

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт

Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ Т.Г Волова

«___» _____ 2024г

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Закономерности аккумуляции и свойства четырехкомпонентных
полигидроксиалканоатов, синтезированных природным штаммом

Cupriavidus necator В-10646

06.04.01 - Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель

подпись, дата

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

Н. О. Жила
инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

Д. А. Гурбанова
инициалы, фамилия

Рецензент

подпись, дата

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

А.В. Муруева
инициалы, фамилия

Красноярск 2024

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Закономерности аккумуляции и свойства четырёхкомпонентных полигидроксиалканоатов, синтезированных природным штаммом *Cupriavidus necator* В-10646» содержит 58 страниц текстового документа, 1 таблицу, 23 иллюстрации, 69 литературных источника.

Ключевые слова: многокомпонентные полигидроксиалканоаты, 4-гидроксипентанат, 4-гидроксипентанат, 3-гидроксипентанат, леулиновая кислота, валериановая кислота, 4-хлормасляная кислота, ϵ -капролактон, γ -валеролактон, *Cupriavidus necator*.

Целью данной работы было изучение синтеза четырехкомпонентных полигидроксиалканоатов природным штаммом *Cupriavidus necator* В-10646 при использовании различных предшественников синтеза 3ГВ, 4ГБ и 4ГВ, а также исследование свойств полученных полимеров

Для этого было необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать закономерности синтеза четырехкомпонентных полигидроксиалканоатов при использовании в качестве предшественников 3ГВ, 4ГБ и 4ГВ, соответственно, валериановой кислоты, ϵ -капролактона, γ -валеролактона.
2. Изучить влияние 4-хлормасляной кислоты как предшественника 4ГБ на накопление биомассы и полимера, а также соотношение мономеров 3ГБ, 3ГВ, 4ГБ и 4ГВ в полимере.
3. Исследовать возможность использования леулиновой кислоты в качестве предшественника одновременно мономеров 3ГВ и 4ГВ.
4. Исследовать физико-химические свойства полученных полимеров с различным соотношением мономеров 3ГБ, 3ГВ, 4ГБ и 4ГВ.

Полигидроксиалканоаты – полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутриклеточного запасного материала. ПГА являются биоразлагаемыми, биосовместимыми, экологически чистыми материалами и могут быть получены из возобновляемых источников углерода.

Поли(3-гидроксибутират), является наиболее изученным членом семейства ПГА, но потенциал его применения ограничен из-за высокой кристалличности, которая снижает эластичность материала. Однако свойства материалов можно регулировать, когда в полимерную цепь включаются другие мономерные структуры путем подачи в микробную культуру подходящих предшественников.

ПГА, содержащие мономеры 3ГБ и 4ГБ, 3ГВ и 4ГВ, обладают более высокой эластичностью и меньшей кристалличностью.

Однако, в литературе отсутствуют данные о синтезе и свойствах 4-компонентных ПГА, содержащих одновременно эти мономеры.

СОДЕРЖАНИЕ

Реферат	2
Содержание	4
Введение	5
1 Обзор литературы	8
1.1 Характеристика ПГА	8
1.2 Продуценты ПГА	10
1.3 Основные виды полигидроксиалканоатов.....	11
1.4 Свойства ПГА	13
1.5 Свойства ПГА, состоящего из разных мономеров	16
1.6 Свойства многокомпонентных ПГА	19
2 Материалы и методы	23
2.1 Культивирование и условия роста бактерий.....	23
2.2 Определение оптической плотности	24
2.4 Определение концентрации биомассы бактерий.....	24
2.5 Экстракция полимера.....	25
2.6 Определение содержания полимера.....	25
2.7 Определение молекулярных характеристик полимера	26
3 Результаты.....	28
ЗаКЛЮЧЕНИЕ	50
Список сокращений	51
Список использованных источников	52

ВВЕДЕНИЕ

Пластик наносит серьезный ущерб окружающей среде, начиная с его производства и заканчивая утилизацией. Глобальное производство полимерных материалов приводит к повышению уровня CO_2 в атмосфере, к растущему количеству отходов. Это связано с высокой прочностью и устойчивостью пластмасс к деградации. Истощение невозобновляемых ресурсов ведет к разрушению механизма саморегулирования биосферы с непредсказуемыми последствиями [1].

Ежегодно в мире производится 367 млн. т пластмасс, время полного распада которых составляет минимум 450 лет. Большинство изделий из них используются однократно. Лишь 5% от объема в конечном итоге подвергается переработке и используется повторно в быту и жизни. Загрязнение планеты пластиковыми отходами приобретает катастрофические масштабы [2, 3].

Одним из способов решения данной проблемы является замена синтетических полимеров новыми материалами, которые способны разрушаться в окружающей среде естественным путем.

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластические полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными элементами и при избыточном содержании источника углерода [4]. ПГА считаются одними из наиболее перспективных биопластиков, используемых в различных областях: в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, медицине и фармакологии. Эти полимеры являются биоразлагаемыми, биосовместимыми, экологически чистыми материалами и могут быть получены из возобновляемых источников углерода; также ПГА могут способствовать снижению накопления CO_2 в биосфере [5].

Известно, что свойства ПГА зависят от состава мономеров. Гомополимер 3-гидроксибутирата (ЗГБ), поли(3-гидроксибутират), П(ЗГБ) является

наиболее изученным членом семейства ПГА, поскольку он обладает многочисленными полезными свойствами, но потенциал его применения ограничен, так как он обладает высокой кристалличностью, которая снижает эластичность материала. Тем не менее, свойства материалов можно регулировать, когда в полимерную цепь включаются другие мономерные структуры путем подачи в микробную культуру подходящих предшественников [6].

Полученный добавлением соли валериановой кислоты в микробную культуру, сополимер поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат) (П[3ГБ-со-3ГВ]) демонстрирует существенно улучшенные свойства материала и пониженную кристалличность [7]. Аналогично, некоторые бактериальные штаммы, подвергшиеся воздействию 1,4-бутандиола или γ -бутиролактона (ГБЛ), способны биосинтезировать сополимеры, содержащие мономерные звенья 3ГБ и 4-гидроксibuтирата (4ГБ). Сополимер поли(3-гидроксibuтират-со-4-гидроксibuтират) (П[3ГБ-со-4ГБ]) по своим свойствам напоминает термопластичные эластомеры [8]. Более того, ПГА, обладающие субъединицами 4ГБ, демонстрируют повышенную биоразлагаемость, поэтому они находят применение в медицине [9].

