

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой
_____ Т.Г. Волова
Подпись, инициалы фамилия
« ____ » __ июня ____ 2023г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Биотехнологический синтез серосодержащих полигидроксиалканоатов
бактериями *Cupriavidus necator B-10646* и их свойства

Научный руководитель _____
Подпись, дата

к.б.н., доцент
должность, ученая степень

Н. О. Жила
инициалы, фамилия

Выпускник _____
Подпись, дата

А. В. Березовская
инициалы, фамилия

Красноярск 2023

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Биотехнологический синтез серосодержащих полигидроксиалканоатов бактериями *Cupriavidus necator B-10646* и их свойства» содержит 50 страниц текстового документа, 9 иллюстраций, 1 таблицу и 53 использованных источников.

Ключевые слова: БИОСИНТЕЗ, СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, СОДЕРЖАНИЕ МОНОМЕРОВ 3-МЕРКАПТОПРОПИОНАТА, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Цель: изучить условия синтеза серосодержащих сополимеров в культуре природного штамма *Cupriavidus necator B-10646* с использованием прекурсоров и выявить связь между составом и физико-химическими свойствами.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние различных концентраций прекурсоров на рост *Cupriavidus necator B-10646* и синтез политиоэфиров;
2. Изучить влияние дробного внесения прекурсоров в ферментационную среду на рост бактериальной культуры *Cupriavidus necator B-10646* и синтез политиоэфира;
3. Изучить физико-химические свойства синтезированного П(ЗГБ-со-ЗМП).

Актуальность: изучение способности бактерий к синтезу серосодержащих сополимеров с использованием различных предшественников, как одно из перспективных направлений в современном мире – получение более экологичных материалов.

Основные выводы и результаты исследования:

1. Варьируя концентрацию и количество доз предшественника, вносимого в бактериальную культуру, удалось найти условия, обеспечивающие образование мономеров 3-меркаптопропионата (ЗМП) из предшественника и включение их в С-цепь, поли(3-гидроксibuтирата).
2. Получен набор сополимеров с различным содержанием 3-гидроксibuтиратных мономеров (от 60,01 мол. % до 97,96 мол. %) и включений 3 меркаптопропионатных мономеров (от 2, 04 мол. % до 39,0 мол. %).
3. Проведены анализы, позволившие выявить зависимость между составом, поли(3-гидроксibuтирата-со-3-меркаптопропионата) и их физико-химическими свойствами.
4. Показано, что новые типы мономеров (ЗМП) в составе ПГА влияют на молекулярную массу, температурные характеристики и степень кристалличности синтезируемых сополимеров.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
СОДЕРЖАНИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Синтетические полимеры	8
1.2 Биоразрушаемые полимеры - общая характеристика.....	9
1.3 Полигидроксиалканоаты, их свойства и применение.....	11
1.4. Сополимерные ПГА	12
1.5 Серосодержащие полимеры	13
1.5.1. Химические и физические свойства ПТЭ.....	14
1.5.2. Микроорганизмы-продуценты политиоэфиров	14
1.5.3. Биосинтез политиоэфиров.....	17
1.6 Дegrадация ПТЭ	19
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	21
2.1 Бактериальный штамм и получение инокулята	21
2.2 Культивирование бактерий	21
2.3 Регистрация параметров культивирования.....	22
2.3.1 Определение оптической плотности	22
2.3.2 Определение концентрации субстрата.....	23
2.3.3 Определение бактериальной биомассы	23
2.4 Определение содержания и состава полимера	24
2.5 Исследование физико-химических свойств полимера	24
2.5.1 Определение молекулярной массы ПГА	24
2.5.2 Степень кристалличности	25
2.5.4 Определение температурных характеристик полимера.....	25
2.6 Статистическая обработка результатов.....	25
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	26

3.1. Изучение 3-меркаптопропионовой кислоты как прекурсора для синтеза серосодержащих сополимеров в культуре <i>Cupriavidus necator B-10646</i>	26
3.2. Изучение 3,3'-дитиодипропионовой кислоты как прекурсора для синтеза серосодержащих сополимеров в культуре <i>Cupriavidus necator B-10646</i>	31
3.3. Изучение 3,3'- тиодипропионовой кислоты как прекурсора для синтеза серосодержащих сополимеров в культуре <i>Cupriavidus necator B-10646</i>	33
3.4. Исследование физико-химических свойств полимера	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	41
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	42
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	43

ВВЕДЕНИЕ

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются внутриклеточными запасными полимерами, которые накапливаются большим количеством бактерий при дефиците азота, фосфора на фоне высокого содержания углеродного субстрата. Биodeградируемые ПГА являются альтернативными претендентами на замену пластикам, которые получены из нефти, и накопление их в биосфере представляет собой глобальную экологическую проблему [1–6]. Поэтому переход на новые биоразлагаемые материалы, которые разрушаются в среде до углекислого газа и воды и не наносят вреда биосфере, является актуальным направлением в биотехнологии.

ПГА являются группой биополимеров разнообразного химического состава, которые синтезируются прокариотами на различных источниках углерода. Физико-химические свойства ПГА, такие как: молекулярная масса, температурные характеристики, степень кристалличности, скорость разложения в биологических средах и др. и возможность переработки в специализированные изделия варьируются из-за строения мономерных звеньев ПГА [54].

Первым идентифицированным полимером из класса ПГА и наиболее полно охарактеризованным и коммерчески производимым является поли(3-гидроксибутират) П(ЗГБ), который представляет собой высококристаллический полиэфир. Сополимер 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом П(ЗГБ-со-3ГВ) стал вторым наиболее активно изучаемым представителем семейства ПГА после П(ЗГБ). Встраивание 3-гидроксивалерата в углеродную цепь ЗГБ оказывает значительное влияние на скорость кристаллизации материала, а с увеличением его содержания материал становится менее кристаллическим и более эластичным [7]. Сополимеры 3-гидроксибутирата и 4-гидроксибутирата П(ЗГБ-со-4ГБ) - это эластомеры и их удлинение при разрыве может составлять 1000%. Данный показатель почти в 100 раз больше, чем у гомополимера П(ЗГБ). При включении мономеров 4ГБ в сополимер более 50 мол.%, что

является высоким показателем, наблюдается только один тип кристаллической решетки и мономеры 4ГБ не входят в решетку 3ГБ [8].

В зависимости от длины углеродной цепи мономеры в ПГА можно разделить на:

1. короткоцепочечные (SCL): состоят из кислот с длиной углеродной цепи от 3 до 5 атомов углерода;
2. полимеры со средней длиной цепи (MCL): состоят от 6 до 14 атомов углерода;
3. длинноцепочечные (LCL), содержащие мономеры с длиной углеродной цепи от 17 и выше [9].

Набор изученных и известных ПГА со временем расширяется. Olivera et al. в 2010 г. предложили разделить ПГА на две категории в соответствии с частотой возникновения: «обычные» и «необычные» [10].

Потенциальная способность создания биополимеров разнообразного строения, в состав которых входят мономеры с различной длиной углеродной цепи, является особо важным свойством ПГА, поскольку основные свойства, особенно кристалличность, изменяется в довольно широком диапазоне в зависимости от соотношения мономеров [7-15]. Многообразие возможных путей синтеза ПГА [1] в различных микроорганизмах с использованием широкого спектра источников углерода - реальная основа для синтеза обширного спектра биополимеров различного химического состава.

