

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

М. Волова Т. Г. Волова

«\_\_\_» 2020 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

### ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РОСТ БАКТЕРИИ *CUPRIAVIDUSNECATORB-10646* И СИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

Направление подготовки 06.04.01 – Биология  
Магистерская программа 06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный  
руководитель

Доцент,  
Канд. биол. наук,  
Н.О. Жила

подпись, дата

К.Ю. Сапожникова

подпись, дата

С.н.с. ИБФ СО РАН  
Канд. биол.наук,  
М.Ю. Трусова

подпись, дата

Магистрант

Красноярск 2020

Рецензент

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Влияние условий культивирования на рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 и синтез полигидроксиалканоатов» содержит 86 страниц текстового документа, 138 использованных источников литературы, 7 таблиц и 25 иллюстраций.

**Ключевые слова:** *Cupriavidus necator*, фруктоза, поли(3-гидроксибутират), коэффициент заполнения, хлорид аммония, поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат).

Накопление и утилизация твердых отходов, значительную часть которых представляют пластики – глобальная экологическая проблема. Поиск и разработка новых биоматериалов, таких как полигидроксиалканоаты, способных к биологическому разложению – лучший путь решения данной проблемы. На сегодняшний день необходимы крупные научные исследования и разработки, направленные на снижение затрат на синтез и получение полигидроксиалканоатов. Дальнейшее снижение себестоимости продукции может открыть новые горизонты применения и улучшить образ жизни населения.

Целью настоящего исследования стало изучение влияния различных концентраций хлорида аммония и коэффициентов заполнения колб на рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 и синтез полигидроксиалканоатов. Для достижения поставленной цели реализовывались следующие задачи:

1. Исследовать совместное влияние различных концентраций хлорида аммония и коэффициентов заполнения колб на накопление биомассы и полимера бактериями *Cupriavidus necator* B-10646.
2. Изучить влияние различных концентраций хлорида аммония и коэффициентов заполнения колб на молекулярно-массовое распределение полученных полигидроксиалканоатов.

3. Исследовать влияние различных концентраций хлорида аммония и коэффициентов заполнения колб на включение мономеров 3-гидроксивалерата в состав полигидроксиалканоатов.

Исследования показали, что урожай биомассы и полимера напрямую зависит от концентрации  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и коэффициента заполнения. Установлено, что с повышением концентрации хлорида аммония и коэффициента заполнения происходит увеличение молекулярной массы полимера. Показано, что наибольшее включение мономеров 3-гидроксивалерата достигается при концентрации хлорида аммония 1 г/л и коэффициенте заполнения 0,5.

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ.....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	6
1    Литературный обзор .....	8
1.1Общая характеристика полигидроксиалканоатов .....	8
1.2Структура полигидроксиалканоатов .....	10
1.3Генетические основы формирования полигидроксиалканоатов .....	12
1.4 Биосинтез полигидроксиалканоатов .....	13
1.5 Процесс гранулообразования .....	17
1.6 Биосовместимость и биодеградируемость полигидроксиалканоатов .....	19
1.7 Продуценты полигидроксиалканоатов .....	21
1.8 Применение полигидроксиалканоатов.....	23
1.9 Проблемы промышленного производства полигидроксиалканоатов .....	26
1.10 Влияние различных факторов культивирования на рост и синтез полигидроксиалканоатов .....	27
1.10.1 ..... Влияние температуры на рост бактерий и синтез полигидроксиалканоатов .....	27
1.10.2Влияние pH среды .....	28
1.10.3 Влияние молярного соотношения углерод/азот (C/N) .....	28
1.10.4 Влияние уровня растворенного кислорода .....	30
1.11 Влияние различных факторов культивирования на молекулярно- массовые характеристики полигидроксиалканоатов .....	33
1.12 Влияние условий культивирования на мономерный состав полигидроксиалканоатов .....	36
2    Материалы и методы .....	40
2.1Объект исследования .....	40
2.2Культивирование бактерий.....	41
2.3 Контроль параметров культивирования .....	41
2.4 Определение процентного содержания и состава полимера методом газо- жидкостной хроматографии с МС-детектором .....	43
2.5 Определение молекулярных характеристик полимера .....	43
2.6 Определение концентрации кислорода.....	44

2.7 Получение электронных изображений бактериальных клеток .....	44
2.8 Статистическая обработка результатов .....	44
3 Результаты .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1 Влияние условий культивирования на рост бактерий <i>C. necator</i> B-10646 .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2 Влияние условий культивирования на накопление полигидроксиалканоатов бактериями <i>C. necator</i> B-10646.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3 Влияние условий культивирования на молекулярно-массовые характеристики полигидроксиалканоатов .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.4 Статистический анализ влияния условий культивирования на рост бактерий <i>C. necator</i> B-10646 и синтез полигидроксиалканоатов .....	<b>Error!</b> <b>Bookmark not defined.</b>
3.5 Влияние условий культивирования на включение сополимеров .....	<b>Error!</b> <b>Bookmark not defined.</b>
ВЫВОДЫ.....	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	47

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время довольно остро стоит проблема накопления и утилизации твердых бытовых отходов, большую часть которых представляют пластики, не способные разлагаться в окружающей среде. Все большее значение приобретает поиск и разработка новых биоразлагаемых материалов. В последние десятилетия активно развивается производство пластмасс с использованием возобновляемого сырья, и все больший интерес представляет производство пластмасс, известных как биополимеры, которые могут быть биоразлагаемыми.

Биополимеры являются важной альтернативой синтезируемых из нефти полимеров благодаря их биодеградируемости, получению из возобновляемого сырья и огромному спектру применения в различных отраслях – от расходных материалов до медицинской сферы. Они могут быть произведены на биоперерабатывающих заводах в рамках интегрированных биопроцессов[78].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) - это нетоксичные, биосовместимые, биоразлагаемые термопласти, которые могут быть получены из возобновляемых ресурсов. Они обладают высокой степенью полимеризации, являются оптически активными, изотактическими и нерастворимыми в воде биополимерами. Эти особенности делают их конкурентоспособной альтернативой нефтехимическим пластикам [72].

ПГА синтезируются различными микроорганизмами из широкого спектра субстратов, таких как возобновляемые ресурсы (сахароза, крахмал, целлюлоза, триацилглицерины), ископаемые ресурсы (метан, минеральное масло, бурый уголь, каменный уголь), побочные продукты различных производств (меласса, сыворотка, глицерин), химические вещества (пропионовая кислота, 4-гидроксимасляная кислота) и углекислый газ[88].

На сегодняшний день необходимы крупные научные исследования и разработки, направленные на снижение затрат на синтез и получение этих биополимеров, поиск эффективных методов извлечения и последующей

переработки ПГА с целью повышения их коммерциализации. Высокая себестоимость производства по сравнению с обычными пластиками на нефтяной основе все еще остается большим препятствием для роста и расширения производства ПГА. Дальнейшее снижение себестоимости продукции может открыть новые горизонты применения в медицинских науках и улучшить образ жизни населения. Именно поэтому, актуальность данного исследования не вызывает сомнений.

**Цель исследования:** изучение влияния концентрации хлорида аммония и коэффициента заполнения колб на рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 и синтез полигидроксиалканоатов.

**Задачи:**

1. Исследовать совместное влияние различных концентраций хлорида аммония и коэффициентов заполнения колб на накопление биомассы и полимера бактериями *Cupriavidus necator* B-10646.
2. Изучить влияние различных концентраций хлорида аммония и коэффициентов заполнения колб на молекулярно-массовое распределение полученных полигидроксиалканоатов.
3. Исследовать влияние различных концентраций хлорида аммония и коэффициентов заполнения колб на включение мономеров 3-гидроксивалерата в состав полигидроксиалканоатов.

Исследование выполнено в рамках проекта «Агропрепараты нового поколения: стратегия конструирования и реализация» (Соглашение № 074-02-2018-328) в соответствии с Постановлением №220 Правительства Российской Федерации от 9 апреля, 2010, «О мерах по привлечению ведущих ученых в российские образовательные организации высшего образования».

# 1      Литературный обзор

## 1.1    Общая характеристика полигидроксиалканоатов

В настоящее время известно большое количество биоразлагаемых полимеров, представляющих конкурентную альтернативу синтетическим пластикам. Особое место среди таких биопластиков занимают полигидроксиалканоаты (ПГА). Они представляют собой сложные полиэфиры гидроксиалкановых кислот, синтезируемые и запасаемые многими бактериями в качестве резервного источника углерода и энергии в ответ на экзогенный стресс или ограничение питательных веществ, таких как азот, фосфаты, а также кислород [31;88]. Когда источник углерода исчерпан, накопленные ПГА полимеризуются, и продукты их разложения могут использоваться в качестве источника углерода и энергии [11; 32]. Долгоевремя считалось, что ПГА накапливаются только в цитоплазме бактериальных клеток в виде гранул, имеющих диаметр от 0,2 до 0,5 мкм [65]. Однако в 2006 г. было показано, что ПГА также могут выделяться во внеклеточную среду генетически модифицированным *Alcanivorax borkumensis* SK2 [110].

Наиболее изученным членом семейства ПГА является полигидроксибутират (П(ЗГБ)), содержащий повторяющиеся единицы 3-гидроксибутират. Этимономеры полимеризуются в высокомолекулярные полимеры в диапазоне от 200000 до 3000000 Да, в зависимости от микроорганизма и условий роста [121].

История изучения класса полигидроксиалканоатов берет начало в 1900-х годах (рисунок 1). Впервые ПГА были обнаружены в 1888 г. Бейеринком, однако, он не смог определить их роль и химическую структуру. В 1926 году французский исследователь Лемонг (Lemoigne) получил поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)) из *Bacillus megaterium* [79]. В 1958 г. Макрэй и Уилкинсон доказали, что ПГА в бактериальных клетках играют роль резерва

углерода и энергии, и синтезируются клетками только в условиях ограниченного роста [88].

Начиная с 1959-х годов, на мировой рынок вышли компании, которые были созданы для коммерциализации ПГА как экологически чистых биопластиков. W.R. Grace&Company была первой компанией, которая попыталась произвести П(ЗГБ). Однако низкая эффективность синтеза и проблемы с очисткой ПГА привели к закрытию компании. Начиная с 1980-х годов, ПГА производились под торговыми названиями Biopol<sup>TM</sup>, Nodax<sup>TM</sup>, Biocycle<sup>TM</sup>, Biomert<sup>TM</sup>, BioGreen<sup>TM</sup>.

В настоящее время рынок ПГА постоянно расширяется [6].



Рисунок 1- Этапы изучения полигидроксиалканоатов на протяжении XX века

К настоящему времени исследователями накоплен огромный материал об этом классе биополимеров. Подобно геному, транскрипту и протеому, спектр ПГА также обладает огромным разнообразием и сложной структурой. Для отражения разнообразия полимеров, блок-сополимеров, молекулярных масс и их комбинаций, которые присутствуют в конкретный момент времени в бактериальной клетке былведен термин «ПГАом» [25].

## 1.2 Структура полигидроксиалканоатов

Полигидроксиалканоаты - это класс сложных линейных полиэфиров, состоящих из мономеров гидроксикислот, связанных эфирной связью (рисунок 2). Эфирные связи образуются путем соединения карбоксильной группы первого мономера с гидроксильной группой следующего мономера [98].

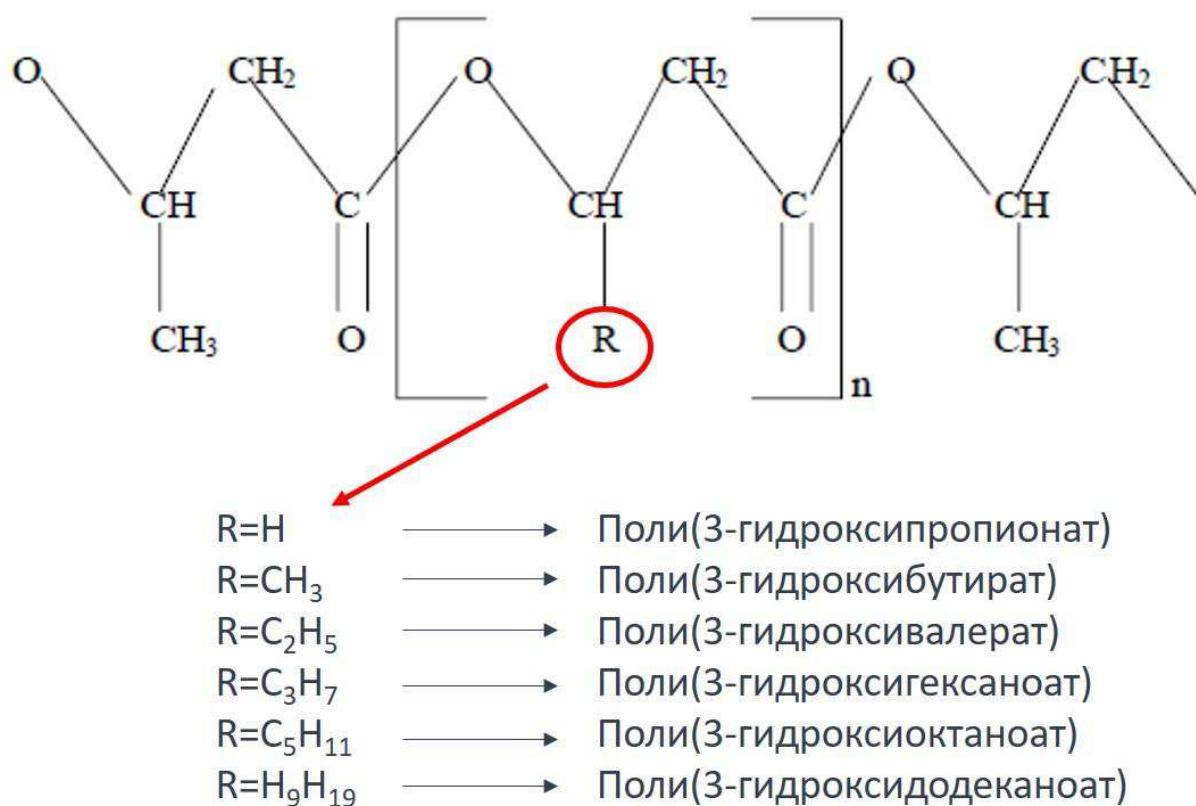


Рисунок 2 – Структура полигидроксиалканоатов [78]

В зависимости от количества атомов углерода в мономерах, ПГА классифицируются в основном на три отдельные группы: ПГА<sub>кц</sub> (ПГА с короткой цепью, C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>), ПГА<sub>сц</sub> (ПГА со средней длиной цепи, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>) и ПГА<sub>дц</sub> (длинноцепочечные ПГА, C<sub>14</sub>-C<sub>n</sub>) [132]. ПГА<sub>кц</sub> синтезируется широким спектром бактерий, включая *Cupriavidus necator*(ранее *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*), и представляют собой высоко- и низкокристаллические полимеры с различными температурами плавления и стеклования. Именно хрупкость наиболее известного гомополимера поли(3-гидроксибутират) ограничивает его использование в качестве замены нефтехимическим термопластам [121]. ПГА<sub>сц</sub> накапливаются главным образом видами *Pseudomonas*.