Одним из привлекательных ПГА является П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГБ), так как ПГА, содержащие мономеры 3- и 4ГВ, обладают более высокой гибкостью, более низкими температурами плавления и меньшей кристалличностью. Кроме того, эти полимеры более склонны к биodeградации *in vivo* из-за наличия аморфных доменов, причем средняя площадь пор уменьшается, а их количество увеличивается с увеличением 3ГВ и 4ГВ в полимере [9].

Однако, в литературе не обнаружено данных о синтезе и свойствах ПГА, содержащего одновременно мономеры 3- и 4ГБ, и 3- и 4ГВ. В связи с этим целью данной работы является изучение возможности синтеза четырехкомпонентных ПГА природным штаммом *Cupriavidus necator* В-10646 при использовании различных предшественников синтеза 3ГВ, 4ГБ и 4ГВ, а также исследование свойств полученных полимеров.

Для этого было необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать закономерности синтеза четырехкомпонентных полигидроксисилканоатов при использовании в качестве предшественников 3ГВ, 4ГБ и 4ГВ, соответственно, валериановой кислоты, ϵ -капролактона, γ -валеролактона.
2. Изучить влияние 4-хлормасляной кислоты как предшественника 4ГБ на накопление биомассы и полимера, а также соотношение мономеров 3ГБ, 3ГВ, 4ГБ и 4ГВ в полимере.
3. Исследовать возможность использования леулиновой кислоты в качестве предшественника одновременно мономеров 3ГВ и 4ГВ.
4. Исследовать физико-химические свойства полученных полимеров с различным соотношением мономеров 3ГБ, 3ГВ, 4ГБ и 4ГВ.

1 Обзор литературы

1.1 Характеристика ПГА

Пластик улучшил качество нашей жизни благодаря своей низкой стоимости, легкому весу, термостойкости и долговечности. В 2020 году мировое производство пластмасс составило 367 миллионов тонн [3]. Это истощает ограниченные запасы ископаемого топлива и генерирует огромное количество отходов из-за высокой устойчивости пластика к биоразложению, поскольку 79% пластиковых отходов выбрасывается на свалки и в окружающую среду [10]. Кроме того, сжигание пластиковых отходов выделяет большое количество парниковых газов, ускоряя глобальное потепление, а пластик, который в больших количествах попадает в океан, образует микропластик или пластиковые острова.

Таким образом, отсутствие эффективных систем утилизации и переработки пластика на основе ископаемого топлива, а также его выброс на сушу и в океаны представляют угрозу для всей жизни на Земле [11]. Поэтому во всем мире принимаются различные правила, направленные на сокращение использования пластика. Однако, поскольку не все действующие правила обязательно являются экологически выгодными и практичными с точки зрения удобства, необходимо разумное и устойчивое решение проблемы.

Биопластики, которые обладают свойствами, аналогичными пластикам на основе ископаемого топлива, рассматриваются как устойчивая альтернатива, поскольку их можно синтезировать углеродно-нейтральными способами [12].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой полиэфиры, вырабатываемые микроорганизмами в качестве материала для хранения энергии, когда источники углерода существуют в избытке, а некоторые питательные вещества, такие как N, P, O и S, которые необходимы для правильного роста, ограничены. Как правило, пластмассы, химически синтезированные на основе нефти, практически не разлагаются при выбрасывании в окружающую среду,

однако ПГА по своей природе биоразлагаемы, устойчивы и безвредны для окружающей [13].

ПГА синтезируются из возобновляемых источников, включая сахара, полученные из лигноцеллюлозной биомассы, сельскохозяйственных отходов и растительного масла, и полностью разлагаются и превращаются в CO_2 и H_2O в почве и океанах. Более того, свойства биосовместимости ПГА позволяют безопасно использовать их в биомедицинских целях. Если 1 кг пластика на основе ископаемого топлива заменить на ПГА, можно сэкономить в среднем 2 кг выбросов CO_2 [14]. Таким образом, ПГА считаются многообещающим решением проблемы утилизации, связанной с химически синтезированными пластиками с использованием источников ископаемого топлива, поскольку они синтезируются способами, не связанными с ископаемым топливом, наряду с использованием возобновляемых ресурсов [15].

Одним из факторов, наиболее ограничивающих коммерциализацию ПГА, является их гораздо более высокая стоимость по сравнению с пластиками на основе ископаемого топлива. В 2018 году сообщалось, что отпускная цена коммерческого поли(3-гидроксibuтирата) [П(ЗГБ)], производимого микроорганизмами, составляла 3,50 доллара США за кг, тогда как цена пластиков на основе ископаемого топлива, таких как полиэтилен и полипропилен, составляла 1,20–1,30 доллара США за кг. Экономический анализ производства ПГА показывает, что затраты сырья, используемого для производства ПГА, достигают 30–50 % общих затрат на производство [16]. Для достижения экономически выгодного производства ПГА следует использовать возобновляемые ресурсы и отходы для увеличения выхода и продуктивности ПГА за счет различных метаболических путей или для упрощения производственного процесса за счет использования микроорганизмов, способных производить большие количества ПГА [17].

ПГА обычно производят из сахаров, полученных из биомассы первого поколения, такой как кукуруза и сахарный тростник, но использование богатых углеродом отходов различных отраслей промышленности, которые можно

использовать в качестве сырья для производства ПГА, может снизить стоимость дорогих субстратов и ослабить конкуренцию с пищевыми ресурсами [18]. Продемонстрировано производство ПГА на основе отработанного масла и осадка сточных вод, что также может снизить затраты на утилизацию промышленных отходов [19].

