Kulpreecha, S. Shioya //Journal of industrial microbiology & biotechnology. – 2008. – T. 35. – №. 11. – P. 1205-1215.

39. Volova, T. G.Properties of a novel quaterpolymer P (3HB/4HB/3HV/3HHx) / T. G.Volova, O. N.Vinogradova, N. O.Zhila, I. V.Peterson, E. G.Kiselev, A. D.Vasiliev, A. G.Sukovatiy, E. I.Shishatskaya//Polymer. – 2016. – T. 101. – P. 67-74.

40. Romanelli, M. G. Engineering Delftia acidovorans DSM39 to produce polyhydroxyalkanoates from slaughterhouse waste / Maria Giovanna Romanelli, Silvana Povolo, Lorenzo Favaro, Federico Fontana // Biological Macromolecules. – 2014. – №71. – P. 21-27.

41. Cesário, M. T.Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Burkholderia sacchari using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone / M. TeresaCesárioaRodrigo, S.Raposoa, M. Catarina//International journal of biological macromolecules. – 2014. – T. 71. – P. 59-67.

42. Lopes, M. S. PHB biosynthesis in catabolite repression mutant of Burkholderia sacchari / M. S. G. Lopes, G. Gosset, R. C. S. Rocha, J. G. C. Gomez, Luiziana Ferreira da Silva //Current microbiology. – 2011. – T. 63. – №. 4. – P. 319.

43. Loo, C. Y. Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties / C. Y. Loo, K. Sudesh //Malaysian Polymer Journal. – 2007. – T. 2. – №. 2. – P. 31-57.

44. Raposo, R. S. Feeding strategies for tuning poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) monomeric composition and productivity using Burkholderia sacchari / R. S.Raposo, M. Catarina M.D.de Almeida, M. M. R.da Fonseca, M. Teresa Cesário // Biological Macromolecules. – 2017. – №105. – P. 825-833.

45. Phong, T. H. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers by Yangia sp. ND199 from different carbon sources / T. H. Phong, D. V. Thuoc, K. Sudesh // Biological Macromolecules. – 2016. – №84. – P. 361-366.

46. Ng, Lee-Mei Identification of a new polyhydroxyalkanoate (PHA) producer Aquitalea sp. USM4(JCM 19919) and characterization of its PHA synthase / Lee-Mei Ng, K. Sudesh // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2016. – V.122. – №.5. – P. 550-557.

47. Chai, H. Microbial synthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by Cupriavidus sp. USMAA2-4 through a two step

cultivation process /H. Chai, R. Ahmad, A. Yahya, M. Majid, A. Amirul//African Journal of Biotechnology. – 2009. – T. 8. – №. 17.

48. Rostkowski, K. H.Cradle-to-gate life cycle assessment for a cradle-to-cradle cycle: biogas-to-bioplastic (and back) / K. H. Rostkowski, C. S. Criddle, M. D. Lepech //Environmental science & technology. – 2012. – T. 46. – №. 18. – P. 9822-9829.

49. Strong, P. J. Methane as a resource: can the methanotrophs add value? / P. J. Strong, S. Xie, W. P. Clarke//Environmental science & technology. – 2015. – T. 49. – №. 7. – P. 4001-4018.

50. Cesárioa, M. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Burkholderia sacchari using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone / M. Teresa Cesário, Rodrigo S. Raposo, M. Catarina M.D. de Almeida, Frederik van Keulen // Biological Macromolecules. – 2014. – №71. – P. 59-67.

51. Meur, S. L. Improved productivity of poly (4-hydroxybutyrate) (P4HB) in recombinant Escherichia coli using glycerol as the growth substrate with fed-batch culture / S. L. Meur, M. Zinn, T. Egli, L. Thöny-Meyer // Microbial Cell Factories. – 2014. – №31. – P. 1-12.

52. Huong, K. H.Biosynthetic enhancement of single-stage poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by manipulating the substrate mixtures / Kai-Hee Huong, S. Kannusamy, S. Y. H. Lim, A. A. Amirul //Journal of industrial microbiology & biotechnology. – 2015. – T. 42. – №. 9. – P. 1291-1297.

53. Huong, K. H.Pronounced synergistic influence of mixed substrate cultivation on single step copolymer P (3HB-co-4HB) biosynthesis with a wide range of 4HB monomer composition / K. H. Huong, A. R. Mohd Yahya, A. A. Amirul //Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2014. – T. 89. – №. 7. – P. 1023-1029.

54. Syafiq, I.M.Synthesis of high 4-hydroxybutyrate copolymer by Cupriavidus sp. transformants using one-stage cultivation and mixed precursor substrates strategy / I. M. Syafiq, Kai-Hee Huong, K. Shantini, S.Vigneswarib //Enzyme and microbial technology. – 2017. – T. 98. – P. 1-8.

55. Jiang, X. R. Engineering the bacterial shapes for enhanced inclusion bodies accumulation / X. R. Jiang, H. Wang, R. Shen, G. Q. Chen // Metabolic engineering. – 2015. – T. 29. – P. 227-237.

56. Meng, De-Chuan Synthetic Biology of Polyhydroxyalkanoates (PHA)/ De-Chuan Meng, Guo-Qiang Chen // Synthetic Biology. – 2018. – №162. – P. 147-174.

57. Ye, J. Engineering of Halomonas bluephagenesis for low cost production of poly(3hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose / J. Ye, D. Hu, X. Che, X. Jiang // MetabolicEngineering. – 2018. – P. 143-152.

58. Виноградова, О.Н. Микробиологический синтез и свойства П(3ГБ/4ГБ) с высоким включением фракции 4ГБ / О.Н. Виноградова // Актуальная биотехнология. – 2015. - №14.

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

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т.Г. Воловой
« 06 » июня 2020 г

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Синтез поли(3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутирата) бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 в присутствии различных предшественников 4-гидроксибутирата

Направление подготовки 06.04.01 – Биология
Профиль 06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель _____ подпись, дата — Доцент, канд. биол. наук Н.О. Жила

Выпускник _____ 03.07.20 подпись, дата — В. С. Безбидо

Рецензент _____ подпись, дата — Доцент, канд. биол. наук А.Н. Бояндин

Красноярск, 2020