Некоторые бактерии при использовании смешанных субстратов способны продуцировать сополимеры ПГА. К сополимерам ПГА<sub>кц</sub> относятся поли(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксивалерат) (П(3ГБ-ко-3ГВ)) и поли(3-гидроксибутират-ко-4-гидроксибутират) (П(3ГБ-ко-4ГБ)), а сополимеры ПГА<sub>сц</sub> включают, например, поли (3-гидроксигексаноат-ко-3-гидроксиоктаноат) (П(3ГГ-ко-3ГО)). Также показана способность некоторых видов бактерий к синтезу блок-сополимеров ПГА, которые состоят из регулярно или статистически чередующихся гомополимерных блоков, различающихся по составу или строению[12].

Структурный состав ПГА зависит как от типа углерода, поставляемого в качестве субстрата для роста, так и от используемого бактериального штамма. Боковая цепь может быть насыщенной или ненасыщенной, также может иметь разветвленные, ароматические, галогенированные и другие мономеры. Например, из *Pseudomonas putida* были извлечены ПГА, включающие такие компоненты, как бромид и ароматические группы [46].

### 1.3 Генетические основы формирования полигидроксиалканоатов

Биосинтетический путь П(ЗГБ) обеспечен группой генов: ген *phbA* (для фермента 3-кетотиолазы), ген *phbB* (для фермента NADPH-зависимой ацетоацетил-КоА редуктазы) и ген *phbC* (для П(ЗГБ)-синтазы). Эти гены зачастую сгруппированы и предположительно организованы в один оперон *phbCAB*. Локусы, содержащие гены биосинтеза ПГА, были охарактеризованы у различных видов бактерий[84].

В *Acinetobacter sp.*, *Azohydromonas lata*, *Pseudomonas acidophila* и *Cupriavidusnecator*, гены *phbCAB* располагаются вместе на хромосоме (рисунок 3), хотя и не обязательно в одном и том же порядке. У *Paracoccus denitrificans*, *Rhizobium meliloti* и *Zoogloea ramigera* локусы *phbAB* и *phbC* не связаны между собой [125]. ПГА-полимераза имеет две субъединицы у *Chromatiumvinosum*, *Thiocystisviolacea* и *Synechocystis*, которые кодируются генами *phbE* и *phbC*, причем гены *phbA* и *phbE* находятся в одном локусе, но имеют различную ориентацию[55].

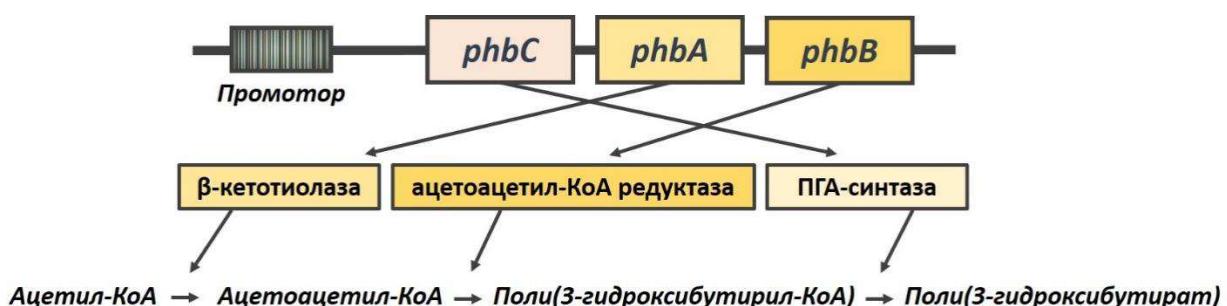


Рисунок 3 - Структура оперона *phbCAB* и продукты его генов  
(Madison and Huisman, 1999)

Локусы *phbCAB* расположены на хромосоме у *Chromatiumvinosum*, *Thiocystisviolacea* и *Synechocystis*. Гены *phbA* и *phbE* находятся в одном локусе, но имеют различную ориентацию[55].

ПГА<sub>сп</sub>, локусы pha содержат два гена phaC, разделенных геном phaZ, который кодирует внутриклеточную деполимеразу ПГА [55].

Разнообразие биосинтетических путей П(ЗГБ) показывает, насколько сильно в процессе эволюции разошлись эти локусы. Phb-гены (гены, кодирующие ферменты для ПГА<sub>кп</sub>) и pha-гены (гены, кодирующие ферменты для ПГА<sub>сп</sub>) не всегда сгруппированы, а сама организация генов варьирует от вида к виду.

## 1.4 Биосинтез полигидроксиалканоатов

П(ЗГБ) и родственные ПГА образуются и накапливаются внутриклеточно в виде гранул. Эти гранулы имеют на поверхности значительное количество белков, поэтому предполагается, что гранулы представляют собой супермолекулярные комплексы со специфическими функциями. Для таких комплексов был предложен специальный термин – «карбоносома», который иллюстрирует многофункциональность и сложность гранул ПГА [61].

Многие работы были посвящены изучению биохимических путей, ведущих к образованию предшественников ПГА, а также изучению молекулярных и биохимических основ работы ПГА-синтазы [11;23;118]. Общий биохимический путь, ведущий от центральных промежуточных продуктов до П(ЗГБ) довольно прост и требует только трех ферментативных стадий, начиная с конденсации двух молекул ацетил-кофермента А (тиолазная реакция,  $\beta$ -кетотиолаза) в ацетоацетил-СоА и последующее восстановление ацетоацетил-СоА (редуктазная реакция, ацетоацетил-КоА-редуктаза) до мономерного предшественника 3-гидроксибутирил-СоА, который полимеризуется с помощью ПГБ-синтазы (PhaC) [11;84]. Именнотакой биохимический путь был обнаружен у *Cupriavidus necator* (рисунок 4), *Aeromonashydrophilai* и *Pseudomonas stutzeri*.

Как уже ранее упоминалось, у многих организмов два вида генов, кодирующие ферменты для синтеза ПГА, группируются в блоки транскрипции, например, оперон *rphaCAB* у *Cupriavidus necator*, который конститутивно экспрессируется независимо от условий роста. Однако интенсивный синтез П(ЗГБ) начинается только тогда, когда источник углерода доступен в избытке. П(ЗГБ) может занимать до 90% от сухого веса клетки в *C. necator* H16 [97; 106].

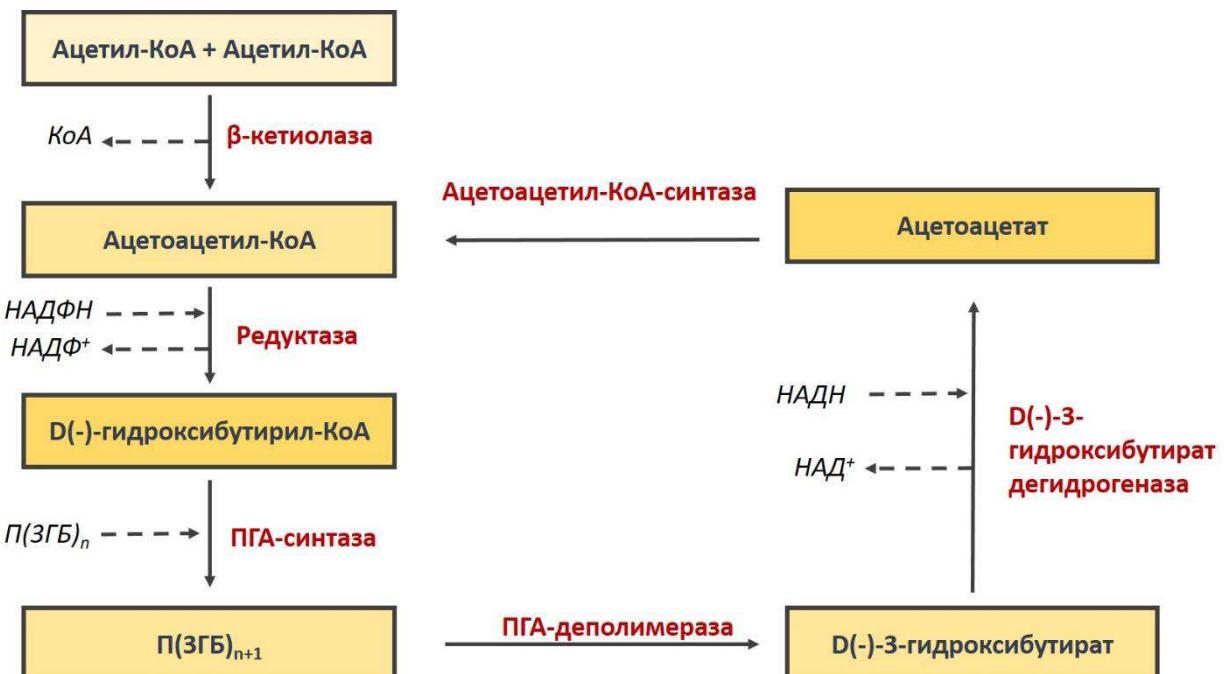


Рисунок 4 - Метаболический путь ПГБ у *C. necator* [78]

Существует несколько вариантов пути синтеза ПГА<sub>сп.</sub>

В первом случае из источника углерода метаболизируется путем окисления жирных кислот с образованием 3-гидроксиацил-КоА, при участии фермента (R)-специфической олиг-КоА-гидратазы (кодируется геном *PhaJ*) [44]. Во втором случае из несвязанных субстратов образуются предшественники 3-гидроксиацил-КоА. Третий путь представляет собой реакцию удлинения цепи, в которой ацетил-КоА превращается в 3-гидроксиацил-КоА [104]. Далее этапы биосинтеза П(ЗГБ) будут рассмотрены подробнее.

На первом этапе *PhaA* ( $\beta$ -кетиолаза) катализирует первую реакцию в биосинтезе П(ЗГБ) – конденсацию двух молекул ацетил-КоА в ацетоацетил-

Коа. Недавно была определена кристаллическая структура PhaA из *C. necator*, которая указывает на то, что этот фермент существует в виде тетрамера [68; 71]. Кетиолазная реакция является двухступенчатой и включает стадию ковалентного катализа и стадию конденсации. На стадии ковалентного катализа ацетил-КоA входит в активный центр фермента, где тиольная группа аминокислоты Cys88 в составе фермента атакует тиоловую эфирную связь ацетил-КоA, образуя при этом промежуточное звено ацетил-S-фермента. На стадии конденсации вторая молекула ацетил-КоA попадает в активный центр и депротонируется Cys379, после чего соединяется с ацетил-S-ферментом, образуя ацетоацетил-Коа.

Кроме того, в других недавних исследованиях сообщалось, что *C. necator* H16 имеет 14 изоформ  $\beta$ -кетотиолазы [19]. Поскольку многие бактерии имеют в своем геноме только один или два гена, кодирующих  $\beta$ -кетотиолазу, очевидно, что *C. necator* обладает возможностями к производству различных типов ПГА, что обеспечивает ему преимущество в отношении других продуцентов.

На втором этапе биосинтеза П(ЗГБ) ацетоацетил-Коа восстанавливается до (R)-3-НВ-СоА под воздействием фермента ацетоацетил-КоА-редуктазы с использованием NADPH в качестве кофактора. Кристаллическая структура этого фермента у *C. necator* показывает, что он относится к семейству короткоцепочечных дегидрогеназ-редуктаз и существует в виде тетрамера. Каталитическая реакция протекает в активном центре фермента, где расположены три аминокислотных остатка: Asn112, Tyr153 и Lys157 [69].

На третьем этапе происходит полимеризация полимеров. ПГА-синтаза является ключевым ферментом синтеза ПГА. На сегодняшний день было идентифицировано более 60 различных генов phaC. Одной из выдающихся характеристик PhaC является его широкая субстратная специфичность. На основе составляющих субъединиц, аминокислотной последовательности и специфичности субстрата ПГА-синтазы могут быть разделены на четыре класса. Известно, что мономеры с короткой цепью полимеризуются синтазами

I, III и IV классов, а мономеры со средней длиной цепи синтазами класса II. ПГА-синтазы класса I (например, у *Cupriavidus necator*) и класса II (например, у *Pseudomonas putida*) состоят из одной субъединицы (PhaC) с молекулярной массой от 61 кДа до 73 кДа [100]. Синтазы класса III (например, у *Allochromatium vinosum*) и класса IV (например, у *Bacillus megaterium*) состоят из двух типов субъединиц: PhaC (40,3 кДа) и PhaE (20 или 40 кДа), и PhaC (41,5 кДа) и PhaR (22 кДа) соответственно [88].

При полимеризации П(ЗГБ) перваямолекула (R)-3-НВ-СоА входит в активный центр фермента, образуя первый тетраэдрический промежуточный продукт. После этого, втораямолекула (R)-3-НВ-СоА входит в активный участок, присоединяясь к терминальной гидроксильной группе первой молекулы (R)-3-НВ-СоА, в результате чего образуется второй тетраэдрический промежуточный продукт. Цикл повторяется с вновь поступившим (R)-3-НВ-СоА.

Было показано, что PhaC существует как смесь неактивной мономерной и активной димерной форм, и при связывании ГБ-КоАс первым мономером происходит стабилизация второго мономера с помощью электростатических взаимодействий [68]. Кроме того, кинетические исследования дополнительно показывают, что скорость непосредственно полимеризации значительно быстрее скорости инициации реакции *in vivo* и *in vitro* [28].