К настоящему времени идентифицировано 150 различных мономеров с различными функциональными группами, и это число продолжает расти. Свойства поли(3-гидроксибутирата) (П(ЗГБ)), представителя ПГА, который может эффективно синтезироваться многими микроорганизмами, привели к проведению множества исследований по коммерциализации П(ЗГБ). Поскольку высокая кристалличность и температура плавления ($T_{пл}$), близкая к температуре разложения ($T_{дегр}$) П(ЗГБ), препятствуют развитию процессов полимеризации П(ЗГБ), во многих исследованиях предпринимались попытки синтеза различных типов сополимеров ПГА и смешивания П(ЗГБ) с различными полимерными материалами для решения этой [20]. Применение смеси П(ЗГБ) с другими полимерами и сополимерами на основе П(ЗГБ) было доказано в различных областях, включая упаковочные контейнеры, пленки, бутылки, текстиль и носители для контролируемой доставки лекарств [21]. Возможность производить ПГА с контролируемыми свойствами на уровне ферментации с использованием возобновляемой биомассы обеспечит более привлекательный способ синтеза широкого спектра полимеров для различных применений.

1.2 Продуценты ПГА

Полигидроксиалканоаты синтезируются многочисленными грамположительными бактериями: аэробными и анаэробными, грамотрицательными бактериями, цианобактериями, а также археями. Более того, показано, что некоторые бактерии могут продуцировать ПГА без каких-либо лимитирующих факторов, например штаммы *Azohydromonas lata* IAM 12664T [22].

Наиболее распространенным ПГА является поли(3-гидроксibuтират) (П(ЗГБ)), который впервые был описан Lemian [23]. В дальнейшем было идентифицировано несколько штаммов аэробных и анаэробных бактерий, аккумулирующих П(ЗГБ). Роль П(ЗГБ) как бактериального запасного полимера, имеющего почти аналогичную функцию с крахмалом и гликогеном, была признана в 1973 году. Предположение о том, что мономер ЗГБ является единственным компонентом полимера, изменилось через год с момента его принятия в качестве бактериального запасного материала, когда были обнаружены другие типы мономеров [24]. В настоящее время существует около 150 различных мономеров, входящих в состав ПГА [25].

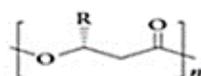
Несмотря на разнообразие изученных микроорганизмов, для промышленного применения рассматривается небольшое число продуцентов. Среди них гетеротрофные микроорганизмы, относящиеся к трем таксонам – *Methylophilus*, *Methylobacterium* и *Pseudomonas*, азотфиксаторы *Azotobacter*, представители рода *Cupriavidus* (ранее известные как *Hydrogenomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Wautersia*). Последние относятся к наиболее изученному числу бактерий благодаря тому, что они имеют наиболее развитую внутриклеточную систему синтеза ПГА и могут накапливать значительное количество ПГА (до 90% сухого веса клеток). Бактерии рода *Cupriavidus* аккумулируют ПГА различной химической структуры при выращивании на различных субстратах, включая отходы промышленных и сельскохозяйственных производств [26,27].

1.3 Основные виды полигидроксиалкананоатов

ПГА можно разделить на три группы в зависимости от количества атомов углерода. Короткоцепочечные (SCL) ПГА содержат мономерные звенья, содержащие до 5 атомов углерода. Наиболее представительным полиэфиром этого семейства является П(ЗГБ). Другими мономерами этого семейства являются 4-гидроксibuтират и 3-гидроксивалерат.

ПГА со средней длиной цепи (MCL) структурно более отличаются от SCL-ПГА, поскольку имеют от 6 до 14 атомов углерода. Здесь группа «R» может варьироваться от пропила до тридецила (например, 3-гидроксигексаноат) и может содержать ароматическую группу и алкильную боковую цепь, которая может быть насыщенной (например, 3-гидроксиоктаноат) или ненасыщенной [28].

Например, если группа R=CH₃, то образуется поли(3-гидроксибутират); для R=C₂H₅ полученный полимер представляет собой поли(3-гидроксивалерианат); при R = C₃H₇ полимер называется поли(3-гидроксигексаноатом), а если R = C₄H₉, образуется поли(3-гидроксиоктаноат) и так далее (Рисунок 1). Последняя группа относится к длинноцепочечным ПГА, имеющим более 14 атомов углерода, данная группа является редкой.



Polyhydroxyalkanoates, PHAs

<i>R group</i>		
-CH ₃	Poly(3-hydroxybutyrate)	P(3HB)
-CH ₂ -CH ₃	Poly(3-hydroxyvalerate)	P(3HV)
-(CH ₂) ₂ -CH ₃	Poly(3-hydroxyhexanoate)	P(3HH)
-(CH ₂) ₄ -CH ₃	Poly(3-hydroxyoctanoate)	P(3HO)
-(CH ₂) ₆ -CH ₃	Poly(3-hydroxydecanoate)	P(3HD)

Рисунок 1. Общая структура ПГА и примеры структурных производных.

Также существуют различия, связанные с чистотой этих двух классов. Например, в случае экстракции растворителем ацетоном чистота MCL ПГА составляет от 80% до 90%, а степень извлечения - от 60% до 80%. В случае с SCL ПГА чистота и степень извлечения значительно выше – 98,4% и 96,8% соответственно [29].

1.4 Свойства ПГА

Полигидроксиалканоаты - термопластичные полимеры, синтезируемые микроорганизмами естественным путем, их свойства зависят от длины цепи и химического состава (гомополиэферы или сополиэферы) [30]. В естественных условиях при деградации этих полимеров различными микроорганизмами в аэробных условиях образуется углекислый газ и вода. Анаэробная деградация, приводит к выделению углекислого газа и метана.

К общим характеристикам ПГА относятся биосовместимость, полная биоразлагаемость, высокая технологичность, нетоксичность и структурное разнообразие [31]. Кроме того, искусственная модификация П(ЗГБ) путем добавления других веществ, таких как полипропилен (ПП), может быть полезна для сохранения некоторых свойств материала, таких как влагостойкость и ароматический барьер. Основываясь на этих свойствах, управление по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) одобрило использование этих полиэферов в качестве биоматериалов для резорбируемых швов, скаффолдов для тканевой инженерии, заменителей костных имплантатов и сердечно-сосудистых устройств [32]. Кроме того, ПГА используются для изготовления повязок и устройств для переноса лекарств в виде нано- и микросфер для контроля высвобождения лекарств. Также сообщается об использовании этих полимеров в качестве упаковочного и покрывного материала [33].