Недавно группа ученых обнаружила новый класс биополимеров. Культивирование граммотрицательной бактерии *Ralstonia eutropha* проводили с добавлением 3-меркаптоалкановой кислоты или 3,3'-тиодипропионовой кислоты, в результате чего получили сополимеры, которые состояли из 3-меркаптопропионата(3МП) и 3ГБ. До сих пор 3-меркаптопропиононовая кислота [16] и 3-меркаптомасляная кислота [17] были описаны как составляющие новых ПТЭ.

Политиоэфир(ПТЭ) - класс ПГА, который содержит атомы серы в С-цепи. Они относятся к «необычным» и малоизученным типам ПГА. Микробные

ПТЭ являются материалами с особенными свойствами, например для них характерны сложные процессы кристаллизации по сравнению с большинством известных типов ПГА. Температура плавления П(ЗМП) стремится к температуре плавления П(ЗГБ), но поли(3-меркаптопропионат) проявляет большую термическую стабильность. Ко всему выше сказанному было получено, что сополимеры этого типа обладают антибактериальными свойствами [18,19]. Высокая термическая стабильность П(ЗМП) по сравнению с другими известными мономерами сочетается с особенным для семейства ПГА свойством – отсутствием биоразлагаемости. С одной стороны, эта особенность ПТЭ уменьшает область их применения как подающий надежды биоразлагаемый полимерный материал по сравнению с большинством известных ПГА, но, с другой стороны, раскрывает новые перспективы, такие как: применение в строительстве, автомобильной сборке и фотоэлектрических элементах. Кроме того, обсуждается возможность использования этих видов ПГА в качестве биосовместимого антибактериального материала в регенеративной медицине, когда биосовместимые эндопротезы должны функционировать в организме длительное время [20,21].

Целью работы было изучение условий синтеза серосодержащих полигидроксиалканоатов в культуре природного штамма *Cupriavidus necator* В-10646 и выявление взаимосвязи между составом и физико-химическими свойствами синтезируемых полимеров.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние различных концентраций прекурсоров на рост *Cupriavidus necator* В-10646 и синтез политиоэфиров;
2. Изучить влияние дробного внесения прекурсоров в питательную среду на рост бактериальной культуры *Cupriavidus necator* В-10646 и синтез политиоэфиров;
3. Изучить физико-химические свойства синтезированных сополимеров П(ЗГБ-со-ЗМП).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Синтетические полимеры

Полимерные материалы являются универсальными и незаменимыми элементами в быту человека. Понятие «полимерные материалы» является общим. Оно включает в себя 3 довольно больших группы: полимеры, пластмассы и их морфологическую разновидность – полимерные композиционные материалы (ПКМ). Общим для всех вышеперечисленных групп является то, что их обязательной частью является полимерная составляющая (органическое высокомолекулярное вещество, полученное в результате химической реакции между мономерами), которая и определяет физические свойства материала.

Термин «полимер» происходит от греческих слов «поли» - много и «мерос» - часть. Полимерами называют высокомолекулярные вещества или гомополимеры с включенными в них добавками(прекурсорами), например, стабилизаторами, ингибиторами и т.д. Физически полимеры являются однородными (гомофазными) материалами, которые сохраняют все характерные для гомополимеров физико-химические свойства. [23]

Синтетические полимеры получают в результате химических реакций полимеризации или, в случае биополимеров, синтез осуществляется ферментами или живыми клетками. [24] Синтетические полимеры включают всего 7 коммерческих материалов: полиэтилен (ПЭ), полипропилен (ПП), поливинилхлорид, полиэтилентерефталат (ПЭТФ), полистирол, поликарбонат и поли(метилметакрилат). Эти наиболее широко используемые полимеры также обозначаются как пластмассы. Благодаря дешевизне, простоте изготовления и их свойствам синтетические пластики используются во многих различных продуктах.

Синтетические полимеры начали приобретать популярность в середине 1940-х годов, заменяя такие материалы, как стекло, дерево и даже металл, и тем

самым стали играть важнейшую роль в промышленности, экономике и окружающей среде [22]. Популярность пластмасс обусловлена их физико-химическими свойствами: стабильностью и прочностью. Однако, с другой стороны, пластмассы используются в качестве «короткоживущего» материала для упаковки, тары, бытовых и гигиенических изделий [23]. Минусом является медленная деградация пластмасс в окружающей среде и именно из-за этого увеличивается количество отходов в биосфере. С 2000 по 2019 год мировое производство пластмасс увеличилось с 234 млн т. до 460 млн т. При этом объем пластиковых отходов вырос с 156 млн т. до 353 млн т. В 2019 году из них всего лишь 9% было переработано, а 50% отправлено на свалки, 19% сожжено и 22% утилизировано на неконтролируемых свалках или попало в окружающую среду. Такая ситуация привела к растущему интересу к биоразлагаемым материалам для замены традиционных синтетических пластиков.

1.2 Биоразрушаемые полимеры - общая характеристика

Многие из синтетических полимеров, изучаемых в настоящее время, не поддаются биологическому разложению. Например, было установлено, что полистирол и мочевиноформальдегидные смолы вообще не разлагаются и остаются прозрачными после 32 лет пребывания в почве; в случае с ПВХ разлагается только пластификатор на поверхности полимерной пленки; полиэтилен разлагается в некоторой степени, а поверхность пленки, соприкасающейся с почвой, становится непрозрачной и беловатой. [25–26]. Поэтому необходим новый подход к разработке полимеров, а именно - создание полимеров, которые сохраняют все нужные для применения свойства только на период потребления, а затем изменяются физически, химически и биологически под воздействием факторов окружающей среды. Также очень важно, чтобы полимерные материалы после биodeградации могли легко включаться в процессы метаболизма природных систем. Основными

характеристиками биоразрушаемых полимеров являются химическая структура полимера, длина углеродной цепи, молекулярная масса и т.д.

По данным ряда исследователей, химическая структура полимера оказывает влияние на скорость деградации. Это означает, что, если природный или синтетический полимер содержит связи, которые легко гидролизуются, он будет обладать высокой биоразлагаемостью.

Одним из важных факторов является длина углеродной цепи. Если же мономеры или олигомеры могут быть разрушены и затем использованы микроорганизмами, то полимеры, у которых большая молекулярная масса и, соответственно, размер, являются устойчивыми к биоразрушению микроорганизмами.

Существуют методы, которые инициируют биodeградацию некоторых типов полимеров. Эти процессы могут быть небиологического характера. Так, например, механическая деградация или термическое окисление направлены на снижение молекулярной массы полимера.

Синтез биodeградируемых полимеров направлен на внедрение в углеродную цепь полимера добавок(прекурсоров), содержащих функциональные группы, которые способны к разложению микроорганизмами. Однако существуют определенные трудности. Например, добавки включаются в полимеры на стадиях синтеза или переработки, тогда как деструкция должна происходить после их использования. По этой причине необходимо создавать активаторы деградации, которые придают пластмассовым изделиям определенный срок службы.

Исследования, проводимые в области синтеза биоразрушаемых полимеров, значительны для решения современных мировых проблем экологии в связи с загрязнением окружающей среды небиоразлагаемыми пластиками.