Технологические аспекты производства ПГА, включая бактериальную ферментацию, выделение и физико-химическую характеристику полимера, тщательно изучаются в течение последних десятилетий, однако, знания о регуляторных механизмах на молекулярном уровне относительно ограничены.

Регуляция метаболизма ПГА происходит разными путями. Это может быть активация экспрессии генов *pha* вследствие специфических сигналов окружающей среды, таких как дефицит питательных веществ; активация синтетических ферментов ПГА клеточными компонентами или промежуточными продуктами метаболизма; ингибирование метаболических ферментов конкурирующих путей и, следовательно, обогащение

необходимыми промежуточными продуктами ферментов синтеза ПГА; а также комбинации описанных вариантов[64].

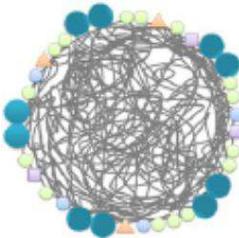
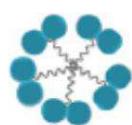
Хорошо известно, что синтез П(ЗГБ) регулируется на ферментативном уровне и что внутриклеточная концентрация ацетил - КоA и свободных коферментов играет центральную роль в регуляции синтеза полимеров [54]. Было также показано, что синтез П(ЗГБ) стимулируется как высокими внутриклеточными концентрациями NAD(P)H, так и высокими соотношениями NAD(P)H:NAD(P) [77].

## 1.5 Процесс гранулообразования

Гранулы ПГА покрыты слоем фосфолипидов, на поверхности которого обнаружены различные компоненты: ПГА-полимераза, ПГА-деполимераза, белки-фазины PhaI и PhaF и другие белки, связанные с процессом биосинтеза. PhaD является единственным белком из кластера генов, ответственных за синтез ПГА, который не обнаружен на поверхности гранул. PhaF и PhaI играют структурную роль в формировании гранул. Они служат элементомстыковки между гранулами полимера и цитоплазмой и, как полагают, облегчают сегрегацию гранул во время деления клеток [47]. Показано, что фазин PhaF оказывает влияние на форму и размер бактерий [91].

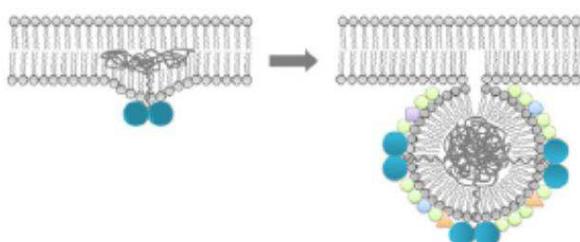
Сам процесс формирования гранул ПГА до конца не изучен. В настоящее время существует несколько моделей формирования гранул ПГБ (рисунок 5). Они основаны как на теоретических предположениях, так и на экспериментальных данных, полученных в исследованиях бактерии *C. necator*.