Биополимерные ПГА обладают различными свойствами, такими как высокая прочность на разрыв (30-35 МПа) и высокая температура плавления (175 °С), которые схожи со свойствами полимеров, состоящих из побочных продуктов нефтепереработки, таких как полипропилен. Поскольку ПГА являются частично кристаллическими, тепловые свойства аморфной фазы этих полимеров изучаются как температура стеклования ($T_{стекл}$). Однако тепловые свойства кристаллической фазы описываются с точки зрения температуры плавления ($T_{пл}$) [34].

Температура плавления ПГА прямо пропорциональна количеству атомов углерода в боковой цепи полимера. Напротив, температура стеклования обратно

пропорциональна длине боковой цепи. Кроме того, сообщалось, что увеличение числа атомов углерода от C4 до C7 в боковой цепи приводит к увеличению его температуры плавления на 24 °С (45 °С – 69 °С). Однако, в отличие от температуры плавления, снижение температуры стеклования наблюдалось при увеличении числа атомов углерода в боковой цепи (от 1 до 7) [35].

SCL-ПГА имеют более низкое значение $T_{\text{стекл}}$, чем MCL-ПГА, что дополнительно способствует повышению кристалличности и хрупкости SCL-ПГА. Например, SCL-ПГА, такие как П(ЗГБ), имеют температуру стеклования 4 °С и температуру плавления 180 °С и являются высококристаллическими, жесткими и хрупкими. SCL-ПГА имеют сферолитовые домены, которые являются основной причиной их хрупкости.

С другой стороны, MCL-ПГА имеют значение $T_{\text{стекл}}$ между - 25 °С и - 65 °С и $T_{\text{пл}}$ в диапазоне от 42 °С до 75 °С [36]. Эти ПГА менее кристаллически, чем SCL-ПГА, из-за нерегулярных боковых групп в MCL-ПГА, которые препятствуют плотной упаковке полимеров.

Температура стеклования и кристаллическая структура отвечают за эластомерные свойства этих полимеров. Среди всех синтезированных микроорганизмами биополимеров, только MCL-ПГА обладают свойствами, схожими с термопластичными эластомерами [34]. Однако эти полимеры проявляют эластомерное поведение в узком температурном диапазоне из-за низкой температуры плавления. При температуре выше $T_{\text{пл}}$ термопластичные полимеры становятся текучими и легко поддаются формованию, превращаясь в полностью аморфный материал [37]. Кроме того, наблюдалось снижение $T_{\text{стекл}}$ MCL-ПГА с увеличением средней длины боковой цепи. Эта особенность объясняется увеличением подвижности полимерных цепей.

Термические свойства ПГА также зависят от субстрата, используемого для их синтеза [38]. Например, MCL-ПГА, полученные *P. putida* с использованием кокосового масла в качестве субстрата, продемонстрировали $T_{\text{стекл}}$ - 43,7 °С. В

отличие от этого, когда тот же штамм использовался для получения ПГА с использованием льняного масла, наблюдалось снижение на 18 °С, в результате чего Тстекл составила - 61,7 °С.

Механические свойства ПГА варьируются в зависимости от длины полимерной цепи. Такие свойства, как удлинение при разрыве и прочность на разрыв значительно различаются между MCL-ПГА и SCL-ПГА [35]. MCL-ПГА демонстрируют более высокую гибкость и эластичность, чем SCL-ПГА, они в свою очередь являются хрупкими и высококристаллическими [39].

Однако эти свойства не универсальны, и имеются некоторые исключения. Например, П(3ГБ) имеет значение модуля Юнга 3,5 ГПа и предел прочности 40 МПа, а соответствующее значение П(4ГБ) составляет 0,15 ГПа и 104 МПа. Аналогично, удлинение при разрыве П(3ГБ) и П(4ГБ) наблюдались как 3% и 1000% соответственно [40]. Существенная разница между этими двумя полимерами это положение R-группы в их боковых цепях, которое изменяет их 3D полимерную структуру и механические свойства [41].

Кроме того, гибкость ПГА можно улучшить, смешивая другие мономеры и полимеры в разных соотношениях с этими биополимерами для различных биомедицинских и промышленных применений [42]. Например, механические свойства П(3ГБ), такие как твердость, жесткость и гибкость существенно отличаются от сополимера П(3ГБ-со-3ГГ). Эти свойства зависят значительно от мономера 3ГГ. Сообщалось, что сополимер, содержащий 5,9% мол. 3ГГ имеет самое высокое значение гибкости (удлинение при разрыве 163%). Аналогично, при содержании 3ГГ 2,5 мол.%, было получено наибольшее значение как предела прочности при растяжении (25,7 МПа), так и модуля Юнга (631,3 МПа) [43].

Тип и размер боковой цепи ПГА определяют кристалличность биополимеров. Увеличение длины боковых цепей (MCL) может препятствовать кристаллизации. Таким образом, степень кристалличности SCL и MCL-ПГА существенно различается. Кристаллические свойства MCL по имеющимся данным, ниже, чем у SCL. SCL ПГА имеют кристалличность, которая варьируется от 60 до 80 % [44].

Однако, скорость кристаллизации в этих полимерах относительно низкая по сравнению с синтетическими полимерами [45].

Кроме того, хрупкость и жесткость П(ЗГБ) также увеличиваются из-за высокой скорости кристаллизации. Для уменьшения хрупкости в П(ЗГБ) был включен в состав мономер ЗГВ [45]. Аналогично, другие мономеры могут также быть добавлены для снижения кристалличности полимера. Сополимеры с низкой кристалличностью также могут быть получены путем добавления менее кристалличных и более разлагаемых полимеров.