1.3 Полигидроксиалканоаты, их свойства и применение

В зависимости от мономерного состава, ПГА могут быть термопластичными или эластомерными, обладать различными физическими и химическими характеристиками: прочность на растяжение, относительное удлинение на разрыв. Показатели ударной вязкости и эластичности могут быть изменены включением в состав полимера мономеров 3ГВ. [27]. Физико-химические характеристики ПГА зависят от вида бактерий и условий роста и количества атомов углерода в мономерной единице. ПГА устойчивы к ультрафиолетовому излучению, чем превосходят некоторые другие биопластики, например, полилактид. ПГА растворимы в галогенированных растворителях: хлороформе, дихлорметане, дихлорэтане [28]. Свойства полигидроксиалканоатов в отношении гидрофобности, устойчивости к гидролитическому разложению, кристалличности, хрупкости и эластичности могут быть значительно изменены путем включения мономеров с различной длиной алкильной боковой цепи, различными положениями гидроксильной группы относительно карбоксильной группы и т.д. [29].

ПГА близки по физико-химическим свойствам к широко применяемым полиэтилену и полипропилену, которые не поддаются биодegradации [30,31]. Таким образом, ПГА становятся отличным вариантом для замены синтетических пластиков [32].

Одним из наиболее важных и значимых параметров, характеризующих физико-механические свойства получаемого полимера, является молекулярная масса. Молекулярная масса зависит от условий среды: углеродного субстрата, температуры культивирования, рН среды и присутствия микроэлементов. Даже при постоянном количестве полимера, его молекулярная масса может изменяться к концу ферментации. Это происходит потому, что бактериальные клетки начинают использовать накопленный полимер, как источник углерода, при помощи внутриклеточной ПГА-деполимеразы [33]. Таким образом, на молекулярную массу могут оказывать влияние следующие факторы: условия

культивирования, концентрация ПГА-синтазы, каталитическая активность ПГА-синтазы, внутриклеточная деградация ПГА [34].

Полигидроксиалканоаты могут применяться в различных сферах: сельское хозяйство (создание полимерных матриц для адресной доставки и контролируемого высвобождения питательных веществ и пестицидов, необходимых для нормального роста растений), пищевая промышленность (в качестве «умной» упаковки), автомобильная промышленность, биомедицина (перевязочные материалы для ран, доставка лекарств и т.д.). Также биополимеры являются основой для всех форм жизни и производятся организмами, чтобы использовать, например, в качестве генетической информации, катализаторов, структурных и запасных соединений.

Говоря о микробиологическом производстве ПГА, следует сказать, что на данный момент синтезом полимеров занимаются в некоторых странах, выпуская продукты под торговыми марками Biopol™, Nodax™, DegraPol/btc®, Mirel® [35]. Первой компанией, освоившей биотехнологическое производство ПГА стала ICI (Великобритания), с 1992 году компания начала выпуск поли(ЗГБ) и сополимеров П(ЗГБ-со-ЗГВ).

1.4. Сополимерные ПГА

Углеродные субстраты играют важную роль для ПГА, так как полимеры могут быть гомополимерами или сополимерами, например, поли(3-гидроксибутират) или поли(3-гидроксибутират-со-3-меркаптопропионат) соответственно. Гомополимер П(ЗГБ), является самым охарактеризованным полимером на сегодняшний день. Однако П(ЗГБ) не обладает эластичностью, что делает его хрупким и усложняет его обработку, ограничивая области применения. Механические свойства этого полимера могут быть значительно улучшены путем включения мономеров 3-меркаптопропионата в структуру ПГА, что приводит к улучшению механических свойств. Таким образом, сополимеры являются предпочтительными материалами при выборе ПГА для

переработки в товарные изделия, например, с помощью экструзии расплава, литья под давлением или 3D-печати [3].

1.5 Серосодержащие полимеры

Недавно были описаны первые микробные полимеры, содержащие тиоэфирные связи. Они были синтезированы бактериями, накапливающим ПГА. Помимо белков и нескольких сложных полисахаридов, это единственные органические биополимеры, содержащие серу. Более того, они содержат серу не в боковых цепях, а в основной цепи как часть ковалентной связи компонентов, тем самым создавая новый класс биополимеров, называемых политиоэфирами (ПТЭ).

Структурная формула одного из политиоэфиров изображена на рисунке 1.

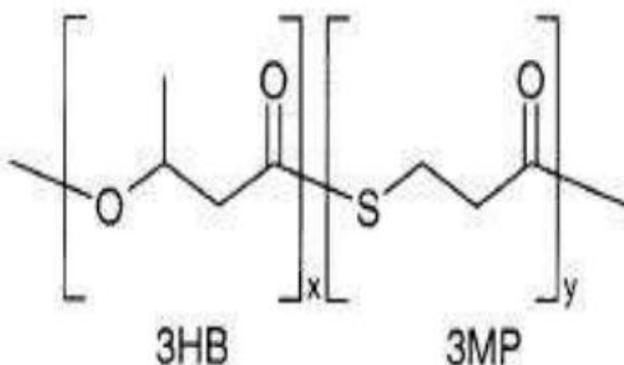


Рисунок 1 - Структурная формула поли(3-гидроксибутирата-со-3-меркаптопропионата)

Политиоэфиры содержат серу в основной цепи и представляют собой стойкие биополимеры, которые производятся с помощью определенных химических процессов, а также биотехнологических процессов.

Первыми примерами ПТЭ были сополимеры, содержащие ЗГБ и 3-меркаптопропионат (ЗМП), которые были получены при выращивании бактерий *Ralstonia eutropha* H16. *R. eutropha* H16 культивировали в

присутствии 3-меркаптопропионовой кислоты, 3,3-тиодипропионовой кислоты (3,3-ТДПК), 3,3-дитиодипропионовой кислоты (3,3-ДТДП).

1.5.1. Химические и физические свойства ПТЭ

Поли(3-гидроксибутират), который получили в результате бактериального синтеза, привлек большое внимание ученых благодаря его способности к биологическому разложению и его биосовместимости. Однако, как упоминалось выше, у данного гомополимера есть ряд недостатков: хрупкость и термическая нестабильность выше его точки плавления.

Свойства П(ЗГБ) можно модифицировать включениями, т.е. синтезируя новые сополимеры. Так, сополимер П(ЗГБ-со-ЗМП) обладает пониженной температурой стеклования, температурой плавления и степенью кристалличности [18].

Молекулярная масса и полидисперсность, как правило, высокие у данных сополимеров. Рентгеноструктурный анализ показал, что у сополимера П(ЗГБ-со-ЗМП) обнаружилось существенные различия в дифракционных картинах. Также образцы с низким содержанием мономеров ЗМП кристаллизуются также как П(ЗГБ), следовательно, сополимер, у которого будут высокие включения ЗМП будет обладать гораздо более высокой степенью кристалличности [36].

1.5.2. Микроорганизмы-продуценты политиоэфиров

Биополимеры являются основой для всех форм жизни и производятся организмами для использования, например, как генетическая информация, катализаторы, структурные соединения и запасные соединения. Известны восемь классов биополимеров включающие нуклеиновые кислоты, полиангидриды, полиамиды, полиизопреноиды, полифенолы, полисахариды, полиоксоэфир и политиоэфир (ПТЭ). ПТЭ синтезируются многочисленными микроорганизмами. Среди различных микроорганизмов, продуцирующих ПТЭ

наиболее изучены *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Advenella mimiagardefordensis* [19].