## Модель «Мицелл»



- ПГБ-синтаза
- ~~~~ ПГБ Полимер
- PhaP1
- Фазины
- ▲●● PhaZs
- PhaR
- PhaM
- Фосфолипиды

## «Budding-модель»



## «Scaffold-модель»

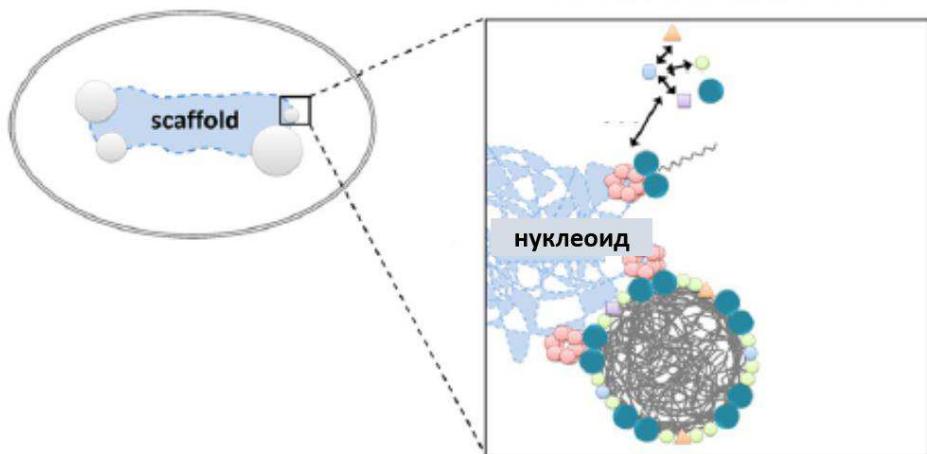


Рисунок 5 - Три основных модели формирования гранул ПГА[62]

Так называемая модель «мицелл» предполагает, что растворимые молекулы ПГБ-синтазы (димеры PhaC1) начинают продуцировать гидрофобные молекулы П(ЗГБ), если концентрация субстрата (3-гидроксибутирил-СоА) достаточно высока [50]. Из-загидрофобности и низкой растворимости П(ЗГБ) в водной среде, зарождающиеся полимерные цепи-агрегаты образуют мицеллоподобные структуры в цитоплазме счастью гидрофильных молекул PhaC, расположенных на полимере [119].

Budding-модель предполагает, что ПГБ-синтаза расположена или прикреплена к цитоплазматической мембране, а растущая гидрофобная цепь ПГБ высвобождается в бислой мембранны, что приводит к образованию гранул прямо в мембране. Интеграция ЗГБ-олигомеров в цитоплазматическую мембрану хорошо известна для олиго-ПГБ [35]. После интеграции агрегаты ПГБ достигают определенного размера, присоединяют фазины и другие элементы, образуя гранулы.

Третья модель («Scaffold Model») предполагает, что ПГБ-синтаза зарождающихся гранул присоединяется к еще неизвестной scaffold-молекуле внутри клетки. В этом случае субклеточная локализация гранул будет зависеть от природы и локализации scaffold-молекулы. По результатам исследований, в которых были получены криотомограммы клеток бактерий, можно предположить, что нуклеоид и представляет собой тот самый якорь или scaffold-молекулу, к которой прикрепляются гранулы ПГБ [14; 123].

## **1.6                    Биосовместимость                    и                    биодеградируемость полигидроксиалканоатов**

Биодеградируемость и биосовместимость являются важными характеристиками ПГА.

Биосовместимость как качество материалов характеризуется отсутствием какого-либо токсического соединения, образующегося при деградации полимера, а также формой и поверхностной пористостью материала. Биосовместимость П(ЗГБ) обеспечивается тем, что ЗГБ является нормальным компонентом крови и присутствует в клеточной оболочке эукариот. Именно это свойство позволяет рассматривать ПГА в качестве материалов, пригодных для использования в медицинской сфере [138].

Другим, не менее важным, свойством ПГА является его способность к естественной биодеградации. Эти полимеры могут полностью деградировать до воды и углекислого газа в аэробных условиях и до метана и углекислого

газа в анаэробных условиях [65]. ПГА разлагаются при попадании в почву, компост или деградируют в составе морских отложений. Биодеградация зависит от ряда факторов: микробная активность окружающей среды, площадь открытой поверхности, влажность, температура, pH, молекулярная масса, состав и кристалличность полимеров [17; 121]. Было показано, что из компактных молекул ПГА более восприимчивы к биодеградации.

ПГА разлагаются микроорганизмами внеклеточно и внутриклеточно под действием специфических ферментов – ПГА-деполимераз, которые превращают сложные полиэфиры в водорастворимые полиолигомеры и мономеры, используемые организмами в качестве источника углерода. Деградация ПГА у бактерий *C. necator* может происходить одновременно с биосинтезом при лимитировании азотом.

Микроорганизмы из семейств *Pseudonocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* и *Streptomycetaceae* преимущественно деградируют П(ЗГБ) в окружающей среде с использованием внеклеточных деполимераз. Исследования ПГА-деполимеразы, выделенной из *Alcaligenes faecalis* показали, что этот фермент относится к классу гидrolаз. Другими известными организмами, у которых была выявлена и исследована деполимераза, являются *Rhodospirillum rubrum*, *B. megaterium*, *A. beijerinckii* и *Pseudomonas lemoignei* [121].

Во время внутриклеточной деградации ПГА-деполимераза в клетке расщепляет П(ЗГБ) до 3-гидроксимасляной кислоты, которая позже окисляется дегидрогеназой до ацетилацетата и  $\alpha$ -кетотиолазой до ацетил-КоА. В аэробных условиях ацетил-КоА входит в цикл лимонной кислоты и окисляется до CO<sub>2</sub>. Гены, кодирующие структуру внутриклеточных деполимераз, были изучены на примере бактерий *C. necator H16* – это гены phaZ1, phaZ2, phaZ3, phaZ4, phaZ5 и phaZ6[5; 111].

Исследования с использованием *C. necator* показали, что внутриклеточная деградация включений П(ЗГБ) является очень медленным процессом. Скорость деградации П(ЗГБ) примерно в 10 раз медленнее

скорости его синтеза[37]. Известно, что низкие концентрации идиозопилуорофосфата ингибируют активность деполимеразы, что приводит к предположению о том, что этот фермент является серинэстеразой [111]. По сравнению с внеклеточными деполимеразами, которые действуют на кристаллические формы ПГА, предполагается, что механизм работы внутриклеточных деполимераз отличается из-за аморфной природы внутриклеточных включений ПГА [118].

## 1.7 Продуценты полигидроксиалканоатов

Выбор микроорганизма для производства ПГА должен основываться на нескольких факторах: способность клетки использовать недорогой источник углерода, скорость роста бактерий, скорость синтеза полимеров и максимальную степень накопления полимеров. Выделение и очистка ПГА также должны быть учтены, поскольку эти процессы существенно влияют на общую экономику производственного процесса [134]. С учетом вышеупомянутых факторов некоторые бактерии, описанные ниже, пригодны для производства ПГА.

С тех пор как П(ЗГБ) были впервые описаны в *Bacillus subtilis*, было обнаружено почти 90 штаммов бактерий, которые накапливают эти полиэфиры[43].

Только за последнее десятилетие изучены сотни микроорганизмов, обладающих способностью продуцировать различные типы ПГА. Это грамположительные, грамотрицательные бактерии и археи. Большинство из них нельзя использовать для промышленного производства, поскольку их способность синтезировать ПГА недостаточна.

Одними из первых бактерий, способных накапливать ПГА в промышленном масштабе, были описаны *Cupriavidus necator*[24]. *Cupriavidus necator* стал первым видом, использованным для производства сополимера П(ЗГБ-со-ЗГВ) компанией Imperial Chemical Industries под торговым

названием Biopol™. Процесс ферментации при участии этих бактерий является одним из наиболее эффективных. Еще в 1994 г. было показано, что *Cupriavidus necator* способен накапливать до 76 % П(ЗГБ) в перерасчете на сухой вес биомассы в процессе периодической ферментации с подпиткой, при росте на глюкозе (10–20 г/л) в течение 50 ч культивирования, а также до 110 г/л сополимера П(ЗГБ-со-зГВ) при той же стратегии культивирования [67].

*Burkholderia sacchari* является потенциальным промышленным продуцентом ПГА. Показано, что этот вид бактерий способен усваивать до тридцати различных источников углерода в качестве косубстратов для включения различных мономеров в ПГА. Наибольшая концентрация П(ЗГБ) (51,5 %) наблюдалась в культуре, дополненной гексановой кислотой [86].

Еще один представитель рода *Burkholderia* – *Burkholderia sp.* USM (JCM15050) был идентифицирован как эффективный продуцент ПГА, способный накапливать до 70% П(ЗГБ) при росте на неочищенном пальмоядовом масле [22].

Выявлено также, что *Methylobacterium* способны накапливать ПГА при росте на метаноле. Исследования по применению *Methylobacterium sp.* GW2 показали, что эти бактерии способны накапливать до 40% П(ЗГБ) [137].

Показано, что *Methylobacterium sp.* GW2 способны производить сополиэфир поли-3-гидроксибутират-поли-3-гидроксивалерат,

при подаче валериановой кислоты в качестве дополнительного источника углерода помимо метанола [88].

Бактерии вида *Pseudomonas mosselli*, культивируемые на пальмоядовом масле и масле соевых бобов, способны накапливать до 50 % ПГА [27].

Также показано, что *Haloferax mediterranei* при росте на чистом глицерине синтезируют до 75,4% сополиэфира П(ЗГБ-со-зГВ) [56]. Среди менее продуктивных бактерий следует отметить штамм *Massilia sp.* UMI-21, способный накапливать до 45,5 % П(ЗГБ) при росте на крахмале [52];

штамм *Aquitaleasp. USM4* способен накапливать до 1,5 г/л П(ЗГБ) [90]; психрофильный штамм *Pseudomonas mandelli CBS-1* способен накапливать до 22,3 г/л П(ЗГБ) при росте на сахарозе в условиях низких температур [80]. Несмотря на большое разнообразие бактерий, способных к накоплению ПГА, в настоящее время еще многие бактерии, являющиеся потенциальными продуцентами ПГА, остаются неизвестными.

В дополнение к естественным штаммам-продуcentам ПГА создаются генетически рекомбинантные штаммы. Например, *Escherichia coli* обычно не продуцирует ПГА, но инструменты генной инженерии позволили создать на основе этих бактерий перспективных промышленных продуцентов ПГА. Известно, что генетически модифицированная *Escherichia coli* способна накапливать до 90% П(ЗГБ) [129]. В настоящее время, гены, ответственные за синтез ПГА, выделены из ряда общезвестных продуцентов ПГА, таких как *Cupriavidus necator* [58; 126]; *Thiocapsa pfefferi* [81] и *Streptomyces aureofaciens* [85] были введены в *Escherichia coli* и получены перспективные генно-инженерные штаммы-продуценты ПГА.

Общепризнано, что аккумулируют ПГБ только прокариоты. Однако структуры, напоминающие гранулы ПГБ, были недавно обнаружены в клетках человека [39], а также к продукции ПГА способны водоросли, дрожжи и генно-инженерные растения [103].

Низкомолекулярный ПГБ (100-200 мономерных единиц) обнаружен не только в бактериальных плазматических мембранах *Azotobacter vinelandii* и *B. subtilis*, но также встречается и в различных тканях растений и животных. Несмотря на отсутствие *in vivo* доказательств функций ПГБ, предполагается, что эти низкомолекулярные формы выполняют функцию ионселективных каналов [108].

## 1.8 Применение полигидроксиалканоатов

В связи с тем, что ПГА обладают широким спектром полезных свойств (биоразлагаемость, термопластичность, биосовместимость, отсутствие токсичности), они считаются конкурентной альтернативой нефтехимическим полимерам (рисунок 6).

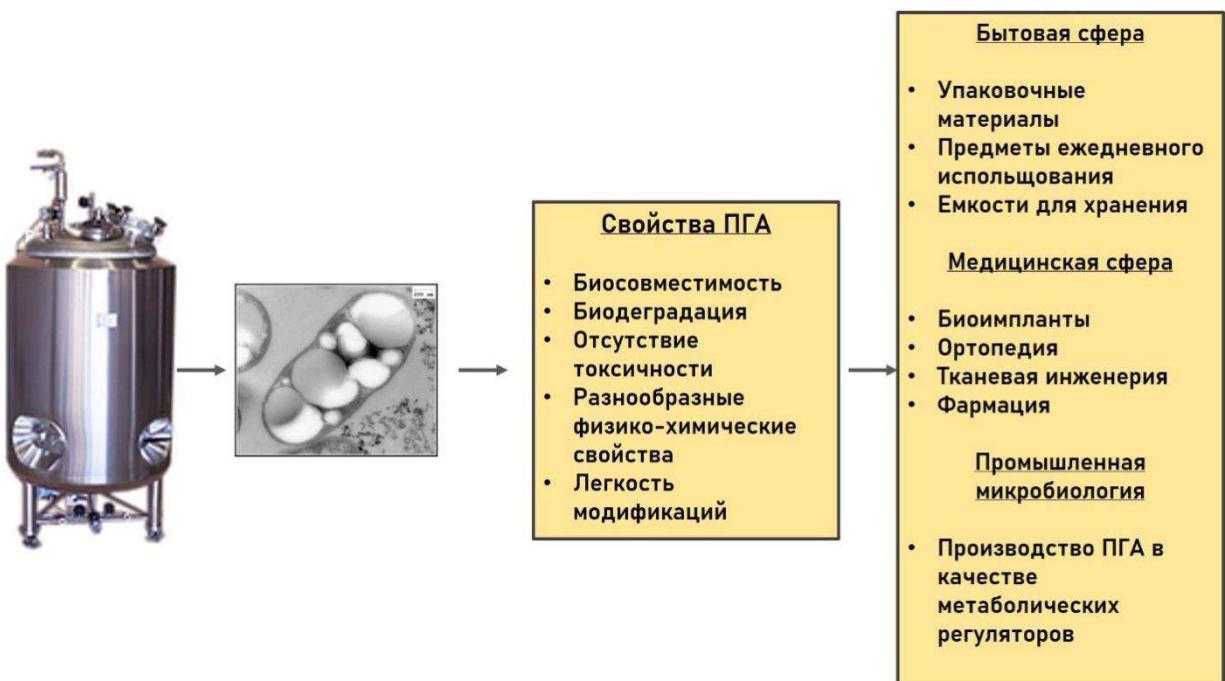


Рисунок 6 – Область применения ПГА

Именно свойства полигидроксиалcanoатов обуславливают их широкое применение в различных сферах жизни человека.

Первоначально ПГА использовались в качестве упаковочных материалов. В основном это были мешки, контейнеры и прочие покрытия. Бытовая сфера применения ПГА также включает их использование в качестве одноразовых предметов быта – это бритвы, посуда, подгузники, средства женской гигиены, контейнеры и емкости для косметических средств [57]. Кроме того, ПГА могут быть использованы в качестве носителей для длительного высвобождения гербицидов, фунгицидов и инсектицидов.

ПГА являются перспективными материалами особенно в биомедицинской сфере. Гомополимер П(ЗГБ) и сложный сополимер П(ЗГБ-со-ЗГВ) являются наиболее изученными типами ПГА для данной сферы. В

последние годы этот класс биополимеров рассматривается в качестве материалов для изготовления сердечно-сосудистых препаратов (сердечные клапаны, стенты, сосудистые трансплантаты), в лечении ран (швы, манжеты, тампоны, ремешки), благодаря своим пьезоэлектрическим свойствам в ортопедии (в качестве остеосинтетического материала для стимуляции роста костей, в костных пластинах). Высокая иммунотolerантность, низкая токсичность и способность к биологическому разложению открывают широкие возможности для применения полигидроксиалканоатов в тканевой инженерии[88].

Полигидроксиалканоаты также являются перспективными биоматериалами в фармацевтике. С использованием генетически модифицированных бактерий *Pseudomonas entomophila* получены некоторые фармацевтические препараты, антибиотики, пищевые добавки, ароматизаторы и витамины[30]. Показано, что гомополимер 3-гидроксиоктановой кислоты П(ЗГО), проявляет потенциальную антимикробную активность[109]. Также известно, что 3-гидроксигексановую кислоту (3-ГГ) можно использовать в качестве промежуточного соединения для синтеза аналогов лаулималида, который является противоопухолевым препаратом [42].

ПГА также полезны в качестве стереорегулярных соединений, которые могут служить хиральными предшественниками для химического синтеза оптически активных соединений [93]. Такие соединения, в частности, используются в качестве биоразлагаемых носителей для длительной дозировки лекарственных средств, медикаментов, гормонов.

Известно, что П(ЗГБ) легко гидролизуется до R-3-гидроксимасляной кислоты, которая используется в синтезе антиглаукомного препарата компанией Merck's Truspot. В тандеме с R-1,3-бутандиолом эта кислота также используется в синтезе  $\beta$ -лактамов.

Несмотря на большой потенциал ПГА, медицинские и фармацевтические применения этих полимеров ограничены из-за медленной

биодеградации и высокой гидравлической плотности в стерильных тканях [127].

Помимо прочего, ПГА рассматриваются как источник для синтеза хиральных соединений (энантиометрически чистых химических веществ) и являются сырьем для производства красок. ПГА может быть легко деполимеризован до богатого источника оптически активных, чистых, бифункциональных гидроксикислот. Полигидроксиалканоаты растительного происхождения могут быть деполимеризованы и использованы, непосредственно сразу или после этерификации в производстве сыпучих химических веществ [18]. Помимо альтернативы для замены существующих растворителей, эфиры и производные  $\beta$ -гидроксикислот, вероятно, найдут широкое применение в качестве «зеленых» растворителей, подобных эфирам молочной кислоты [103].

# **1.9 Проблемы промышленного производства полигидроксиалкоатов**

В последние годы полигидроксиалканоаты привлекли большое внимание как в области научных исследований, так и в промышленности. Основным недостатком этих биополимеров является высокая себестоимость производства: ПГА примерно в 15 раз дороже, чем полимеры, полученные из нефти, например пластики на основе полипропилена [116]. Наиболее значительная статья расходов при промышленном производстве ПГА – это затраты на источники углерода, которые составляют около 50% от конечной стоимости продукта [88]. Процесс выделения и очистки биополимеров также способствует повышению стоимости их производства [94].

Дальнейшие исследования имеют важное значение для улучшения количественного и качественного выхода ПГА. Чтобы снизить стоимость этих биополимеров, необходимо провести работу по поиску комплекса

оптимальных условий культивирования, позволяющих добиваться больших выходов как бактериальной биомассы, так и полигидроксиалканоатов.

Основными факторами, влияющими на себестоимость производства, являются тип источника углерода, текущие затраты на ферментацию, производительность процесса, выходы по выбранным источникам углерода и последующая очистка и обработка[76].

## **1.10 Влияние различных факторов культивирования на рост и синтез полигидроксиалканоатов**

Одним из подходов к снижению себестоимости производства ПГА является использование недорогих источников углерода, таких как меласса, крахмал, глицерин, растительных масел и других дешевых жировых субстратов [72]. Такие субстраты привлекают внимание как исследователей, так и промышленных предприятий [29].

Однако, хороших выходов ПГА можно достичь не только путем поиска новых субстратов, но и оптимизацией производства уже известных – подбором комплексов подходящих условий культивирования бактерий.

### **1.10.1 Влияние температуры на рост бактерий и синтез полигидроксиалканоатов**

Многие исследования показали, что оптимальная температура максимизирует скорость роста бактерий во время фазы роста[43].