1.5 Свойства ПГА, состоящего из разных мономеров

Термические и физико-химические свойства ПГА можно регулировать, варьируя виды и составы мономеров, входящих в состав ПГА, а на другие факторы, влияющие на свойства материала ПГА, такие как случайность состава мономеров, молекулярная масса и полидисперсность, влияют синтаза, которая полимеризует гидроксиацил-СоА в соответствующие полимеры, характеристики используемого продуцента, субстраты для синтеза ПГА, условия ферментации [46]. Среди ПГА, идентифицированных до сих пор, полимеры SCL-ПГА, имеющие ЗГБ в качестве основного мономера цепи, такие как П(ЗГБ), поли(3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксивалерат) [П(ЗГБ-*co*-ЗГВ)], поли(3-гидроксибутират-*ко*-3-гидроксипропионат) [П(ЗГБ-*co*-ЗГП)] и поли(3-гидроксибутират-*ко*-4-гидроксибутират) [П(ЗГБ-*co*-4ГБ)] обладают высокой кристалличностью (60–80%), термической стабильностью, жесткостью и хрупкостью в зависимости от мономерного состава и мольной доли мономера в сополимере. MCL-ПГА, состоящие в основном из 3-гидроксигексаноата и 3-гидроксиоктаноата, демонстрируют низкую кристалличность около 25 %, низкую Тпл и высокое удлинение при разрыве, прочность на разрыв и эластомерные свойства.

П(ЗГБ) представляет собой термопласт с высокой кристалличностью, аналогичный пластику на основе ископаемого топлива, полипропилену, который

обладает превосходными газобарьерными свойствами [47]. Он обладает высокой хрупкостью и жесткостью, а также низким удлинением при разрыве. Поскольку высокая температура $T_{пл}$ немного ниже, чем $T_{дегр}$ это ограничивает переработку П(ЗГБ), сополимеризация ЗГБ с другими мономерами, такими как ЗГВ, ЗГП и 4ГБ, широко изучалась с целью изменения свойств материала сополимеров на основе П(ЗГБ). Наиболее охарактеризованный сополимер П(ЗГБ-*co*-ЗГВ) имеет более низкую $T_{пл}$ и кристалличность, повышенное удлинение при разрыве (E), а также пониженную жесткость и модуль Юнга (YM) по сравнению с П(ЗГБ), в котором высокая молярная концентрация фракции ЗГВ уменьшает термические свойства и длину цепи П(ЗГБ-*co*-ЗГВ), что приводит к более низкой кристалличности и более высокой гибкости, ударной вязкости и удлинению при разрыве, что в свою очередь приводит к расширению диапазона обработки. В конечном итоге П(ЗГБ-*co*-ЗГВ) обладает улучшенной гибкостью и пластичностью по сравнению с П(ЗГБ) [48, 49, 50, 51].

Помимо ЗГВ, включение в ПГА ω -гидроксиалканоатов, структурно подобных мономерных звеньев, таких как ЗГП, 4ГБ, 4-гидроксивалерат (4ГВ), повышает эластичность. По мере увеличения мольной доли 4ГБ удлинение при разрыве и прочность на разрыв увеличиваются, а ударная вязкость снижается. П(ЗГБ-*co*-4ГБ), содержащий мономер 4ГБ в доле 20–35 %, является эластомером. В зависимости от мольной доли 4ГБ он обладает различными механическими свойствами от высококристаллических пластиков до эластомерных каучуков и полезен в фармацевтических областях [52, 53, 54].

Однако П(ЗГБ-*co*-4ГБ) все еще занимает очень малую долю на рынке из-за высокой цены. Поиск или разработка сверхвысокопроизводительных бактериальных штаммов, использующих недорогое сырье, все еще являются ответом на эту проблему. Группа Chen et al., разработала инженерный штамм *Halomonas bluephagenesis* TD01 с оптимизацией генома для производства П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с урожаем биомассы 80 г/л. П(ЗГБ-*co*-4ГБ), полученный с помощью данного штамма бактерий, обладает высокой эластичностью [55]. Впоследствии группа Chen et al., сконструировала галофильный фаг TD01 с четырьмя генами, которые

могут кодировать сукцинат-гемиальдегид дегидрогеназу, 2-окси-глутарат декарбоксилазу, 4-гидроксибутират коэнзим А (КоА) трансферазу и 4-гидроксибутират дегидрогеназу. Они обнаружили, что если единственным источником углерода является глюкоза, то при кодировании с помощью сукцинат-семиальдегид дегидрогеназы гена *GabD* можно получить образцы с повышенным содержанием 4ГВ. Этот метод позволяет избежать добавления дорогостоящего и токсичного γ -бутиролактона, что может существенно снизить стоимость производства ПГА [56].

Gorenflo et al., (2001) изучали способность разных штаммов *Pseudomonas putida* и *Cupriavidus necator* к накоплению сополимеров с 4ГВ. Было установлено, что при использовании леулиновой кислоты (1,2 масс/об) в качестве единственного источника углерода, наибольшее включение 4ГВ показал штамм *Pseudomonas putida* GPp104 (pHP1014::E156) – П(3ГВ-со-69,2 мол.% 3ГВ-со-30 мол.% 4ГВ). *P. putida* KT2440 показал способность к включению различных мономеров, помимо 3ГВ в составе полимера обнаружили: 3ГВ – 22,7 мол.%, 4ГВ – 0,8 мол.%, 3ГГ – 10,7 мол.%, 3ГО – 23,2 мол.%, 3ГД – 36,4 мол.%, 3ГДД – 3 мол.%.

Помимо этого проводили эксперимент с *Pseudomonas putida* GPp104 (pHP1014::B28RV), который ферментировали с глюконовой кислотой (0,5 масс/об) в качестве источника углерода. Через 24 ч культивирования вносили прекурсоры: леулиновую кислоту (0,3 масс/об) либо смесь леулиновой кислоты (0,3 масс/об) и глюкозы (0,3 масс/об). В первом случае был получен сополимер П(3ГВ-со-64,7 мол.%3ГВ-со-32 мол.%4ГВ), во втором случае включение 4ГВ уменьшилось до 27,8 мол.% - П(3ГВ-со-70,6 мол.%3ГВ-со-27,8 мол.%4ГВ) [57].