1.5.2.1. *Ralstonia eutropha*

Микробный синтез был впервые описан в 2001 году Lutke Eversloh и др. Единственным отличием от соответствующих полиоксоэфиров является наличие атома серы вместо кислорода в основной цепи. Это, вероятно, является причиной отсутствия биоразлагаемости идентифицированных гомополимеров ПТЭ. В противном случае, появление серы в биополимерах обычно ограничивается белками и несколькими сложными полисахаридами, где сера находится в боковых цепях.

Как говорилось ранее, микробное производство ПТЭ впервые было достигнуто с использованием клеток *C. necator*, являющегося модельным организмом для синтеза полигидроксиалканоатов (ПГА). Клетки инкубировали в среде в условиях, способствующих синтезу ПГА в присутствии обязательного серосодержащего прекурсора, такого как 3-меркаптопропионовая кислота (ЗМПК), и второго источника углерода для роста (в качестве субстрата необходимо добавлять второй утилизируемый источник углерода, такой как глюконат или фруктоза) [15,16]. *C. necator* могла накопить сополимеры 3-гидроксибутирата (ЗГБ) и ЗМП, поли(ЗГБ-со-ЗМП), в которых содержались до 40 мол.% ЗМП [38]. Вариации состава сополимера были получены, главным образом, путем изменения используемого серосодержащего субстрата-предшественника [39].

Применение 3-меркаптомасляной кислоты (ЗМБ) или 3-меркаптовалериановой кислоты (ЗМВ) в качестве субстратов-предшественников давали соответствующие сополимеры, синтезируемым клетками *C. necator*. Анализ этих сополимеров показал, что фракция ЗМБ в П(ЗГБ-со-ЗМБ) доходила до 73 мол.%, тогда как содержание ЗМВ в сополимере П(ЗГБ-со-ЗМВ) было менее 5 мол.% [37].

Другой субстрат 3,3-дитиодипропионовая кислота (3,3-ДТДК), продукт окисления и дисульфид субстрата-предшественника 3МП, с ее добавлением синтезированные сополимеры имели включения 3МП до 54 мол.%. Однако молекулярные массы выделенного П(ЗГБ-со-3МП) и выход полимера снижались одновременно с увеличением концентрации субстрата-предшественника [39].

Следующим нетоксичным субстратом-предшественником была 3,3-тиодипропионовая кислота (3,3-ТДПК). Использование этого тиоэфира для синтеза ПТЭ у *S. necator* было тщательно изучено [39,37,40]. 3,3-ТДПК, применяемый в качестве предшественника, давал более высокое общее содержание сополимера в сухой биомассе клеток, но меньшую долю мономеров 3МП в полимере по сравнению с культивированием в присутствии 3,3-ДТДК [39,37]. Преимуществом применения 3,3-ТДПК является то, что фракцию сополимера, по-видимому, можно было регулировать в диапазоне 1-39 мол.% путем регулирования условий культивирования [37].

До сих пор микробный синтез ПТЭ ограничивался 3-меркаптоалканоатами. Все попытки включить 4-меркаптомасляную кислоту (4МБ) потерпели неудачу, хотя использовались различные субстраты-предшественники, различные штаммы бактерий и альтернативные стратегии ферментации [39,40]. Кроме того, производство гомополимеров ПТЭ, по-видимому, невозможно с использованием *S. necator*, поскольку биосинтез и включение мономеров ЗГБ в полимер, по-видимому, не могут быть полностью подавлены ни вариациями условий культивирования, ни метаболически модифицированными штаммами [41,42].

1.5.2.2. *Escherichia coli*

Поскольку синтез гомополимера поли(3МП) был невозможно в клетках *S. necator*, производство гомополитиоэфира было исследовано в рекомбинантном штамме *E. coli*. Этот штамм (JM109) содержит плазмиду pVPP1, которая содержит гены, кодирующие следующие ферменты:

бутираткиназу (Buk) и фосфотрансбутирилазу (Ptb) из *Clostridium acetobutylicum* в дополнение к ПГА-синтазе из *Thiocapsa pfennigii*, которая состоит из двух субъединиц PhaE и PhaC (подчеркнутые буквы: ВРЕС). PhaЕС распознает КоА-тиоэфир с короткой и средней длиной цепи (С3–С14). Этот синтетический путь был ранее сконструирован для синтеза полиэфиров, содержащих атипичные компоненты, и не зависит от центрального метаболизма штамма-хозяина [43-46].

Синтез гомополимера П(ЗМП) дало следующие результаты: содержание полимера и включение ЗМП составило соответственно до 45% от сухой биомассы и 69 мол.% [42].

1.5.2.3. *Advenella mimigardefordensis*

Штамм *A. mimigardefordensis* DPN7T был первоначально использован для исследования катаболического пути субстратов-предшественников ПТЭ [48-53]. Помимо способности продуцировать полиоксоэфир, подобные ПГБ, клетки штамма *A. mimigardefordensis* DPN7T также были способны использовать мономеры ЗМП для ПТЭ [47,53]

Дикий тип *A. mimigardefordensis* синтезировал ПТЭ, подобно *R. eutropha* [39], только гетерополимер П(ЗГБ со-ЗМП). Поэтому создали рекомбинантный штамм. Кроме того, условия культивирования были идеальными для получения гомополимера ПТЭ, если в качестве источника углерода использовался глицерин, а в качестве серосодержащего предшественника - 3,3-ДТДК (включение ЗМП составило до 25 мол.%) [53].

1.5.3. Биосинтез политиоэфиров

Синтезу политиоэфиров посвящено не так много работ. О химическом синтезе политиоэфиров впервые сообщила компания Marvel&Kotch в 1951, однако ПТЭ никогда не производились массово для коммерческого

использования из-за высоких затрат, токсичности реагентов, сложных механизмов и низких выходах, несмотря на трудоемкость процесса.

Говоря о биосинтезе ПГА в микроорганизмах, следует сказать, что данный процесс прямо или косвенно связан с путями превращения основных питательных веществ в клетке (центральными метаболическими путями), такими как гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса, биосинтез и деградация аминокислот и жирных кислот.

Ацетил-КоА является основным предшественником для биосинтеза ПГА. Первый путь – путь синтеза поли(3-гидроксибутирата), который состоит из трёх ключевых стадий:

1. Ацетил-КоА ацетилтрансфераза (PhA) катализирует конденсацию двух молекул ацетил-КоА в ацетоацетил-КоА;
2. Ацетоацетил-КоА превращается в (R)-3-гидроксибутирил-КоА с помощью ацетоацетил-КоА редуктазы (PhB);
3. ПГА-синтаза (PhaC) полимеризует (R)-3ГБ-КоА в растущую цепь ПЗГБ.