В одном из исследований в этой области, оценено влияние температур на рост бактерий *Cupriavidus necator* их способности к накоплению ПГА при культивировании на отработанном масле для жарки. Клеточная биомасса увеличивалась с повышением температуры с 20 °C до 30 °C и достигала максимального значения 8,8 г/л. По мере дальнейшего повышения температуры этот показатель роста быстро уменьшался и при 40 °C достигал

минимального значения - 0,5 г/л. Показано, что при температурах 20 °С и 25 °С концентрация ПГА и его процентное содержание в клетках бактерий остаются на высоком уровне. Концентрация ПГА достигла максимального значения 7,04 г/л при 25 °С, а при температуре в 40 °С, концентрация ПГА была минимальной – 0,06 г/л [107].

### **1.10.2 Влияние pH среды**

При оценке влияния различных показателей pH было выявлено, что сухая биомасса клеток достигала наименьшего значения 1,3 г/л при pH 6. С увеличением значения pH сухая биомасса клеток достигала наибольшего значения 7,4 г/л при значении pH 7. Максимальное содержание и концентрация ПГА при данном значении водородного показателя составили 92,01% и 6,81 г /л соответственно. Сильные кислотные или щелочные среды могут вызвать массовую гибель микроорганизмов, и как следствие этого, не способствуют синтезу ПГА. Когда начальный pH меньше 6 или выше 9, концентрация ПГА практически равна нулю. Однако, слабая щелочная среда переносится бактериями лучше, чем слабокислотная. Поэтому наилучшим начальным значением pH является 7 [107].

### **1.10.3 Влияние молярного соотношения углерод/азот (C/N)**

Аммиак – это восстановленный источник азота, потребляемый бактериями для синтеза ценных для метаболического пути ПГА ферментов, и прочих белков, необходимых для роста клеток, обычно в виде солей [92].

По мнению различных исследователей, когда содержание ПГА в цитоплазме высокое или условия культивирования неблагоприятны для роста клеток, например, высокие температуры, воздействие стрессовых факторов

или конкуренция за пространство и питательные вещества, клетка может непрерывно синтезировать и выделять белки в окружающую среду, увеличивая присутствие аминогрупп ( $\text{NH}_2$ ) в культуральной среде [16].

Согласно исследованиям, когда уровни источника азота ограничены, бактерии увеличивают активность ПГА-синтазы, фермента, ответственного за выработку ПГА [105].

Многие исследования посвящены изучению влияния соотношения углерод/азот (C/N) на рост клеток и накопление ПГА [7; 33]. Как правило, увеличение соотношения C/N способствует накоплению ПГА, в то время как для роста клеток наблюдался обратный эффект. В исследовании с использованием *P. nitroreducens* соотношение C/N оказывало значительное влияние на накопление и состав ПГА. Повышенное соотношение C/N в культуральной среде приводило к увеличению накопления ПГА с 0,5 до 33,5%, хотя и наблюдалось негативное влияние на рост клеток [136]. В другом исследовании было зарегистрировано накопление ПГА до 70% (в пересчете на сухой вес биомассы бактерий) без ограничения питательных веществ с использованием *P. putida* KT2440 [122].

Многие исследования показали, что ограничение концентрации азота во время фазы накопления обеспечивает высокое содержание внутриклеточного ПГА [43]. Например, накопление поли-3-гидроксибутиратав *Bacillus megaterium* было оптимальным (~70%) при начальном соотношении C/N 15:1 с сахарозой в качестве источника углерода и сульфатом аммония ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) в качестве источника азота [41]. Кроме того, накопление ПГА в *C. necator* было максимальным (~70%) при начальном соотношении C/N 80:1 с уксусной кислотой, пропионовой кислотой или масляной кислотой в качестве источника углерода и хлоридом аммония ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) в качестве источника азота [135].

Данные исследований показывают, что биомасса бактерий достигает наименьшего значения 2 г/л, когда соотношение C/N составляет 20:0,25. Поскольку источник азота в питательной среде ограничен, нет достаточного

количества питательных веществ для обеспечения роста бактерии, поэтому и концентрация ПГА остается низкой из-за малого количества микроорганизмов в культуре. С увеличением соотношения С/Н до 20:0,75 биомасса достигает наивысшего значения 7,2 г/л. При более высоких коэффициентах С/Н лучшей концентрации клеточной биомассы достичь не удавалось [107].

Также показано, что при отношении С/Н 20:0,75 получено максимальное содержания полимера (91,54 %) и его концентрацию (6,59 г/л), при дальнейшем увеличении коэффициента С/Н содержание и концентрация полимера снижались в связи с тем, что ПГА синтезируется в клетках в основном как резерв при азотном голодаании[128;131].

В другом исследовании накопление ПГА в целом увеличивалось с увеличением отношения С/Н при фиксированной концентрации глюкозы (т. е. с увеличением степени N-дефицитного состояния). Это подтверждено и предыдущими исследованиями, которые показали, что N-дефицитные условия в присутствии избыточных источников углерода способствуют более высокому накоплению ПГА [75;131]. Например, выход П(ЗГБ) у *C. necator* возрос с 0,08 до 0,17 г/л/ч при снижении концентрации  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  с 3,00 до 0,75 г/л при фиксированной концентрации источника углерода 80 г/л, в качестве которого использовали кукурузный сироп, в основном состоящий из глюкозы [34].

Также известно, что в зависимости от соотношения С/Н изменяется не только содержание ПГА в клетках бактерий, но и характер накопления ПГА, а также время достижения максимальной концентрации[7].

#### **1.10.4 Влияние уровня растворенного кислорода**

При микробных ферментациях концентрация растворенного кислорода в культуральной среде является очень важной переменной, поскольку она влияет на метаболизм клеток, скорость их роста и жизнеспособность. Кроме того, это конструктивная переменная, которая имеет большое значение для расширения

масштабов процесса ферментации. Из-за низкой растворимости кислорода в водной фазе и относительно высокой потребности в кислороде в фазе роста биомассы концентрация растворенного кислорода часто становится лимитирующим фактором в микробных ферментациях [124]. Этот вопрос еще более остро стоит при ферментации, проводимой в колбах, в которых кислород переносится из верхней газовой фазы колбы в культуральную жидкую фазу. В общем случае скорость массопереноса кислорода будет зависеть от границы раздела газ-жидкость в колбе, относительных объемов жидкости и газа и частоты встряхивания шейкера-инкубатора [51].

Поскольку продуценты ПГА являются либо облигатными, либо факультативными аэробами, растворенный кислород (DO) является ключевым элементом для роста и поддержания жизнеспособности клеток, и должен постоянно поддерживаться на определенном уровне в связи с его низкой растворимостью в воде [49]. Как показано в формуле на рисунке 7, скорость переноса кислорода из газа в жидкость (OTR) зависит от объемного коэффициента массопереноса кислорода ( $k_{L,a}$ ) и разности концентраций кислорода в жидкой фазе ( $C_L$ ) и в равновесной фазе ( $C_L^*$ ) [99].

$$OTR = k_{L,a}(C_L^* - C_L)$$

Рисунок 7 - Уравнение для определения скорости переноса кислорода из газа в жидкость (OTR) [99]

Получение высокой объемной продуктивности ПГА является мишенью для снижения затрат [36]. Как правило, высокий уровень данного показателя достигается путем дозированного культивирования, при котором культура начавшая выращиваться с высокой плотностью клеток [60]. Такие культуры имеют высокую потребность в кислороде, и поэтому содержание растворенного кислорода является важным фактором для максимизации объемной продуктивности ПГА. Во многих случаях

недостаточная ОТР ограничивает высокую производительность процессов ПГА[20; 48; 83].

В ряде исследований на протяжении 1970-х годов широко изучался синтез ПГА из глюкозы с использованием *Azotobacterbeijerinckii*. В то время как в N- или C-ограниченных культурах накапливалось мало ПГА, то при введении условий ограничения O<sub>2</sub> с DO ниже обнаруживаемых пределов наблюдалось значительное улучшение синтеза ПГА (до 50% от сухой биомассы клеток) [113].

В более поздних исследованиях приводятся следующие данные. При культивировании рекомбинантной *E. coli* на лактозе, постепенное снижение DO с 40 до 15% в течение фазы накопления привело к максимальному содержанию ПГА (81 %), концентрация ПГА составила 96,2 г/л и объемная продуктивность ПГА достигла 2,6 г/л/ч [8]. При выращивании *C. necator* на глюкозе в условиях 0-5 % DO содержание ПГА увеличилось до 45,3% по сравнению с неограниченными по O<sub>2</sub> условиями[38]. При росте бактерий *Halomonas campisalisha* на мальтозе в условиях 1-5 % DO во время фазы накопления было получено 56%-ое содержание ПГА, а концентрация и объемная продуктивность ПГА достигли 1,7 г/л и 0,04 г/л соответственно [74]. Культивирование *A. Vinelandii* на сахарозе при более низком DO (1 % в сравнении с 15 %) привело к тому, что процентное содержание, концентрация и экономический коэффициент ( $Y_{\text{ПГА/S}}$ ) ПГА увеличились с 45 до 80 %, с 1,7 до 3 г/л и с 0,04 до 0,32 г/л соответственно[87]. Приросте *C. necator* в колбах разного объема на глюкозе с добавлением глутамата наблюдалось увеличение содержания ПГА с 50 до 70 % при уменьшении объема заполнения колб с 300 мл до 200 мл [15].

Многочисленные исследования показали, что ограничение O<sub>2</sub> может быть подходящим стрессором для синтеза значительных количеств П(ЗГБ) из сахаров или глицерина.

Исследования накопления ПГА при культивировании бактерий в колбах, где DO часто не измеряется или не контролируется, проблематичны,

поскольку во многих случаях используются только два фактора, влияющие на аэрацию (объем заполнения колб или орбитальная скорость встряхивания), и оба наблюдения могут лежать в зоне оптимума. Кроме того, поскольку параметр ОТР редко регистрируется в колбочных культурах, полученные результаты трудно интерпретировать и их следует использовать с осторожностью. Несколько биореакторных исследований показали, что колбочные культуры (даже при относительно низких рабочих объемах) ведут себя так, будто они ограничены по  $O_2$ [40; 101], и этот факт может скрыть истинное влияние других параметров, часто оцениваемых в колбах, например, соотношение С/Н или С/Р.

## **1.11 Влияние различных факторов культивирования на молекулярно-массовые характеристики полигидроксиалканоатов**

В зависимости от молекулярных и композиционных характеристик ПГА (молекулярно-массовое распределение (ММР), распределение сополимерного состава (РСС)) возможно производство этих полимеров с различными желаемыми свойствами: можно получить ПГА с различной прочностью, вязкостью, текучестью, эластичностью[117]. Например, ПГА со средним молекулярным весом ( $M_v$ ) менее  $4 \times 10^5$  Да проявляют низкую механическую прочность. Дальнейшее снижение  $M_v$  приводит к появлению хрупких полимеров. С другой стороны, ПГА со значениями  $M_v$  более  $6 \times 10^5$  Да потенциально могут быть использованы в качестве термопластичных материалов [96].

Молекулярные характеристики ПГА зависят от нескольких факторов. В первую очередь на данный показатель оказывают влияние используемый бактериальный штамм и источник ассимилированного углерода, также имеются данные о влиянии концентрации и активности ПГА-синтаз и ПГА-гидролизующих ферментов (например, ПГА-деполимеразы, неспецифические

эстеразы и липазы). Эти факторы, в свою очередь, зависят от условий культивирования и применяемой стратегии ферментации.

Интересны данные в области исследования влияния активности ферментов метаболического пути на молекулярные характеристики синтезированных ПГА. Контролируемая экспрессия гена ПГА-синтазы из *C. necator* в рекомбинантной *E. coli* показала, что повышение активности ПГА-синтазы приводит к снижению среднечисловой молекулярной массы М<sub>ч</sub>продуцируемого ПГА [115]. Аналогичные наблюдения ранее были сделаны и для штаммов *Pseudomonas*, когда количество копий его генов ПГА-синтазы было увеличено [59]. Эти исследования доказали, что молекулярная масса полимера определяется активностью ПГА-синтазы [84]. В *C. acidovorans*, значительное увеличение активности ПГА-синтазы было достигнуто за счет увеличения числа копий ее гена, это привело к улучшению продукции П(4ГБ) из 4-гидроксимасляной кислоты [120]. Анализ молекулярной массы данного полимера, полученного от рекомбинантного штамма, не выявил каких-либо существенных отличий от такового, продуцируемого диким типом *C. acidovorans*. Также установлено, что молекулярная масса П(3ГБ), продуцируемого рекомбинантным *C. necator*, не зависит от уровня активности ПГА-синтазы [66]. Основываясь на этих противоречивых результатах, трудно сделать однозначный вывод о корреляции между активностью ПГА-синтазы и молекулярной массой синтезируемых полимеров *invivo*.

Некоторые исследователи акцентировали свое внимание на изучении влияния водородного показателя среды (рН) на молекулярно-массовое распределение полигидроксиалканоатов. В работе Wangetal. [130], экспериментально исследовано влияние различных рН-условий питательной среды на распределение состава сополимеров и молекулярную массу сополимеров поли(3-гидроксибутират-ко-3-гидроксипропионат)П(3ГБ-ко-3ГП) в культурах *Azohydromonas lata* в присутствии сахарозы и 3-гидроксипропионовой кислоты в качестве источников углерода. Было

показано, что  $M_v$  сополимеров изменялась от 2,8 до  $8,6 \times 10^5$  Да при изменении значения pH от 6 до 8 соответственно.

Результаты других исследований также подтверждают факт влияния pH питательной среды на  $M_q$  синтезируемых ПГА [10].

Существуют данные, доказывающие, что соотношение C/N в культуральной среде также оказывает влияние на молекулярно-массовое распределение ПГА. В колбочных культурах был проведен ряд экспериментов с целью изучения влияния массовых соотношений углерода к азоту (C/N). Показано, что при значении соотношения C/N, равного 20 среднечисловая и средневесовая молекулярные массы увеличиваются по отношению к контрольному значению отношения C/N, равному 6,6. Численные значения  $M_q$  и  $M_v$  в этом исследовании составили  $7,8 \times 10^4$  и  $1,17 \times 10^5$  Да для соотношения C/N 6,6 и  $1,085 \times 10^6$  и  $2,576 \times 10^6$  Да для соотношения C/N 20 соответственно [96].

Из приведенных выше результатов можно сделать вывод, что начальные концентрации источников углерода и азота, в значительной степени влияют на значение молекулярной массы ПГА.

Существенное влияние на молекулярно-массовые характеристики ПГА оказывает уровень растворенного кислорода в питательной среде.

Влияние концентрации растворенного кислорода (DO) на степень полимеризации полимерных цепей П(ЗГБ) у бактерий *Azohydromonas lata* было исследовано в серии экспериментов, проведенных в колбах при различных уровнях концентрации кислорода. Среднечисловая ( $M_q$ ) и средневесовая ( $M_v$ ) молекулярные массы П(ЗГБ) непрерывно уменьшались по мере увеличения концентрации DO с 5 до 30 %. Было показано, что при низком значении DO (т. е. в условиях, способствующих медленному накоплению биомассы) значения  $M_q$  и  $M_v$  были высокими ( $1,075 \times 10^6$  и  $2,035 \times 10^6$  Да соответственно). Однако при проведении культивирования при более высоких концентрациях кислорода, значения  $M_q$  и  $M_v$  снижались до  $3,35 \times 10^5$  и  $6,35 \times 10^5$  Да.