В 2018 году в исследовании Der-Shyan Sheu et al., в качестве источника углерода использовали леулиновую кислоту (8 г/л), объектом исследования выступил штамм *Cupriavidus* sp. L7L. В составе полимера были обнаружены 3ГВ, 3ГВ и 4ГВ в небольшом количестве (2,1-4,8 мол.%). В результате культивирования *Cupriavidus* sp. L7L в колбах объемом 250 мл был получен урожай

биомассы 15,8 г/л с содержанием ПГА 81% - П(3ГБ-со-33,7 мол.%3ГВ-со-2,1 мол.%4ГВ). Исследование свойств показало следующее: Tпл 92 °С, удлинение при разрыве 630%. Результаты сравнивали с сополимером П(3ГБ-со-35,9 мол.%3ГВ), который не содержал 4ГВ. Tпл этого полимера составляла 84,6 °С и удлинение при разрыве 462%. Ученые сделали вывод о том, что включение в состав полимера 4ГВ делает готовый материал более привлекательным из-за лучших термических и механических свойств [58].

1.6 Свойства многокомпонентных ПГА

Имеется несколько сообщений о получении терполимеров П(3ГБ- со -3ГВ- со -4ГВ) с использованием различных микроорганизмов. *Cupriavidus necator* (ранее *Alcaligenes eutropus*, *Ralstonia eutrofa* и *Wautersia eutrofa*) способен к производству терполимеров при культивировании на γ -бутиролактоне и пропионате; было обнаружено, что пропионат служит не только предшественником 3ГВ, но также увеличивает эффективность включения 4ГВ в цепь [59]. Аналогичным образом, Cavalheiro et al., получили П(3ГБ- со -3ГВ- со -4ГВ) с помощью *Cupriavidus necator*, используя сырой глицерин в качестве основного источника углерода, γ -бутиролактон и пропионат [60]. Кроме того, *Haloferax mediterranei* может быть использован для производства терполиэфира поли(3ГБ- со -3ГВ- со -4ГВ) без необходимости использования специфического предшественника 3ГВ, что основано на необычном метаболизме этого микроорганизма, поскольку он способен к производству 3ГВ из структурно несвязанных источников углерода, таких как сахара или глицерин [61]. Ramachandran et al., использовали *Cupriavidus sp.* USMAA2-4 (теперь названный как *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379) для производства терполимеров из олеиновой кислоты и различных предшественников 4ГВ и 3ГВ [62].

Судя по результатам, *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 может эффективно синтезировать желаемый терполимер П(3ГБ- со -3ГВ- со -4ГВ), при этом

содержание ПГА в бактериальных клетках существенно выше при использовании стратегии двухстадийного культивирования. Наибольшая массовая доля - 69,64 мас.%, а также наибольший прирост ПГА - 4,14 г/л достигнуты при использовании глицерина совместно с 1,4-бутандиолом на первой стадии и 1,4-бутандиола с валериановой кислотой на второй стадии. Хорошие результаты были достигнуты при использовании на второй стадии 1,4-бутандиола в сочетании с валериановой кислотой. Когда на первой стадии использовался только глицерин, был получен терполимер, состоящий из 53,78 мол.% ЗГБ, 16,76 мол.% 4ГБ и 29,46 мол.% ЗГВ. Используя глицерин вместе с 1,4-бутандиолом на первой стадии, впоследствии был получен терполимер, состоящий из ЗГБ 65,68 мол.%, 4ГБ 16,46 мол.% и ЗГВ 17,86 мол.%. Комбинация глицерина и 1,4-бутандиола на первом этапе культивирования и 1,4-бутандиола и валериановой кислоты на втором этапе культивирования является многообещающей стратегией, которая приводит к высоким значениям ПГА в клетках, а также высокой доли 4ГБ и ЗГВ в структуре терполимера [63].

Поли(3-гидроксibuтират-4-гидроксibuтират-3-гидроксивалерат) с низким содержанием 3-гидроксивалерата (ЗГВ) (1,7–6,4%) с молярными долями 4-гидроксibuтирата (4ГБ) от 1,8% до 35,6% был получен при периодическом культивировании *Cupriavidus necator* DSM545 с подпиткой. Отходы глицерина, γ -бутиролактона и пропионовой кислоты использовались в качестве основного источника углерода и предшественников 4ГБ и ЗГВ соответственно.

Были проведены испытания на одноосное растяжение соответствующих биополимеров. Модуль Юнга и прочность на разрыв П(ЗГБ- со -ЗГВ- со -4ГБ) уменьшались, тогда как удлинение при разрыве увеличивалось с увеличением мольного % 4ГБ, следуя общей тенденции, описанной для (П(ЗГБ- 4ГБ)), но с выраженной меньшей эластичностью. Результаты дифференциальной сканирующей калориметрии показывают, что температура кристаллизации и энтальпия плавления уменьшаются с увеличением содержания 4ГБ. В терполимерах, содержащих более 30% гетеромономеров (4ГБ и ЗГВ), кристаллизации не наблюдалось, хотя были обнаружено плавление [64].

Степень кристалличности определяется строением полимера и мономерным составом. Согласно предыдущим сообщениям (Nakamura et al., 1994), мономер 4ГБ не сокристаллизуется внутри решетки П(3ГБ), поскольку он обладает более длинной основной цепью, чем у 3ГБ. Кроме того, предыдущие исследования показали, что препятствия между метильной (или этильной) боковой цепью мономера 3ГБ (или 3ГВ) и соседней карбонильной группой мономера 4ГБ объясняют невозможность совместной кристаллизации между 4ГБ и 3ГБ или 3ГВ [65]. С другой стороны, мономеры 3ГВ могут в определенной степени внедряться в решетку П(3ГБ), действуя как дефекты цепи. Поэтому считается, что аморфная фаза терполимера, содержащая большую часть звеньев 4ГБ и небольшую часть мономеров 3ГБ, снижает общую кристалличность терполимеров П(3ГБ-4ГБ-3ГВ) по сравнению с кристалличностью П(3ГБ-3ГВ). В целом, присутствие мономеров 3ГВ и 4ГБ в терполимере ПГА оказывает согласованное влияние как на термические, так и на механические свойства [66].