Второй путь — это путь синтеза поли(3-меркаптопропионата), состоящий из двух ключевых стадий:

1. 3-меркаптопропионовая кислота попадает в клетку и под действием бутираткиназы (Buk) и фосфотрансбутирулазы (Ptb) происходит образование 3-меркаптопропионил-КоА
2. Затем ПГА-синтаза, состоящая из двух субъединиц PhaE и PhaC полимеризует ЗМП-КоА в растущую цепь П(ЗМП)
2. Либо же происходит полимеризация и встраивание в растущую цепь П(ЗГБ).

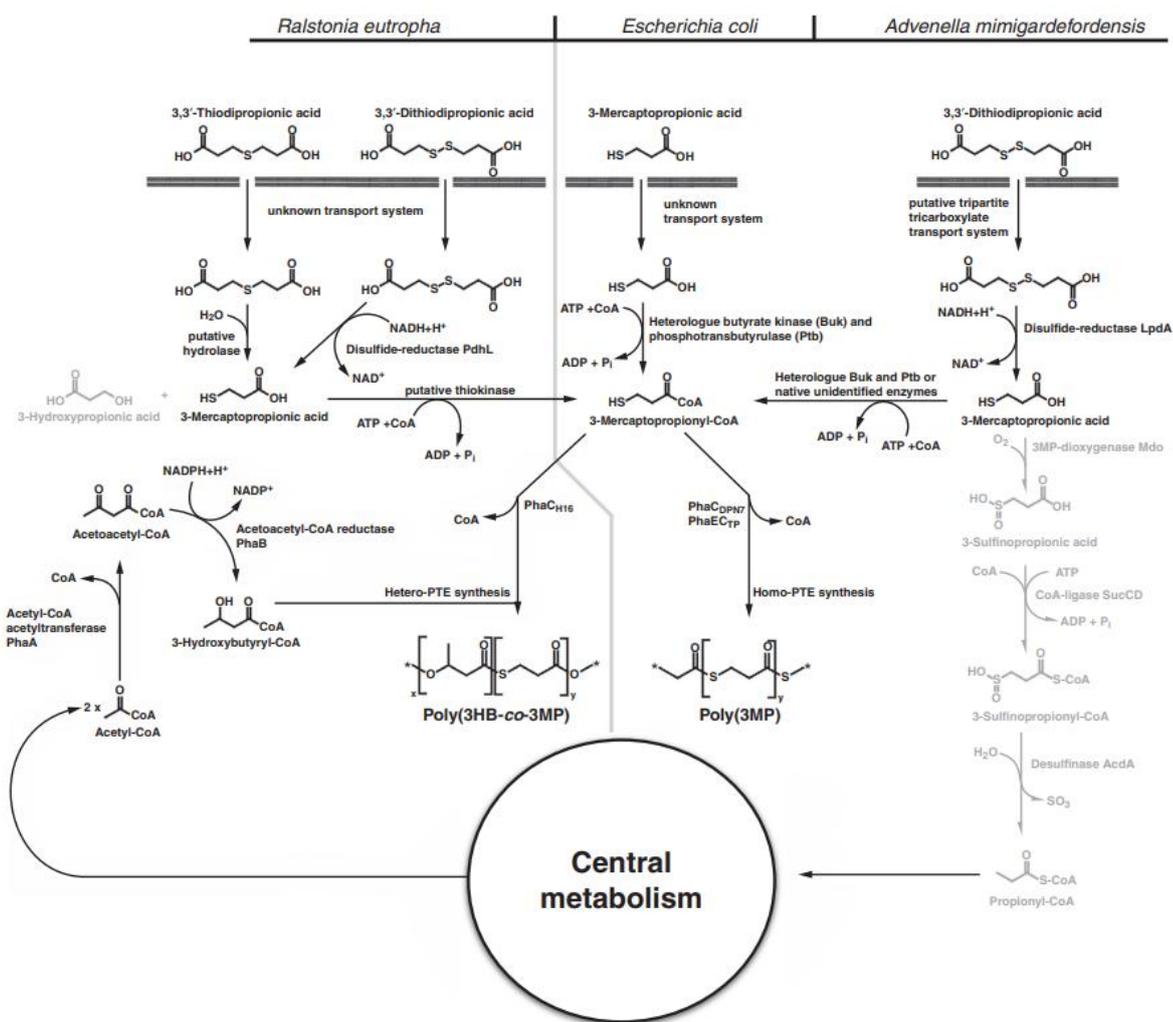


Рисунок 3. Пути для использования 3-меркаптопропионовой кислоты, 3,3-тиодипропионовой кислоты и 3,3-дितिодипропионовой кислоты в качестве субстратов-предшественников для синтеза ПТЭ.

1.6 Деградация ПТЭ

Проведено множество исследований по изучению биоразлагаемости ПГА в различных естественных средах и идентифицировано около 700 штаммов ПГА разлагаемых микроорганизмов. Разложение ПГА микроорганизмами в окружающей среде происходит благодаря внеклеточным деполимеразам, которые гидролизуют полимер до растворимых в воде продуктов, и продукты гидролиза затем используются в качестве углеродных субстратов и энергии.

Исследований по биодegradации ПТЭ было проведено очень мало из-за дороговизны прекурсоров ЗМП, и синтез полимеров требует очень много усилий и внимания. Исследования некоторых ученых по изучению физических свойств ПТЭ показали, что характеристики ПТЭ, как термическая стабильность, кристалличность и растворимость значительно различаются от кислородсодержащих аналогов ПГА.

Говоря о биодegradации следует сказать, что исследования в данной области продолжаются до сих пор, так Elbanna и др. (2004) выделили термофильный штамм K14T, который мог использовать П(ЗГБ-со-ЗМП) в качестве источника углерода. Но подавляющее большинство бактерий не могут разлагать поли(ЗМП). Поэтому из-за своей небиоразлагаемости биологический Р(ЗГБ-со-ЗМП) может представлять интерес для некоторых специальных технических применений. Также для Р(ЗГБ-со-ЗМП) характерна биосовместимость, и это свойство можно использовать при разработке медицинских устройств, где биодegradация не желательна.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Бактериальный штамм и получение инокулята

В данном исследовании использовали штамм *Cupriavidus necator* В-10646, зарегистрированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. *Cupriavidus necator* В-10646 - грамотрицательная, палочковидная, факультативная хемолитоавтотрофная β-протеобактерия. Эта бактериальная культура была получена путем ресуспендирования музейной культуры, хранившейся на агаризованной среде (однородные круглые колонии, бледно-кремовые, непрозрачные со слегка волнистым краем диаметром 2-4 мм). Посевной материал (инокулят) выращивали в колбах в жидкой солевой среде Шлегеля, которая содержит (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 9,5; KH_2PO_4 1,5; MgSO_4 0,2; железа лимоннокислого 0,025. Микроэлементы вносили из расчета 3 мл раствора микроэлементов на 1 л среды. Раствор микроэлементов содержит (г/л): H_3BO_3 0,228; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,030; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,008; $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 0,008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,176; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,008; NiCl_2 0,008. Основным источником углерода была фруктоза. В колбах поддерживали постоянную концентрацию фруктозы от 10,0 до 15,0 г/л. Ферментацию осуществляли в стеклянных конических колбах объемом 0,5 л (коэффициент заполнения 0,4) в шейкере-инкубаторе «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при температуре 30°C и 200 об/мин в течение 24 ч.