соответственно. Эти данные доказывают, что концентрация DO в культуре действительно влияет на механизм роста полимерной цепи.

В исследовании с участием бактерии *A. vinelandii* был проведен ряд экспериментов при различных OTR, которые были достигнуты путем увеличения рабочего объема колб со 100 до 200 мл в колбах общим объемом 500 мл с орбитальным встряхиванием 200 об. / мин. При увеличении рабочего объема средневязкая молекулярная масса ( $M_{cv}$ ) удвоилась. Также измерены средневесовые молекулярные массы ( $M_v$ ), которые оказались значительно выше, чем  $M_{cv}$  [95]. Ранее сообщалось о сходных результатах для ПГБ, синтезированного *A. chroococcum*, выращенного в колбах в различных условиях от аэробных (со встряхиванием) или микроаэрофильных (без встряхивания) до анаэробных ( $N_2$ -атмосфера). В этом исследовании  $M_v$  увеличилась с 1480 КДа при максимальной аэрации до 2215 КДа в анаэробных условиях [89].

Биореакторные исследования, в которых DO или OTR могут быть измерены и проконтролированы более точно, показали смешанные результаты. При увеличении DO от 1 до 15%,  $M_v$  ПГБ, полученного от *A. Vinelandii* значительно снижалась [87].

В более раннем биореакторном исследовании, в котором ПГБ синтезировал из свекловичной патоки с использованием *A. vinelandii*, наблюдалось лишь небольшое изменение среднечисловой, средневесовой молекулярных масс и полидисперсности при 5, 10 или 20 %-ном уровне DO [26].

## **1.12 Влияние условий культивирования на мономерный состав полигидроксиалканоатов**

Поскольку свойства полимеров в значительной степени зависят от состава мономеров, важно правильно выбирать мономерные композиции для

различных применений ПГА. Известно, что некоторые факторы влияют на мономерный состав ПГА.

В одном из исследований обнаружено, что *P. mendocina* 0806 накапливает гетерополимеры ПГА, включающие различные мономеры. Показано, что мономерный состав этих гетерополимеров зависит от молярного соотношения С:N в среде. Так, при изучении мономерного состава поли(3-гидроксиоктаноат-ко-3-гидроксидеканоата), полученного от бактерии *P. mendocina* 0806 при росте на октаноате (4 г/л) в качестве источника углерода и сульфате аммония в качестве источника азота зарегистрированы следующие данные (таблица 1).

При молярном соотношении С:N менее 20, доля 3-ГД достигала 79 %, однако, при увеличении молярного соотношения С:N до 200, доля 3-ГД снижалась до 5 %. При значениях С:N более 200, полученный ПГА представлял собой уже гомополимер поли(3-гидроксиоктаноат). При замене источника углерода на глюкозу (20 г/л) *P. mendocina* 0806 накапливалась полигидроксиалканоаты другого мономерного состава [53].

Таблица 1 – Влияние молярного соотношения С:N на мономерный состав ПГА, синтезируемых *P. mendocina* 0806 [53]

Источник углерода	Молярное соотношение С:N	Мономерный состав ПГА (%)			
		ГБ	ГО	ГД	ГДД
Октаноат	<20	-	20-21	80-79	-
	20-200	-	71-95	29-5	-
	>200	-	100	-	-
Глюкоза	<20	3-1	-	97-99	-
	20-200	-	12-11	84-89	4-0
	>200	-	11-12	78	12-10

Мономерный состав ПГА может варьировать не только в зависимости от условий культивирования. Наибольшее влияние на состав ПГА оказывает тип ключевого фермента метаболического пути синтеза ПГА – ПГА-сингазы, присутствующей в конкретном микроорганизме. Также, мономерный состав ПГА зависит от источника углерода. Например, некоторые бактерии могут включать 3-гидроксипропионовую кислоту, 4-гидроксимасляную кислоту или 5-гидроксивалериановую кислоту в полиэфир, когда в среде помимо основного источника углерода присутствуют подходящие прекурсоры [118].

В исследовании по изучению влияния параметров культивирования на включение 4-гидроксибутират (4-ГБ) показано, что мономерный состав полимера изменяется в зависимости от концентраций источника углерода (глицерин), азота (ацетат аммония) и концентрации прекурсора (1,4 – бутандиол) для синтеза 4-ГБ. Ацетат аммония оказывал большее влияние на увеличение накопления 4-ГБ по сравнению с глицерином и 1,4-бутандиолом. Увеличение доли 4-ГБ с 3 до 40 % в составе гетерополимера наблюдалось при увеличении концентрации ацетата аммония с 0 до 2,39 г / л[102].

В исследовании по изучению влияния параметров культивирования на включение 4-гидроксибутират (4-ГБ) показано, что концентрация биомассы клеток *C. necator*A-04 и содержание ПГА значительно уменьшились по мере увеличения концентрации 1,4-бутандиола (прекурсор для синтеза 4-ГБ). Это связано с токсичностью 1,4-бутандиола. Однако, молярная доля единиц 4-ГБ в сополимере увеличивалась с 0 до 94% с увеличением соотношения 1,4-бутандиола к общему источнику углерода (фруктоза) с 0 до 100 % соответственно. Наибольшая молярная доля 4-ГБ (94%) была получена при соотношении 1,4-бутандиола к общему источнику углерода (фруктоза) равном 100% и при соотношении С/Н 4[21].

Помимо оценки влияния соотношений С/Ни источников углерода в культуральной среде на состав ПГА рядом ученых проведены исследования по оценке влияния pH среды на мономерный состав ПГА. Для *D. acidovorans*, выращенных с использованием 10,0 г/л валерата натрия в качестве

единственного источника углерода, показано, что при увеличении рН среды с 5,0 до 7,5 молярная доля 3-гидроксивалерата (3-ГВ) в гетерополимере поли(3-ГБ-со-3-ГВ) уменьшается с 90 до 80 % [82].

На мономерный состав полимера также оказывает влияние тип углеродного предшественника для синтеза определенных мономеров. Для подтверждения данной гипотезы были проведены исследования по оценке влияния различных прекурсоров на включение 4-ГБ в гетерополимер поли(3-ГБ-со-4-ГБ) для *Cupriavidus sp.* USMAA1020. Показано, что наибольшее включение 4-ГБ 51 % (от общего состава П(3-ГБ-со-4-ГБ)) наблюдалось при использовании  $\gamma$ -бутиrolактона, наименьшее – при использовании 1,4-бутандиола (32 %), среднее значение получено при использовании 4-гидроксимасляной кислоты – 44 % [9].

Подводя итоги, необходимо отметить, что в настоящее время получено большое количество данных о влиянии условий культивирования на рост бактерий и синтез различных ПГА. Однако, эти данные значительно отличаются в зависимости от используемого штамма бактерий, что подтверждает необходимость проведения подобных исследований в отношении *C. necator*B-10646.

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

В данной работе был использован штамм водородокисляющих бактерий *C. necator* B-10646, он депонирован во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Штамм выделен из *Ralstonia eutropha* B-8562 в процессе длительной многоступенчатой селекции по эффективности синтеза многокомпонентных ПГА.

*C. necator* является грамотрицательной, палочковидной, факультативной хемолитоавтотрофной  $\beta$ -протеобактерией. Первоначально она описывалась как *Hydrogenomonaseutropha* [133], она была предметом частых таксономических реклассификаций: *Alcaligeneseutrophus*, *R. eutropha*, *Wautersiaeutropha* [106].

Как вездесущий обитатель почвы и пресной воды, *C. necator* хорошо приспособлен к постоянно меняющимся условиям. Метаболическая универсальность этого микроорганизма сделала его модельным в микробиологии в отношении водородной хемолитоавтотрофии и синтеза поли-3-гидроксибутират [106]. Хотя аэробное дыхание играет основную роль в метаболизме, *C. necator* может использовать нитрат и нитрит в качестве альтернативных акцепторов электронов в условиях аноксии [13]. При гетеротрофном росте разнообразные углеводы, липиды и органические кислоты служат источником углерода и энергии, тогда как в отсутствие органических соединений, смесь  $H_2$ ,  $CO_2$  и  $O_2$  позволяет *C. necator* расти автотрофно. В зависимости от ситуации в среде обитания, *C. necator* может легко переключаться между автотрофией и гетеротрофией [63]. Миксотрофный рост наблюдается, когда *C. necator* использует одновременно органические и неорганические субстраты в качестве углерода и источника энергии [45]. Цикл кальвина у *C. necator* активен даже во время роста на

фруктозе. С другой стороны, полный цикл трикарбоновых кислот также активен при автотрофном росте [112; 114].

## **2.2 Культивирование бактерий**

Бактерии выращивали в жидкой питательной среде – минеральной среде Шлегеля, включающей  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 9,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,025 г/л, а также различные концентрации источника азотного питания ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) – 0,5, 0,7, 1, 1,5 и 2 г/л в зависимости от условий эксперимента. Микроэлементы вводили из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор содержит:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0,288;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,030;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,08;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0,008;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,176;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,050;  $\text{NiCl}_2$  – 0,008 (г/л). В качестве основного источника углерода использовали фруктозу (ЕС) в начальной концентрации 20 г/л. Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 0,5 л при различных коэффициентах заполнения, в зависимости от условий эксперимента (0,3; 0,4; 0,5) в термостатируемом шейкере-инкубаторе «Incubator Shaker Innova® серии 44» («New Brunswick Scientific», США) при 30°C и 200 об/мин. Время культивирования составляло 48 ч.

## **2.3 Контроль параметров культивирования**

На протяжении культивирования периодически отбирали пробы для анализа.

Оптическую плотность культуры определяли на спектрофотометре UNICO-2100 (UNITED PRODUCTS & INSTRUMENTS, США) при  $\lambda=440$  нм (длина оптического пути 1 мм); для измерения оптической плотности к культуре бактерий добавляли дистиллированную водой в соотношении 1:5.

Концентрацию фруктозы определяли, используя резорциновый метод [2]. Для проведения анализа отбирали 2 мл культуральной жидкости,

центрифугировали (Centrifuge 5417 R, «Eppendorf», Германия). 0,5 мл супернатанта доводили дистиллированной водой до 25 мл. Далее, к 1 мл приготовленной пробы добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (50 мг резорцина разводили в 50 мл 95 %-ного этилового спирта) и 3 мл раствора соляная кислота:вода (5:1). Для приготовления контроля вместо разведения супернатанта использовали дистиллированную воду. Пробирки выдерживали на водяной бане 20 минут при  $t=80$  °C, охлаждали до комнатной температуры. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре UNICO-2100 при длине волн в 540 нм (длина оптического пути 5 мм). Концентрацию фруктозы определяли по калибровочному графику.

Для определения урожая биомассы использовали весовой метод. Для этого 25 мл бактериальной суспензии центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 5 мин при 6000 об/мин, после чего осадок промывали дистиллированной водой и вновь центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия). Данную процедуру повторяли дважды. Полученную биомассу переносили в предварительно доведенные до постоянного веса бюксы. Бюксы с биомассой размещали в сушильном шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) при 105 °C 24 ч. После этого бюксы охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах Adventurer, «OHAUS», США. Вес биомассы проб определяли как разницу между весом бюкса, содержащим биомассу, и его исходным весом.

Для определения общего азота отбирали 2 мл культуральной жидкости, центрифугировали (Centrifuge 5417 R, «Eppendorf», Германия). 1 мл супернатанта доводили дистиллированной водой до 50 мл. Далее, к 10 мл приготовленной пробы добавляли 1 каплю гидроксида калия (КОН) и 0,5 мл реактива Несслера. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре UNICO-2100 при длине волн в 400 нм (длина оптического пути 10 мм). Концентрацию азота определяли по калибровочному графику.

## **2.4 Определение процентного содержания и состава полимера методом газо-жидкостной хроматографии с МС-детектором**

Проводили метанолиз сухой биомассы: к навеске 3,9-4,5 мг сухой биомассы добавляли 0,85 мл метанола, 1 мл внутреннего стандарта, содержащего 0,5 мг бензойной кислоты и 1 мл хлороформа, и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Выдерживали на водяной бане под обратным холодильником 2 ч 40 мин. После процедуры добавляли 1 мл воды дистиллированной. Проводили хроматографию метиловых эфиров жирных кислот на хромато-масс-спектрометре с масс-детектором Agilent Technologies 7890A/5975C Agilent Technologies (США). Условия хроматографирования: газ-носитель – гелий, скорость 1,2 мл/мин. Капиллярная колонка DB-35MS, длина – 30 м, диаметр – 0.25 мм. Температура ввода пробы – 220 °C; начальная температура хроматографирования – 55 °C; подъем температуры до 310 °C со скоростью 10°C/мин, изотермальный режим – 5 мин; температура детектора – 150 °C; температура источника ионов - 230°C; электронный удар при 70 eV; определение фрагментов с атомными массами от 30 до 550 amu при 0,5 сек/скан. Идентификацию мономеров образующих ПГА, проводили по масс-спектрам и временам удерживания.

## **2.5 Определение молекулярных характеристик полимера**

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера определяли с использованием гельпроникающей хроматографии (Agilent Technologies 1260 Infinity, США), используя полистироловые стандарты (Fluka, Швейцария, Германия). Определяли среднечисловую ( $M_n$ ) и средневесовую ( $M_w$ ) молекулярные массы, полидисперсность ( $\bar{D}$ ).

## **2.6 Определение концентрации кислорода**

Концентрацию растворенного кислорода измеряли с помощью портативного влагозащищенного микропроцессорного оксиметра HI 9146 (Hanna Instruments, Италия) согласно прилагаемой инструкции. Результат получали в виде процентного насыщения культуральной жидкости кислородом воздуха.

## **2.7 Получение электронных изображений бактериальных клеток**

Образцы для просвечивающей электронной микроскопии готовили с погружением медной ПЭМ сетки с перфорированной углеродной пленкой в водную суспензию бактерий, с последующим просушиванием на воздухе. Электронно-микроскопические исследования проводились на просвечивающем электронном микроскопе HT-7700, Hitachi при ускоряющем напряжении 60 кВ.

## **2.8 Статистическая обработка результатов**

Полученные результаты были статистически обработаны согласно общепринятым методикам [3].

А также некоторые статистические расчеты проводили в программе STATISTICA TrialVer. 13.0, с использованием прикладных пакетов анализа данных [1, 4].

[изъято 24 страницы]

## **ВЫВОДЫ**

Настоящее исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. Исследовано совместное влияние различных концентраций хлорида аммония и коэффициента заполнения колб культурой бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 на накопление биомассы и полимера. Показано, что урожай биомассы и полимера напрямую зависит от концентрации  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и коэффициента заполнения. Наилучшие показатели биомассы и полимера достигаются при условиях 1 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и коэффициента заполнения 0,4 и составляют 5,7 г/л и 72 % соответственно.

2. Изучено совместное влияние концентраций хлорида аммония и коэффициента заполнения колб культурой бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 на молекулярно-массовое распределение полученных полигидроксиалканоатов. Установлено, что с повышением концентрации хлорида аммония и коэффициента заполнения происходит увеличение молекулярной массы полимера. Максимальные значения молекулярных масс достигнуты при 2 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и коэффициента заполнения 0,5.