Еще одним из привлекательных ПГА является П(3 ГБ- *co* -3 ГВ- *co* -4 ГВ). ПГА, содержащие 3- и 4 ГВ, обладают более высокой гибкостью, более низкими температурами плавления и меньшей кристалличностью. Кроме того, такие полимеры более склонны к биодegradации *in vivo* из-за наличия аморфных доменов, причем средняя площадь пор уменьшается, а количество увеличивается с увеличением 3- и 4-х мономеров ГВ в полимере [67, 68] .

В исследовании М.В.Т. Cavalleiro были получены высокие мольные доли П(39 мол.% 3ГБ- *co* -17 мол.% 3 ГВ- *co* -44 мол.% 4 ГВ) и П (25 мол.% 3ГБ- *co* -75 мол.% 5 ГВ) из 4-гидроксивалериановой кислоты и 5-гидроксивалериановой кислоты с использованием *Cupriavidus necator* РНВ -4 , содержащего ген *phaC* ВР-М-СРФ4 с модифицированными последовательностями. Кроме того, была проверена комплексная токсичность смесей предшественников и подтверждено, что сконструированный *S. necator* способен синтезировать П (32 мол.% 3ГБ- *co* -11 мол.% 3 ГВ- *co* -25 мол.% 4 ГВ- *co* -32 мол.% 5 ГВ) при низких концентрациях смеси. Корреляционный анализ соотношения предшественников и мольных долей мономеров показал, что каждую мольную долю можно точно

контролировать с использованием доли предшественника. Анализ физических свойств подтвердил, что П(ЗГБ- *co* -3 ГВ- *co* -4 ГВ) представляет собой резино-подобный аморфный полимер, а П(ЗГБ- *co* -5 ГВ) имеет высокую прочность на разрыв и удлинение при разрыве. П(ЗГБ- *co* -3 ГВ- *co* -4 ГВ- *co* -5 ГВ) имел низкую температуру стеклования [69].

Таким образом, адаптация терполимера для воспроизводимого соответствия заранее заданным свойствам является более сложной задачей, чем просто стремление к конкретному среднему мономерному составу. Продукт клеточного экстрагирования представляет собой смесь полимерных цепей, широко варьирующих по составу. Такое гетерогенное распределение мономеров приводит к сложному термическому и механическому поведению. Фактически, терполимеры с одинаковым средним мономерным составом могут проявлять разные свойства.

2 Материалы и методы

2.1 Культивирование и условия роста бактерий

В работе использовали штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus necator* B-10646. Бактерии выращивали в жидкой солевой среде Шлегеля следующего состава (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 9,0, KH_2PO_4 - 1,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \times \text{H}_2\text{O}$ - 5. В качестве источника азота использовали NH_4Cl в концентрации 1 г/л. Микроэлементы добавляли по прописи Хоагланда (3 мл/1 л среды). Раствор содержал следующие вещества (г/л): H_3BO_3 - 0,288; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,176; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,03; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,008; NiCl_2 - 0,008; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,008.

Инокулят бактериальной культуры получали в результате ресуспендирования музейной культуры, хранящейся на агаризованном минеральном агаре. Культивирование проводили в стеклянных конических колбах объемом 500 мл, содержащих 200 мл среды. В качестве основного источника углерода использовали фруктозу с начальной концентрацией 12-15 г/л. Культивирование бактерий осуществляли в термостатируемом шейкере-инкубаторе «Incubator Shaker Innova®» серии 44 при 30°C и 200 об/мин. Продолжительность культивирования для получения инокулята составляла 18-20 ч.

Культивирование бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 проводили в стеклянных колбах объемом 0,5 л. В колбы добавляли 200 мл фосфатного буфера и 20 мл инокулята. Для процесса ферментации использовали термостатируемый шейкер-инкубатор «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США), культивирование проводили при 30 °C и 200 об/мин. Время культивирования составляло 72 ч.

В качестве предшественников использовали валериановую кислоту, левулиновую кислоту, 4-хлормасляную кислоту, ε-капролактон и γ-валеролактон, добавляемых в зависимости от эксперимента в различное время (0, 24, 48 ч) в концентрации 1-2 г/л. Длительность культивирования составляла 72 ч.

2.2 Определение оптической плотности

Измерение оптической плотности культуры бактерий проводили с использованием спектрофотометра UNICO-2100 при $\lambda=440$ нм (длина оптического пути 1 мм), предварительно разбавляя культуру дистиллированной водой в соотношении 1:5.

2.3 Определение концентрации фруктозы

Для определения концентрации фруктозы использовали резорциновый метод. Для этого 2 мл бактериальной культуры центрифугировали (Centrifuge 5417 R, «Eppendorf», Германия) и надосадочную жидкость разводили дистиллированной водой в соотношении 1:50. В стеклянную пробирку добавляли 1 мл пробы, 1 мл спиртового раствора резорцина (0,5 г резорцина растворяли в 1 л 96%-го этанола) и 3 мл 80 %-го раствора HCl. В качестве контроля в пробирку вместо приготовленной пробы добавляли дистиллированную воду и остальные компоненты смеси. Пробирки нагревали в течение 20 минут на водяной бане при температуре 80 °С и затем охлаждали до комнатной температуры. Оптическую плотность проб измеряли при длине волны 540 нм (длина оптического пути 5 мм). Использовали калибровочный график для расчета концентрации фруктозы.

2.4 Определение концентрации биомассы бактерий

Для определения концентрации биомассы 25 мл культуры бактерий центрифугировали в течение 10 мин при 6000 об/мин (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия). Осадок дважды промывали дистиллированной водой и далее переносили во взвешенные стеклянные бюксы. Биомассу высушивали в сушильном шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) в течение 24 ч

при температуре 105 °С. Бюксы охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах Adventurer, «OHAUS», США. Биомассу бактерий рассчитывали как разницу между весом бюкса с биомассой и его исходным весом.