2.2 Культивирование бактерий

Посевной материал (инокулят) в стерильных условиях вносили в среду Шлегеля, затем добавляли раствор фруктозы в качестве источника углерода (начальная концентрация в среде 10,0-15,0 г/л), а также субстраты-предшественники для накопления поли(3ГБ-со-3МП) – 3-меркаптопропионовую, 3,3'-тиодипропионовую и 3,3'-дитиодипропионовую

кислоты (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в различных концентрациях:

- 3-меркаптопропионовая кислота (разовая добавка на 24 час): 0,5 мл/л, 0,7 мл/л, 1 мл/л, 2 мл/л.
- 3-меркаптопропионовая кислота (дробное добавление): 2 мл/л(1+1), 3,5 мл/л (0,5+1+2), 4,5 мл/л (0,5+2+2).
- 3,3'-тиодипропионовая кислота (разовая добавка на 24 час): 0,5 г/л, 1 г/л, 2 г/л.
- 3,3'-тиодипропионовая кислота (дробное добавление): 2 г/л (1+1), 4 г/л (2+2), 6 г/л (3+3), 2,1 г/л (0,7+0,7+0,7), 3 г/л (1+1+1), 4 г/л (1+1+1+1), 2 г/л (1+1), 2,5 г/л (1+1,5), 4 г/л (1+1+1+1), 6 г/л (1+2+1+2).
- 3,3'-дитиодипропионовую кислота (разовая добавка на 24 час): 0,5 г/л, 1 г/л, 2 г/л.
- 3,3'-дитиодипропионовую кислота (дробное добавление): 2 г/л (1+1).

Время культивирования составляло от 72 до 96 ч в зависимости от эксперимента. Ферментацию осуществляли в колбах объемом 0,5 л (коэффициент заполнения 0,4). Остальные условия описаны выше в пункте 2.1.

2.3 Регистрация параметров культивирования

Увеличение клеточной биомассы в процессе культивирования бактерий регистрировали по сухой биомассе и оптической плотности культуры. Для этого регулярно отбирали образцы и анализировали в течение всего процесса культивирования.

2.3.1 Определение оптической плотности

Образцы готовили из бактериальной культуры, разведенной в дистиллированной воде (1:5), и измеряли на спектрофотометре UNICO-2100 (UNITED PRODUCTS & INSTRUMENTS, США) при $\lambda=440$ нм (длина оптического пути 1 мм).

2.3.2 Определение концентрации субстрата

Содержание фруктозы определяли резорциновым методом. Для этого 2 мл бактериальной культуры отбирали и центрифугировали (Centrifuge 5417 R, «Eppendorf», Германия). 0,5 мл надосадочной жидкости разбавляли в 25 мл дистиллированной воды. К 1 мл пробы добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (50 мг резорцина разводили в 50 мл 95 %-ного этилового спирта) и 3 мл раствора соляной кислоты и воды (5:1). Контролем была дистиллированная вода. Пробирки с пробами выдерживали на водяной бане 20 минут при $t=80$ °С, затем охлаждали до комнатной температуры. Далее производили измерение оптической плотности проб с помощью спектрофотометра UNICO-2100 при длине волны в 540 нм (длина оптического пути 5 мм) против контроля. Концентрацию фруктозы определяли по калибровочному графику.

2.3.3 Определение бактериальной биомассы

Для определения веса бактериальной биомассы 25 мл бактериальной суспензии центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 6 мин при 6000 об/мин. Затем промывали 3 раза дистиллированной водой и промытый осадок без потерь переносили в предварительно взвешенные стеклянные бюксы. Бюксы с биомассой размещали в сушильном шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) при 90 °С на 24 ч. После этого бюксы охлаждали в эксикаторе до комнатной температуры и взвешивали на аналитических весах Adventurer, «OHAUS», США. Вес биомассы определяли как разницу между весом бюкса, содержащим биомассу, и его исходным весом.

2.4 Определение содержания и состава полимера

Для определения содержания и состава полимера проводили метанолиз высушенной биомассы: в навеску 3,9-4,5 мг высушенной биомассы добавляли 0,85 мл метанола и 1 мл внутреннего стандарта, который содержал 0,5 мг бензойной кислоты, 1 мл хлороформа, и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Выдерживали на водяной бане под обратным холодильником 2 ч 40 мин. После этого добавляли 1 мл дистиллированной воды.

Проводили хроматографию 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 °С; начальная температура хроматографирования – 55 °С; подъем температуры до 310 °С со скоростью 10°С/мин, изотермальный режим – 5 мин; температура детектора – 150 °С; температура источника ионов - 230°С; 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 Исследование физико-химических свойств полимера

2.5.1 Определение молекулярной массы ПГА

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_ч) и средневесовую (M_в) молекулярные массы, полидисперсность (D).

2.5.2 Степень кристалличности

Определение степени кристалличности ПГА получали на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE «Bruker», Германия. Регистрацию осуществляли с шагом $0,04^\circ$ и выдержкой 2 с для измерения интенсивности в точке. Степень кристалличности рассчитывали с использованием программного обеспечения Bruker AXS TOPAS v.4.2 (Германия).

2.5.4 Определение температурных характеристик полимера

Термический анализ ПГА проводили при помощи дифференциально-сканирующего калориметра ДСК-1 (Mettler Toledo, Германия) и ТГА (Mettler Toledo, Германия). Порошкообразные ПГА массой $4,0 \pm 0,2$ мг помещали в алюминиевые тигли, нагревали со скоростью $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 200°C . Далее образцы охлаждали до -20°C , выдерживали 20 мин и повторно нагревали до 320°C . Температуры стеклования, кристаллизации, плавления и термической деградации определяли по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE».

2.6 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных в ходе эксперимента данных проводили с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel.

3. Результаты

Страницы 26-40 изъяты в связи с авторским правом

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что, варьируя концентрацию и количество доз предшественника ЗМП, вносимого в бактериальную культуру *Cupriavidus necator B-10646*, удалось найти условия, обеспечивающие образование мономеров 3-меркаптопропионата (ЗМП) из предшественников (3-меркаптопропионовой, 3,3'-тиодипропионовой и 3,3'-дитиодипропионовой кислот) и включение их в С-цепь, поли(3-гидроксибутирата).

Получен набор сополимеров с различным содержанием 3-гидроксибутирата (от 60,01 мол.% до 97,96 мол.%) и включений 3-меркаптопропионата (от 2,04 мол.% до 39,0 мол.%).