3. Исследовано включение мономеров 3-гидроксивалерата при различных концентрациях хлорида аммония и коэффициентах заполнения. Показано, что достоверных отличий нет, за исключением культуры, выращенной при концентрации хлорида аммония 1 г/л и коэффициенте заполнения 0,5; при указанных условиях зарегистрировано максимальное содержание мономера 3-ГВ 27 %.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адлер, Ю. П. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий / Ю.П. Адлер, Е.В. Маркова, Ю.В. Грановский. – М.: Наука. – 1976. – 279 с.
2. Ермаков, А. И. Методы биохимического исследования растений /А. И. Ермаков, В. В.Арасимович, Н. П. Ярош. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.
3. Зайцев, Г.Н. Методика биометрических расчетов. Математическая статистика в экспериментальной ботанике / Г.Н. Зайцев. – М.: Наука. – 1973. – 293 с.
4. Федоров, В.В. Теория оптимального эксперимента / В.В. Федоров. – М.: Наука, 1971. – 312 с.
5. Abe,T., Kobayashi,T., Saito,T. Propertiesof a novel intracellular poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16 / T. Abe, T.Kobayashi, T.Saito //Journal of Bacteriology. – 2005. – Т. 187, №. 20. – С. 6982-6990.
6. Aeschelmann, F., Carus, M. Biobased building blocks and polymers in the world: capacities, production, and applications–status quo and trends towards 2020 / F.Aeschelmann, M.Carus//Industrial Biotechnology. – 2015. – Т. 11, №. 3. – С. 154-159.
7. Ahn, J. [et al.] Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates / J.Ahn[et al.] //Environmental Engineering Research. – 2015. – Т. 20, №. 3. – С. 246-253.
8. Ahn, W. S., Park, S. J., Lee, S. Y. Production of Poly (3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*with a highly concentrated whey solution / W. S.Ahn, S. J.Park, S. Y. Lee//Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Т. 66, №. 8. – С. 3624-3627.

9. Amirul, A. A. [et al.]. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA1020 isolated from Lake Kulim, Malaysia / A. A. Amirul [et al.] // Bioresource technology. – 2008. – T. 99, №. 11. – C. 4903-4909.

10. Anderson, A. J. [et al.] Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcusruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*/ A. J.Anderson [et al.]//FEMS microbiology reviews. – 1992. – T. 9, №. 2-4. – C. 93-101.

11. Anderson, A. J., Dawes, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates / A. J.Anderson, E. A. Dawes//Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 1990. – T. 54, №. 4. – C. 450-472.

12. Anjum, A. [et al.] Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements / A.Anjum[et al.] //International journal of biological macromolecules. – 2016. – T. 89. – C.161-174.

13. Aragno,M. The mesophilic hydrogen-oxidizing (*Knallgas*) bacteria / M.Aragno//The Prokaryotes, 2nd ed, A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. – 1992. – T. 1. – C. 344-384.

14. Beeby, M. [et al.] Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha* / M.Beeby[et al.] //Journal of bacteriology. – 2012. – T. 194, №. 5. – C. 1092-1099.

15. Berezina, N. Novel approach for productivity enhancement of polyhydroxyalkanoates (PHA) production by *Cupriavidus necator* DSM 545 / N. Berezina //New biotechnology. – 2013. – T. 30, №. 2. – C. 192-195.

16. Bleves, S. [et al.] Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons / Bleves, S. [et al.] //International Journal of Medical Microbiology. – 2010. – T. 300, №. 8. – C. 534-543.

17. Boopathy, R. Factors limiting bioremediation technologies / R.Boopathy//Bioresource technology. – 2000. – T. 74, №. 1. – C. 63-67.

18. Brandl, H. [et al.] *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters / H.Brandl[et al.] //Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – T. 54, №. 8. – C. 1977-1982.
19. Brigham, C. J. [et al.] Whole-genome microarray and gene deletion studies reveal regulation of the polyhydroxyalkanoate production cycle by the stringent response in *Ralstonia eutropha* H16 / C. J.Brigham [et al.]//Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – T. 78, №. 22. – C. 8033-8044.
20. Cerrone, F. [et al.] Fed-batch strategies using butyrate for high cell density cultivation of *Pseudomonas putida* and its use as a biocatalyst / F.Cerrone[et al.] //Applied microbiology and biotechnology. – 2014. – T. 98, №. 22. – C. 9217-9228.
21. Chanprateep, S. [et al]. Biosynthesis and biocompatibility of biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) / S. Chanprateep [et al] // Polymer degradation and stability. – 2010. – T. 95, №. 10. – C. 2003-2012.
22. Chee, J. Y. [et al.] Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics / J. Y.Chee [et al.] //Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. – 2010. – T. 2. – C. 1395-1404.
23. Chen, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry / G. Q.Chen //Chemical Society Reviews. – 2009. – T. 38, №. 8. – C. 2434-2446.
24. Chen, G. Q. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates / G. Q.Chen//Plastics from bacteria. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. – C. 17-37.
25. Chen, G. Q., Hajnal, I. The ‘PHAome’ / G. Q.Chen, I.Hajnal//Trends in biotechnology. – 2015. – T. 33, №. 10. – C. 559-564.
26. Chen, G. Q., Page, W. J. The effect of substrate on the molecular weight ofpoly- $\beta$ -hydroxybutyrate produced by*Azotobacter vinelandii* UWD / G. Q.Chen, W. J.Page //Biotechnology letters. – 1994. – T. 16, №. 2. – C. 155-160.

27. Chen, Y. J., Huang, Y. C., Lee, C. Y. Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas mosselii* TO7 / Y. J.Chen, Y. C.Huang, C. Y.Lee //Journal of bioscience and bioengineering. – 2014. – T. 118, №. 2. – C. 145-152.
28. Cho, M. [et al.] Purification of polyhydroxybutyrate synthase from its native organism, *Ralstonia eutropha*: implications for the initiation and elongation of polymer formation *in vivo* / M.Cho [et al.] //Biochemistry. – 2012. – T. 51, №. 11. – C. 2276-2288.
29. Choi, J., Lee, S. Y. Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation / J.Chi, S. Y.Lee //Bioprocess engineering. – 1997. – T. 17, №. 6. – C. 335-342.
30. Chung, A. L. [et al.] Production of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by  $\beta$ -oxidation and phaC operon deleted *Pseudomonas entomophila* harboring thioesterase gene / A. L.Chung [et al.]/Metabolic engineering. – 2013. – T. 17. – C. 23-29.
31. Ciesielski, S., Możejko, J., Przybyłek, G. The influence of nitrogen limitation on mcl-PHA synthesis by two newly isolated strains of *Pseudomonas sp.* / S.Ciesielski, J.Możejko, G.Przybyłek//Journal of industrial microbiology & biotechnology. – 2010. – T. 37, №. 5. – C. 511-520.
32. Ciesielski, S., Pokoj, T., Klimiuk, E. Cultivation-dependent and-independent characterization of microbial community producing polyhydroxyalkanoates from raw-glycerol / S.Ciesielski, T.Pokoj, E.Klimiuk //J MicrobiolBiotechnol. – 2010. – T. 20, №. 5. – C. 853-861.
33. Cui, Y. W., Shi, Y. P., Gong, X. Y. Effects of C/N in the substrate on the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis / Y. W.Cui, Y. P.Shi, X. Y.Gong //RSC advances. – 2017. – T. 7, №. 31. – C. 18953-18961.
34. Daneshi, A. [et al.] Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Cupriavidus necator* from corn syrup: statistical modeling and optimization of

biomass yield and volumetric productivity / Daneshi A. [et al.] //Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2010. – T. 85, №. 11. – C. 1528-1539.

35. Das, S. [et al.] Proof for a nonproteinaceous calcium-selective channel in *Escherichia coli* by total synthesis from (R)-3-hydroxybutanoic acid and inorganic polyphosphate / S.Das [et al.] //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – T. 94, №. 17. – C. 9075-9079.

36. Dietrich, K. [et al.] Producing PHAs in the bioeconomy – Towards a sustainable bioplastic / K.Dietrich [et al.]//Sustainable production and consumption. – 2017. – T. 9. – C. 58-70.

37. Doi, Y. [et al.] Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus* / Y.Doi[et al.]//FEMS microbiology reviews. – 1992. – T. 9, №. 2-4. – C. 103-108.

38. Du, G. C. [et al.] Effects of environmental conditions on cell growth and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in *Alcaligenes eutrophus* / G. C.Du [et al.] //World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2000. – T. 16, №. 1. – C. 9-13.

39. Elustondo, P., Zakharian, E., Pavlov, E. Identification of the polyhydroxybutyrate granules in mammalian cultured cells / P.Elustondo, E.Zakharian, E.Pavlov //Chemistry & biodiversity. – 2012. – T. 9, №. 11. – C. 2597-2604.

40. Faccin, D. J. L. [et al.] Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly (3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium* / D. J. L.Faccin[et al.]//Process Biochemistry. – 2013. – T. 48, №. 3. – C. 420-425.

41. Faccin, D. J. L. [et al.] Optimization of C:N ratio and minimal initial carbon source for poly (3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus megaterium* / D. J. L.Faccin[et al.]//Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2009. – T. 84, №. 12. – C. 1756-1761.

42. Faveau, C. [et al.] Synthetic studies on a phenyl-laulimalide analogue / C.Faveau[et al.] //Tetrahedron letters. – 2006. – T. 47, №. 47. – C. 8305-8308.

43. Fernández, D. [et al]. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions / D.Fernández[et al.]//Biochemical engineering journal. – 2005. – T. 26, №. 2-3. – C. 159-167.

44. Fiedler, S., Steinbüchel, A., Rehm, B. H. The role of the fatty acid  $\beta$ -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the fadBA operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes phaJ from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida* / S.Fiedler, A.Steinbüchel, B. H.Rehm //Archives of microbiology. – 2002. – T. 178, №. 2. – C. 149-160.

45. Friedrich, C. G., Friedrich, B., Bowien, B. Formation of enzymes of autotrophic metabolism during heterotrophic growth of *Alcaligenes eutrophus* / C. G.Friedrich, B.Friedrich, B.Bowien//Microbiology. – 1981. – T. 122, №. 1. – C. 69-78.

46. Fritzsche, K., Lenz, R. W., Fuller, R. C. An unusual bacterial polyester with a phenyl pendant group / K.Fritzsche, R. W.Lenz, R. C.Fuller//Die MakromolekulareChemie: Macromolecular Chemistry and Physics. – 1990. – T. 191, №. 8. – C. 1957-1965.

47. Galán, B. [et al.] Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442 / B.Galán[et al.]//Molecular microbiology. – 2011. – T. 79, №. 2. – C. 402-418.

48. Gao, J., Ramsay, J. A., Ramsay, B. A. Fed-batch production of poly-3-hydroxydecanoate from decanoic acid / J.Gao, J. A.Ramsay, B. A.Ramsay //Journal of biotechnology. – 2016. – T. 218. – C. 102-107.

49. Garcia-Ochoa, F., Gomez, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview / F.Garcia-Ochoa, E.Gomez //Biotechnology advances. – 2009. – T. 27, №. 2. – C. 153-176.

50. Gerngross, T. U. [et al.]Immunocytochemical analysis of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: localization of the

synthase enzyme at the surface of PHB granules / T. U.Gerngross[et al.] //Journal of bacteriology. – 1993. – Т. 175, №. 16. – С. 5289-5293.

51. Gupta, A., Rao, G. A study of oxygen transfer in shake flasks using a non-invasive oxygen sensor / A.Gupta, G.Rao //Biotechnology and bioengineering. – 2003. – Т. 84, №. 3. – С. 351-358.

52. Han, X. [et al.]Polyhydroxyalkanoate production by a novel bacterium *Massilia* sp. UMI-21 isolated from seaweed, and molecular cloning of its polyhydroxyalkanoate synthase gene / X.Han [et al.]//Journal of bioscience and bioengineering. – 2014. – Т. 118, №. 5. – С. 514-519.

53. Hang, K. [et al.] Effect of C:N molar ratio on monomer composition of polyhydroxyalkanoates produced by *Pseudomonas mendocina* 0806 and *Pseudomonas pseudoalkaligenus* YS1 / K. Hang [et al.] //Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. – 2000. – С. 971-980.

54. Haywood, G. W. [et al.] The role of NADH-and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus* / G. W.Haywood [et al.]//FEMS microbiology letters. – 1988. – Т. 52, №. 3. – С. 259-264.

55. Hein, S., Tran, H., Steinbüchel A. *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria / S.Hein, H.Tran, A.Steinbüchel //Archives of microbiology. – 1998. – Т. 170, №. 3. – С. 162-170.

56. Hermann-Krauss, C. [et al.]Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co-and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products / C.Hermann-Krauss [et al.]//Archaea. – 2013. – Т. 2013.

57. Hokamura, A. Characterization and identification of the proteins bound to two types of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas* sp. 61-3. / A. Hokamura // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2015. – Т.79, №8. – С. 1369–1377.

58. Horng, Y. T. [et al.] Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production via the coexpressed phaCAB and vgb genes controlled by arabinose PBAD

promoter in *Escherichia coli* / Y. T.Horng[et al.]//Letters in applied microbiology. – 2010. – Т. 50, №. 2. – С. 158-167.

59. Huisman, G. W. [et al.] Synthesis of poly (3-hydroxyalkanoates) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains / G. W.Huisman [et al.] //Applied microbiology and biotechnology. – 1992. – Т. 38, №. 1. – С. 1-5.

60. Ienczak, J. L., Schmidell, W., de Aragão, G. M. F. High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review / J. L.Ienczak, W.Schmidell, G. M. F.de Aragão//Journal of industrial microbiology & biotechnology. – 2013. – Т. 40, №. 3-4. – С. 275-286.

61. Jendrossek, D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes) / D. Jendrossek //Journal of bacteriology. – 2009. – Т. 191, №. 10. – С. 3195-3202.

62. Jendrossek, D., Pfeiffer, D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly (3-hydroxybutyrate) / D.Jendrossek, D.Pfeiffer //Environmental microbiology. – 2014. – Т. 16, №. 8. – С. 2357-2373.

63. Kärst, U. W. E., Friedrich, C. G. Mixotrophic capabilities of *Alcaligenes eutrophus* / U. W. E.Kärst, C. G.Friedrich //Microbiology. – 1984. – Т. 130, №. 8. – С. 1987-1994.

64. Kessler, B. Witholt B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism / B. Kessler //Journal of biotechnology. – 2001. – Т. 86, №. 2. – С. 97-104.

65. Khanna, S., Srivastava, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S.Khanna, A. K.Srivastava //Process biochemistry. – 2005. – Т. 40, №. 2. – С. 607-619.

66. Kichise, T. [et al.] Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis / T.Kichise[et al.]//International journal of biological macromolecules. – 1999. – Т. 25, №. 1-3. – С. 69-77.

67. Kim, B. S. [et al.] Production of poly (3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer / B. S.Kim [et al.]//Enzyme and Microbial Technology. – 1994. – T. 16, №. 7. – C. 556-561.
68. Kim, E. J., Kim, K. J. Crystal structure and biochemical characterization of PhaA from *Ralstonia eutropha*, a polyhydroxyalkanoate-producing bacterium / E. J.Kim, K. J. Kim //Biochemical and biophysical research communications. – 2014. – T. 452, №. 1. – C. 124-129.
69. Kim, J. [et al.] Crystal structure of (R)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase PhaB from *Ralstonia eutropha* / J.Kim [et al.] //Biochemical and biophysical research communications. – 2014. – T. 443, №. 3. – C. 783-788.