Проведены исследования, позволившие выявить зависимость между содержанием ЗМП и их физико-химическими свойствами. Представлено, что новые типы мономеров (ЗМП) в составе ПГА действуют на молекулярную массу, температурные характеристики и степень кристалличности синтезируемых сополимеров. Также, нами был получен значительный результат действия новых мономеров на свойства ПГА, заключающийся в выравнивании аморфной и упорядоченной фаз и значительном снижении степени кристалличности (ниже 50%) у полученных в ходе экспериментов образцов сополимера. Снижение степени кристалличности образцов ПГА положительно сказывается на их свойствах и кинетики кристаллизации, что облегчает переработку в специализированные продукты, улучшая технологические свойства

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

3,3-ДТДП – 3,3'-дитиодипропионовая кислота

3,3-ТДПК – 3,3'-тиодипропионовая кислота

3МП – 3-меркаптопропионат

3МПК – 3-меркаптопропионовая кислота

Д – полидисперсность

M_v – средневесовая молекулярная масса

M_n – среднечисловая молекулярная масса

П(ЗГБ) – поли(3-гидроксibuтират)

П(ЗГБ-со-3МП) – поли(3-гидроксibuтират-со-3-меркаптопропионат)

ПГА – полигидроксиалканоаты

ПТЭ – политиоэфиры

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Plastics completely synthesized by bacteria: Polyhydroxyalkanoates / Chen, G.-Q. // In *Plastics from Bacteria*. – 2010. P. 17–37.
2. Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates / Sudesh, K.// Smitthes. – 2010. – P. 158.
3. Switching from petro-plastics to microbial polyhydroxyalkanoates (PHA): The biotechnological escape route of choice out of the plastic predicament? / Koller, M. // *EuroBiotech J.* – 2019. - V. 3. – P. 32–44.
4. Biomedical applications of environmental friendly poly-hydroxyalkanoates / Ansari, S.; Sami, N.; Yasin, D.; Ahmad, N.; Fatma, T. // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. - V. 183. – P. 549–563.
5. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates / Chanprateep, S. // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2010. – V. 110. – P. 621–632.
6. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects / Kumar, M.; Rathour, R.; Singh, R.; Sun, Y.; Pandey, A.; Gnansounou, E.; Thakur, I.S. // *Journal of Cleaner Production*. – 2020. – V. 263. - P. 121500.
7. Study of the crystal phase and crystallization rate of bacterial poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) / Scandola, M.; Ceccorulli, G.; Pizzoli, M.; Gazzano, M.// *Macromolecules*. – 1992. – V. 25. – P. 1405–1410.
8. Microbial synthesis and properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) / Saito, Y.; Nakamura, S.; Hiramitsu, M.; Doi, Y.// *Polymer. Int.* – 1996. – V. 39. – P. 169–174.
9. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids / Steinbüchel, A.; Valentin, H.E.// *FEMS Microbiol. Lett.* – 1995. – V. 128. - P. 219–228.
10. In *Plastics from Bacteria* / Olivera, E.R.; Arcos, M.; Naharro, G.; Luengo, J.M. Unusual PHA biosynthesis. // In *Plastics from Bacteria*. – 2009. – P. 133–186.
11. Polyhydroxyalkanoates—Plastic Materials of the 21st Century: Production, Properties, Application / Volova, T.G. // *Nova Science Pub.* – 2004. – P. 282.

12. The physicochemical properties of polyhydroxyalkanoates with different chemical structures / Volova, T.G.; Zhila, N.O.; Shishatskaya, E.I.; Mironov, P.V.; Vasil'ev, A.D.; Sukovatyi, A.G.; Sinskey, A.J.// *Polymer*. – 2013. - V. 55. – P. 427–437.

13. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates with Different Chemical Compositions and Their Biodegradability / Volova, T.G.; Prudnikova, S.V.; Vinogradova, O.N.; Syrvacheva, D.A.; Shishatskaya, E.I.// *Microbial ecology*. – 2017. – V. 73. – P. 353–367.

14. Thermal properties and crystallization behavior of fractionated blocky and random polyhydroxyalkanoate copolymers from mixed microbial cultures / Laycock, B.; Arcos-Hernandez, M.V.; Langford, A.; Buchanan, J.; Halley, P.J.; Werker, A.; Pratt, S.// *Journal of Applied Polymer Science*. – 2014. – V. 131. – P. 1–19.

15. Identification of a new class of biopolymer: Bacterial synthesis of a sulfur-containing polymer with thioester linkages / Lütke-Eversloh, T.; Bergander, K.; Luftmann, H.; Steinbüchel, A. // *Microbiology*. – 2001. – V. 147. – P. 11–19.

16. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-mercaptoputyrate) as a sulfur analogue to poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) / Lütke-Eversloh, T.; Bergander, K.; Luftmann, H.; Steinbüchel, A. // *Biomacromolecules*. – 2001. - V. 2. – P. 1061–1065.

17. Physical properties of microbial polythioesters: Characterization of poly (3-mercaptoputyrate) synthesized by engineered *Escherichia coli* / Kawada, J.; Lütke-Eversloh, T.; Steinbüchel, A.; Marchessault, R.H. // *Biomacromolecules*. – 2003. – V. 4. – P. 1698–1702.

18. Comparative study of effects of thio/oxo ester linkages on thermal properties of bacterial poly [3-hydroxybutyrate-co-3-(mercapto/hydroxy) propionates / Tanaka, S.; Feng, L.; Inoue, Y.// *Polymer*. – 2004. - V. 36. – P. 570–573.

19. New pathways for bacterial polythioesters / Wübbeler, J.H.; Steinbüchel, A.// *Current Opinion in Biotechnology*. – 2014. – V. 29. – P. 85–92.

20. Non-biodegradable biopolymers from renewable resources: Perspectives and impacts / Steinbüchel, A. // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2005. - V. 16. - P. 607–613.

21. Recent developments in non-biodegradable biopolymers: Precursors, production processes, and future perspectives / Andreeben, C., Steinbüchel, A. // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2018. - V. 103(1). – P. 143-157.
22. Пономарева, В.Т. Использование пластмассовых отходов за рубежом/ В.Т. Пономарева, Н.Н. Лихачева, З.А. Ткачик// *Пластические массы*, 2002. - №5. – С. 44-48.
23. Cain, R.B. Microbial degradation of synthetic polymers / In: Frey J.C., Gadd G.M., Herbert R.A., Jones C.W., Watson-Craik I.A. // 48 symposium of the society for general microbiology. –1992. – P. 293-338.
24. Witt, U. Biodegradation of polyester copolymers containing aromatic compounds / U. Witt, R.J. Meller, J. Klein // *Pure and Applied Chemistry*. - 1997. – V. 32. – P. 851-856.
25. Ohtake Y., Kobayashi T., Itoh S., Yamamoto Y., Yabuki M., Asabe H., Ono K.//*Nippon Gomu Kyokaishi*. - 1993. - V. 66. - P. 266.
26. Ohtake Y., Kobayashi T., Itoh S., Asabe H., Yabuki M., Ono K.//*Nippon Gomu Kyokaishi*. - 1994. - V. 67 №6. - P. 448.
27. Structural insights into polyhydroxyalkanoates biosynthesis / Sagong H. Y. et al. // *Trends in biochemical sciences*. – 2018. – V. 43. – №. 10. – P. 790-805.
28. Polyhydroxyalkanoates (PHA): From production to nanoarchitecture / Tarrahi R. et al. // *International journal of biological macromolecules*. – 2020. – V. 146. – P. 596-619.
29. Biotechnological production and characterization of polyesters containing 4-hydroxyvaleric acid and medium-chain-length hydroxyalkanoic acids / Schmack G., Gorenflo V., Steinbüchel A.//*Macromolecules*. – 1998. – V. 31. – №. 3. – P. 644-649.
30. Волова, Т. Г. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение: монография / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая. – Красноярск: Красноярский писатель. – 2011. – С. 392.

31. Polyhydroxyalkanoates: recent advances in their synthesis and applications / Winnacker M. //European Journal of Lipid Science and Technology. – 2019. – V. 121. – №. 11. – P. 1900101.