70. Kim, J. [et al.] Crystal structure of *Ralstonia eutrophapholyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms* / J.Kim [et al.] //Biotechnology journal. – 2017. – T. 12, №. 1. – C. 1600648.
71. Kim, S. [et al.] Redox-switch regulatory mechanism of thiolase from *Clostridium acetobutylicum* / S.Kim [et al.] //Nature communications. – 2015. – T. 6. – C. 8410.
72. Koller, M. [et al.] Biotechnological production of poly (3-hydroxybutyrate) with *Wautersia eutropha* by application of green grass juice and silage juice as additional complex substrates / M.Koller[et al.]//Biocatalysis and Biotransformation. – 2005. – T. 23, №. 5. – C. 329-337.
73. Krishnan, S., Chinnadurai, G. S., Perumal, P. Polyhydroxybutyrate by *Streptomyces sp.*: Production and characterization / S.Krishnan, G. S.Chinnadurai, P.Perumal //International journal of biological macromolecules. – 2017. – T. 104. – C. 1165-1171.
74. Kshirsagar, P. R. [et al.] Scale up production of polyhydroxyalkanoate (PHA) at different aeration, agitation and controlled dissolved oxygen levels in fermenter using *Halomonas campialis* MCM B-1027 / P. R.Kshirsagar[et al.] //Journal of Biochemical Technology. – 2013. – T. 4, №. 1. – C. 512-517.

75. Kulpreecha, S. [et al.] Inexpensive fed-batch cultivation for high poly (3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium* / S.Kulpreecha[et al.] //Journal of bioscience and bioengineering. – 2009. – T. 107, №. 3. – C. 240-245.
76. Lee, G. N., Na, J. Future of microbial polyesters / G. N.Lee, J.Na//Microbial cell factories. – 2013. – T. 12, №. 1. – C. 54.
77. Lee, I. Y. [et al.] Regulation of poly-β-hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus* / I. Y.Lee [et al.]///FEMS Microbiology letters. – 1995. – T. 131, №. 1. – C. 35-39.
78. Lee, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates / S. Y.Lee //Biotechnology and bioengineering. – 1996. – T. 49, №. 1. – C. 1-14.
79. Lemoigne, M. Produits de deshydrationet de polymerisation de l'acideβ=oxybutyrique / M.Lemoigne //Bull. Soc. Chim. Biol. – 1926. – T. 8. – C. 770-782.
80. Li R. [et al.]Psychrotrophic *Pseudomonas mandelii* CBS-1 produces high levels of poly-β-hydroxybutyrate / R.Li[et al.] //Springerplus. – 2013. – T. 2, №. 1. – C. 1-7.
81. Liu, S. J., Steinbüchel, A. A novel genetically engineered pathway for synthesis of poly (hydroxyalkanoic acids) in *Escherichia coli* / S. J.Liu, A.Steinbüchel //Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – T. 66, №. 2. – C. 739-743.
82. Loo, C. Y., Sudesh, K. Biosynthesis and native granule characteristics of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans* / C. Y. Loo, K. Sudesh // International journal of biological macromolecules. – 2007. – T. 40, №. 5. – C. 466-471.
83. Maclean, H. [et al.] Decaying exponential feeding of nonanoic acid for the production of medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* KT2440 / H.Maclean [et al.]///Canadian Journal of Chemistry. – 2008. – T. 86, №. 6. – C. 564-569.

84. Madison, L. L., Huisman, G. W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic / L. L.Madison, G. W.Huisman //Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1999. – T. 63, №. 1. – C. 21-53.
85. Mahishi, L. H., Tripathi, G., Rawal, S. K. Poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources / L. H.Mahishi, G.Tripathi, S. K. Rawal //Microbiological research. – 2003. – T. 158, №. 1. – C. 19-27.
86. Mendonça, T. T. [et al.] Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates / T. T.Mendonça[et al.]//Journal of applied microbiology. – 2014. – T. 116, №. 4. – C. 815-829.
87. Millán, M. [et al.] Molecular mass of poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) produced by *Azotobacter vinelandii* is determined by the ratio of synthesis and degradation under fixed dissolved oxygen tension / M.Millán[et al.] //Process Biochemistry. – 2016. – T. 51, №. 8. – C. 950-958.
88. Możejko-Ciesielska, J., Kiewisz, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? / J.Możejko-Ciesielska, R.Kiewisz //Microbiological research. – 2016. – T. 192. – C. 271-282.
89. Myshkina, V. L. [et al.] Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B / V. L.Myshkina[et al.]//Applied biochemistry and microbiology. – 2008. – T. 44, №. 5. – C. 482-486.
90. Ng, L. M., Sudesh, K. Identification of a new polyhydroxyalkanoate (PHA) producer *Aquitalea sp.* USM4 (JCM 19919) and characterization of its PHA synthase / L. M.Ng, K.Sudesh//Journal of bioscience and bioengineering. – 2016. – T. 122, №. 5. – C. 550-557.
91. Obeso, J. I. [et al.] The phasin PhaF controls bacterial shape and size in a network-forming strain of *Pseudomonas putida* / J. I.Obeso[et al.]//Journal of biotechnology. – 2015. – T. 199. – C. 17-20.

92. Ocampo-López, C., Colorado-Arias, S., Ramírez-Carmona, M.

Modeling of microbial growth and ammonia consumption at different temperatures in the production of a polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymer / C. Ocampo-López, S. Colorado-Arias, M.Ramírez-Carmona//Journal of applied research and technology. – 2015. – T. 13, №. 5. – C. 498-503.

93. Oeding, V., Schlegel H. G.  $\beta$ -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism / V., H. G.Schlegel //Biochemical Journal. – 1973. – T. 134, №. 1. – C. 239-248.

94. Pan, W. [et al.] Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosichydrolysate / W.Pan [et al.] //Journal of industrial microbiology & biotechnology. – 2012. – T. 39, №. 3. – C. 459-469.

95. Peña, C. [et al.] Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN) / C.Peña [et al.] //Annals of microbiology. – 2014. – T. 64, №. 1. – C. 39-47.

96. Penloglou, G. [et al.] On the control of molecular weight distribution of polyhydroxybutyrate in *Azohydromonas lata* cultures / G.Penloglou[et al.]//Biochemical engineering journal. – 2012. – T. 62. – C. 39-47.

97. Peplinski, K. [et al.] Genome-wide transcriptome analyses of the ‘Knallgas’ bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism / K.Peplinski[et al.]//Microbiology. – 2010. – T. 156, №. 7. – C. 2136-2152.

98. Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications /S.Philip, T.Keshavarz, I. Roy //Journal of chemical technology & biotechnology: International research in process, Environmental & clean technology. – 2007. – T. 82, №. 3. – C. 233-247.

99. Pratt, S. [et al.] Development of a novel titration and off-gas analysis (TOGA) sensor for study of biological processes in wastewater treatment systems /

S.Pratt [et al.]//Biotechnology and bioengineering. – 2003. – T. 81, №. 4. – C. 482-495.

100. Qi, Q., Rehm, B. H. A. Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase / Q.Qi, B. H.Rehm//Microbiology. – 2001. – T. 147, №. 12. – C. 3353-3358.

101. Quillaguaman, J. [et al.] Poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate / J.Quillaguaman[et al.] //Journal of applied microbiology. – 2005. – T. 99, №. 1. – C. 151-157.

102. Ramachandran, H., Amirul, A. A. Bioconversion of glycerine pitch into a novel yellow-pigmented P (3HB-co-4HB) copolymer: synergistic effect of ammonium acetate and polymer characteristics / H. Ramachandran, A. A. Amirul // Applied biochemistry and biotechnology. – 2014. – T. 172, №. 2. – C. 891-909.

103. Reddy, C. S. K. [et al.]Polyhydroxyalkanoates: an overview / C. S. K. Reddy [et al.]//Bioresource technology. – 2003. – T. 87, №. 2. – C. 137-146.

104. Rehm, B. H. A., Mitsky, T. A., Steinbüchel, A. Role of fatty acid *de novo* biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by *pseudomonads*: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for pha biosynthesis in *Escherichia coli* /B. H. A. Rehm, T. A. Mitsky, A. Steinbüchel //Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – T. 67, №. 7. – C. 3102-3109.

105. Rehm, B. H. A., Steinbüchel, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis / B. H. A.Rehm, A.Steinbüchel //International journal of biological macromolecules. – 1999. – T. 25, №. 1-3. – C. 3-19.

106. Reinecke, F., Steinbüchel, A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers / F.Reinecke, A.Steinbüchel//Journal of molecular microbiology and biotechnology. – 2009. – T. 16, №. 1-2. – C. 91-108.

107. Ren, L. H., Liu, H., Wang, P. Synthesis of Polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator* /L. H.Ren, H.Liu, P.Wang //Applied Mechanics and Materials. – Trans Tech Publications Ltd, 2015. – T. 768. – C. 124-131.

108. Reusch, R. N. Polyphosphate/poly-((R)-3-hydroxybutyrate) ion channels in cell membranes / R. N. Reusch //Inorganic Polyphosphates. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1999. – C. 151-182.

109. Ruth, K. [et al.] Efficient production of (R)-3-hydroxycarboxylic acids by biotechnological conversion of polyhydroxyalkanoates and their purification / K.Ruth [et al.] //Biomacromolecules. – 2007. – T. 8, №. 1. – C. 279-286.

110. Sabirova, J. S. [et al.] Mutation in a “tesB-like” hydroxyacyl-coenzyme A-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2 / J. S.Sabirova[et al.] //Journal of bacteriology. – 2006. – T. 188, №. 24. – C. 8452-8459.

111. Saito, T., Takizawa, K., Saegusa, H. Intracellular poly (3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Alcaligenes eutrophus* / T.Saito, K.Takizawa, H.Saegusa //Canadian journal of microbiology. – 1995. – T. 41, №. 13. – C. 187-191.

112. Schwartz, E. [et al.] A proteomic view of the facultatively chemolithoautotrophic lifestyle of *Ralstonia eutropha* H16 / E.Schwartz [et al.] //Proteomics. – 2009. – T. 9, №. 22. – C. 5132-5142.

113. Senior, P. J. [et al.] The role of oxygen limitation in the formation of poly-β-hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii* / P. J.Senior [et al.]//Biochemical Journal. – 1972. – T. 128, №. 5. – C. 1193-1201.

114. Shimizu, R. [et al.] Detection of phase-dependent transcriptomic changes and Rubisco-mediated CO<sub>2</sub> fixation into poly (3-hydroxybutyrate) under heterotrophic condition in *Ralstonia eutropha* H16 based on RNA-seq and gene deletion analyses / R.Shimizu [et al.]//BMC microbiology. – 2013. – T. 13, №. 1. – C. 169.

115. Sim, S. J. [et al.] PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate *in vivo*/ S. J.Sim [et al.] //Nature biotechnology. – 1997. – T. 15, №. 1. – C. 63-67.
116. Singh, M., Patel, S. K. S., Kalia, V. C. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates / M.Singh, S. K. S.Patel, V. C.Kalia//Microbial cell factories. – 2009. – T. 8, №. 1. – C. 38.
117. Špitalský, Z., Bleha, T. Elastic properties of poly (hydroxybutyrate) molecules / Z.Špitalský, T.Bleha //Macromolecular bioscience. – 2004. – T. 4, №. 6. – C. 601-609.
118. Steinbüchel, A. [et al.] Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions / A.Steinbüchel[et al.]//Canadian journal of microbiology. – 1995. – T. 41, №. 13. – C. 94-105.
119. Stubbe, J. A. [et al.]Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm / J. A.Stubbe[et al.] //Annu. Rev. Biochem. – 2005. – T. 74. – C. 433-480.
120. Sudesh, K. [et al.] Improved production of poly (4-hydroxybutyrate) by *Comamonas acidovorans* and its freeze-fracture morphology / K.Sudesh[et al.] //International journal of biological macromolecules. – 1999. – T. 25, №. 1-3. – C. 79-85.
121. Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K.Sudesh, H.Abe, Y.Doi //Progress in polymer science. – 2000. – T. 25, №. 10. – C. 1503-1555.
122. Sun, Z. [et al.] Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440 / Z.Sun [et al.]//Applied microbiology and biotechnology. – 2007. – T. 74, №. 1. – C. 69-77.
123. Tian, J. [et al.] Analysis of transient polyhydroxybutyrate production in *Wautersia eutropha* H16 by quantitative Western analysis and transmission electron microscopy / J.Tian[et al.] //Journal of bacteriology. – 2005. – T. 187, №. 11. – C. 3825-3832.

124. Tolosa, L. [et al.] Noninvasive measurement of dissolved oxygen in shake flasks / L. Tolosa [et al.]/Biotechnology and Bioengineering. – 2002. – T. 80, №. 5. – C. 594-597.
125. Umeda, F. [et al.] Cloning and sequence analysis of the poly (3-hydroxyalkanoic acid)-synthesis genes of *Pseudomonas acidophila* / F.Umeda[et al.]/Applied biochemistry and biotechnology. – 1998. – T. 70, №. 1. – C. 341-352.
126. Vandamme, P., Coenye, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found / P.Vandamme, T.Coenye //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2004. – T. 54, №. 6. – C. 2285-2289.
127. Wang, J. G., Bakken, L. R. Screening of soil bacteria for poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation / J. G.Wang, L. R.Bakken//Microbial ecology. – 1998. – T. 35, №. 1. – C. 94-101.
128. Wang, J., Yu, J. Kinetic analysis on formation of poly (3-hydroxybutyrate) from acetic acid by *Ralstonia eutropha* under chemically defined conditions / J.Wang, J.Yu //Journal of industrial Microbiology and Biotechnology. – 2001. – T. 26, №. 3. – C. 121-126.
129. Wang, Q. [et al.] Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application / Q.Wang [et al.] //Microbial cell factories. – 2009. – T. 8, №. 1. – C. 47.
130. Wang, Y. [et al.]Comonomer composition distribution of P (3HB-co-3HP) s produced by *Alcaligenes latus* at several pH conditions / Wang Y. [et al.] //Macromolecular Chemistry and Physics. – 1999. – T. 200, №. 5. – C. 1047-1053.
131. Wang, Y. J. [et al.] Synthesis of PHAs from waster under various C: N ratios / Y. J.Wang [et al.] //Bioresource technology. – 2007. – T. 98, №. 8. – C. 1690-1693.
132. Wang, Y., Chen, G. Q. Polyhydroxyalkanoates: sustainability, production, and industrialization / Y.Wang, G. Q.Chen //Sustainable polymers from biomass. Wiley VCH, Weinheim, Germany. – 2017. – T. 14.

133. Wilde, E. Untersuchungen über wachstum und speicherstoffsynthese von *hydrogenomonas* / E.Wilde //ArchivfürMikrobiologie. – 1962. – T. 43, №. 2. – C. 109-137.
134. Yamane, T. Yield of poly-D (-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study /T.Yamane //Biotechnology and bioengineering. – 1993. – T. 41, №. 1. – C. 165-170.
135. Yang, Y. H. [et al.] Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha* / Y. H.Yang [et al.]//Applied microbiology and biotechnology. – 2010. – T. 87, №. 6. – C. 2037-2045.
136. Yao, J. [et al.] Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas nitroreducens* / J.Yao [et al.]//Antonie van Leeuwenhoek. – 1999. – T. 75, №. 4. – C. 345-349.
137. Yezza, A. [et al.] Production of polyhydroxyalkanoates from methanol by a new methylotrophic bacterium *Methylobacterium sp.GW2* / A.Yezza[et al.]//Applied microbiology and biotechnology. – 2006. – T. 73, №. 1. – C. 211-218.
138. Zinn, M., Witholt, B., Egli, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate / M.Zinn, B.Witholt, T. Egli //Advanced drug delivery reviews. – 2001. – T. 53, №. 1. – C. 5-21.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой  
*М. Волков* Т. Г. Волова  
«8» июль 2020 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

### ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РОСТ БАКТЕРИИ *CUPRIAVIDUS NECATOR* B-10646 И СИНТЕЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ

Направление подготовки 06.04.01 – Биология  
Магистерская программа 06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный  
руководитель

*Жила*  
подпись, дата

Доцент,  
Канд. биол. наук,  
Н.О. Жила

Магистрант

*Сапожникова*  
подпись, дата

К.Ю. Сапожникова

Рецензент

*М.Ю. Кручева*  
подпись, дата

М.Ю. Кручева

Красноярск 2020