32. Волова Т. Г. Полиоксисалканоаты (ПОА)–биоразрушаемые полимеры для медицины. / Волова Т. Г., Севастьянов В. И., Шишацкая Е. И.; Институт биофизики СО РАН: Издательство СО РАН, 2003. – 173 с. - ISBN 5-7692-0608-X

33. A study on the relation between poly (3-hydroxybutyrate) depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in *Cupriavidus necator* H16 / Arikawa H. et al. //Journal of biotechnology. – 2016. – V. 227. – P. 94-102.

34. Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis / Tsuge T. //Polymer Journal. – 2016. – V. 48. – №. 11. – P. 1051-1057.

35. Биодegradация полигидроксисалканоатов почвенными микробиоценозами различной структуры и выявление микроорганизмов-деструкторов / Бояндин А. Н., Прудникова С.В., Филипченко М.Л., Храпов Е.А., Васильев А.Д., Волова Т.Г.//Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – №. 1. – С. 35-35.

36. Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate with 3-hydroxytetradecanoate monomer content by *fabB* and *fabA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442 / Liu, W.K., Chen, G.Q. // Appl. Microbiol.Biotechnol., 2007. – V.76. – P. 1153-1159.

37. Novel precursor substrates for polythioesters (PTE) and limits of PTE biosynthesis in *Ralstonia eutropha* / Lütke-Eversloh T, Steinbüchel A. // FEMS Microbiol Lett. – 2003. – V. 221. – P. 191-196

38. Characterization of microbial polythioesters: physical properties of novel copolymers synthesized by *Ralstonia eutropha* / Lütke-Eversloh T, Kawada J, Marchessault RH, Steinbüchel A. // Biomacromolecules. – 2002. – V. 3. – P. 159-166.

39. Biosynthesis and biodegradability of copolythioesters from 3,30 -thiodipropionic acid and plant oils by *Cupriavidus necator* / Kamei Y, Nagai A, Nishida H, Kimura H, Endo T. // *Macromolecular Bioscience*. – 2007. – V. 7. – P. 364-372.
40. Polythioesters In Biopolymers / Lütke-Eversloh T, Steinbüchel A.// Edited by Matsumura. – 2003. – P. 63-80.
41. Microbial polythioesters / Lütke-Eversloh T, Steinbüchel A.// *Macromolecular Bioscience*. – 2004. – V. 4. – P. 165-174.
42. Impact of multiple b-ketothiolase deletion mutations in *Ralstonia eutropha* H16 on the composition of 3-mercaptopropionic acid-containing copolymers / Lindenkamp N, Peplinski K, Volodina E, Ehrenreich A, Steinbüchel A. // *Appl Environ Microbiol*. – 2010. – V. 76. – P. 5373-5382. 2
43. Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* phosphotransbutyrylase and butyrate kinase genes in *Escherichia coli* / Cary JW, Petersen DJ, Papoutsakis ET, Bennett GN // *J Bacteriol*. – 1988. – V. 170. – P. 4613-4618.
44. Polyester synthases: natural catalysts for plastics / Rehm B.H.A. // *Biochem J*. – 2003. – V. 376. – P. 15-33.
45. Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme / Liebergesell M, Rahalkar S, Steinbüchel A. // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2000. - V. 54. – P. 186-194.
46. A novel genetically engineered pathway for synthesis of poly(hydroxyalkanoic acids) in *Escherichia coli* / Liu S-J, Steinbüchel A. // *Appl Environ Microbiol*. – 2000. – V. 66. – P. 739-743.
47. *Tetrathio bacter mimigardefordensis* sp. nov., isolated from compost, a betaproteobacterium capable of utilizing the organic disulfide 3,30 -dithiodipropionic acid / Wübbeler JH, Lütke-Eversloh T, Van Trappen S, Vandamme P, Steinbüchel A. // *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2006. – V. 56. – P. 1305-1310.

48. Novel pathway for catabolism of the organic sulfur compound 3,30 - dithiodipropionic acid via 3-mercaptopropionic acid and 3- sulfinopropionic acid to propionyl-coenzyme A by the aerobic bacterium *Tetrathiodibacter mimigardefordensis* strain DPN7 / Wübbeler JH, Bruland N, Kretschmer K, Steinbüchel A. // *Appl Environ Microbiol.* – 2008. - V. 74. - P. 4028-4035.

49. Biodegradation of the xenobiotic organic disulphide 4,40 - dithiodibutyric acid by *Rhodococcus erythropolis* strain M12 and comparison with the microbial utilization of 3,30 - dithiodipropionic acid and 3,30 -thiodipropionic acid / Wübbeler JH, Bruland N, Wozniczka M, Steinbüchel A. // *Microbiology.* – 2010. - V. 156. - P 1221-1223.

50. Dihydrolipoamide dehydrogenases of *Advenella mimigardefordensis* and *Ralstonia eutropha* catalyze cleavage of 3,30 -dithiodipropionic acid into 3-mercaptopropionic acid / Wübbeler JH, Raberg M, Brandt U, Steinbüchel A. // *Appl Environ Microbiol.* - 2010. – V. 76. – P. 7023-7028.

51. Novel reaction of succinyl coenzyme A (succinyl-CoA) synthetase: activation of 3-sulfinopropionate to 3-sulfinopropionyl-CoA in *Advenella mimigardefordensis* strain DPN7T during degradation of 3,30 -dithiodipropionic acid / Schürmann M, Wübbeler JH, Grote J, Steinbüchel A. // *J Bacteriol.* – 2011. – V. 193. - P.3078-3089.

52. A novel 3- sulfinopropionyl coenzyme A (3SP-CoA) desulfinate from *Advenella mimigardefordensis* strain DPN7T acting as a key enzyme during catabolism of 3,30 -dithiodipropionic acid is a member of the acyl-CoA dehydrogenase superfamily / Schürmann M, Deters A, Wübbeler JH, Steinbüchel A. // *J Bacteriol.* – 2013. - V. 195. – P. 1538-1551.

53. Employing a recombinant strain of *Advenella mimigardefordensis* for biotechnical production of homopolythioesters from 3,30 - dithiodipropionic acid / Xia Y, Wübbeler JH, Qi Q, Steinbüchel A.// *Appl Environ Microbiol.* – 2012. - V. 78. - P. 3286-3297.

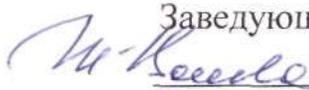
54. Biosynthesis and Properties of Sulfur-Containing Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Produced by Wild-Type Strain *Cupriavidus necator* B-10646 / Zhila N.,

Sapozhnikova K.Yu., Berezovskaya A.V., Kiselev E.G., Shishatskaya E.I., Vasiliev A.D., Sabu Thomas and Volova T.G. //Polymers. – 2023. – V. 15. - P.1005.

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой
 Т.Г. Волова
Подпись, инициалы фамилия
« 26 » _июня__ 2023г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Биотехнологический синтез серосодержащих полигидроксиалканоатов
бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 и их свойства

Научный руководитель


Подпись, дата

к.б.н., доцент
должность, ученая степень

Н. О. Жила
инициалы, фамилия

Выпускник


Подпись, дата

А. В. Березовская
инициалы, фамилия

Красноярск 2023