2.5 Экстракция полимера

Экстракцию полимера проводили из клеток бактерий после центрифугирования бактериальной культуры в течение 10 мин при 6000 об/мин (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия). К биомассе, помещенной в стеклянную колбу, добавляли 96 %-й этанол и хлороформ в соотношении 1:2. Колбу помещали в термостат на 24 ч при температуре 30 °С. Далее раствор пропускали через бумажный фильтр для отделения биомассы бактерий. Растворители удаляли на вакуумном роторном испарителе Rotavapor R-210 (BUCHI). Для осаждения полимера к раствору добавляли гексан в двойном объеме.

2.6 Определение содержания полимера

Содержание полимера в биомассе определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890А с масс детектором Agilent Technologies 5975С («Agilent», США). Для получения метиловых эфиров жирных кислот к 3,9-4,5 мг высушенной биомассы добавляли в качестве внутреннего стандарта 1 мл раствора бензойной кислоты в хлороформе (500 мг/1 л), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Полученную смесь нагревали на водяной бане с использованием обратных холодильников при температуре 80 °С в течение 160 мин. По окончании метанолиза к пробе добавляли 1 мл дистиллированной воды оставляли в холодильнике для расслоения фаз на 24 ч. Хроматографирование проходило при следующих условиях: газом-носителем был гелий, скорость потока 1,2 мл/мин.. Температура ввода пробы – 220 °С; начальная тем-

пература 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. Идентификацию мономеров образующих ПГА, проводили по масс-спектрам и временам удерживания.

2.7 Определение молекулярных характеристик полимера

Для определения молекулярной массы синтезированных полимеров использовали гелипроникающую хроматографию (Agilent Technologies 1260 Infinity, США). В качестве стандартов использовали полистиролы различной молекулярной массы (Fluka, Швейцария, Германия). Определена среднечисловая (M_n) и средневесовая (M_w) молекулярные массы, полидисперсность (D).

2.8 Измерение температуры плавления

Термический анализ ПГА осуществляли с использованием дифференциального сканирующего калориметра ДСК-1 и термогравиметрического анализатора ТГА (Mettler Toledo, Германия). Образцы ПГА в виде порошка весом $4,0 \pm 0,2$ мг помещали в алюминиевые тигли и подвергали нагреву со скоростью 5 °С/мин до температуры 200 °С. Затем образцы охлаждали до -20 °С, выдерживали в течение 20 минут и снова нагревали до 320 °С. Температуры стеклования, кристаллизации, плавления и термической деградации определяли по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE».

2.9 Измерение степени кристалличности

Рентгеноструктурный анализ и определение степени кристалличности ПГА выполняли на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE “Bruker”, Германия (графитовый монохроматор на отраженном пучке). Регистрацию проводили в пошаговом режиме с шагом $0,04^\circ$ и двухсекундной выдержкой для измерения

интенсивности в точке (режим работы прибора 40 кВ × 40 мкА). Степень кристалличности рассчитывали с помощью программного обеспечения Bruker AXS TOPAS v.4.2 (Germany).

3 Результаты

С 28 по 49 страницы были изъяты в связи с авторскими правами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Использование в качестве предшественников валериановой кислоты, ϵ -капролактона и γ -валеролактона, добавляемых в различных режимах культивирования, позволило получить четырехкомпонентные полимеры с содержанием ЗГВ, 4ГБ и 4ГВ, соответственно 4,6-21,0, 1,4-4, и 0,3-0,7 мол.%.

2. Замена ϵ -капролактона на 4-хлормасляную кислоту привело к увеличению содержания 4ГБ до 13,4 мол.%, однако доля ЗГВ и 4ГВ была невысокой, соответственно 11,5 и 0,4 мол.%.

3. Выращивание бактерий в присутствии леулиновой и 4-хлормасляной кислоты сопровождалось значительным увеличением доли ЗГВ (до 49,8-74,9 мол.%), а также 4ГВ (до 2,0-3,5 мол.%), однако содержание 4ГБ в полимере не превышало 4,4-6,0 мол.%. Замена 4-хлормасляной кислоты на ϵ -капролактон привело к увеличению 4ГБ до 10,4-17,5 мол.% при сохранении высоких значений ЗГВ.

4. Установлено отсутствие четкой закономерности между показателями средневесовой молекулярной массы и соотношением мономеров. Показано снижение температуры стеклования с увеличением суммарного содержания мономеров ЗГВ, 4ГБ и 4ГВ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

3ГБ	3-гидроксибутират
3ГВ	3-гидроксивалерат
4ГБ	4-гидроксибутират
4ГВ	4-гидроксивалерат
Мв	Средневесовая молекулярная масса
Мч	Среднечисловая молекулярная масса
Нпл	Энтальпия
ПЗГБ	Поли-3-гидроксибутират
П4ГБ	Поли-4-гидроксибутират
ПГА	Полигидроксиалканоаты
П(3ГБ-со-4ГБ)	Поли(3-гидроксибутират-со-4-гидроксибутират)
П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГБ)	Поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат-со-4-гидроксибутират)
П(3ГБ-со-4ГБ-со-4ГВ)	Поли(3-гидроксибутират-со-4-гидроксибутират-со-4-гидроксивалерат)
П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГБ-со-4ГВ)	Поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат-со-4-гидроксибутират-со-4-гидроксивалерат)
Тдегр	Температура деградации
Ткрисст	Температура кристаллизации
Тстекл	Температура стеклования
Тпл	Температура плавления

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Виноградова, О. Н. Биосинтез и свойства ПГА, содержащих мономеры 3-гидрокси-4-метилвалерата / О. Н. Виноградова, Т. Г. Волова ; Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – Красноярск : СФУ, 2016. – 145-152 с.
2. Волова, Т. Г. Разрушаемые микробные полигидроксиалканоаты в качестве технического аналога неразрушаемых полиолефинов / Т. Г. Волова ; Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – Красноярск : СФУ, 2015. – 131-151 с.
3. Yadav, B. Bioconversion of waste (water)/ residues to bioplastics-A circular bioeconomy approach / B.Yadav, A.Pandey, L.R.Kumar, R.D.Tyagi // Bioresour. Technology. – 2020. – С.298.
4. Koller, M. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner / L.Maršálek, M.M. de Sousa Dias, & G.Braunegg // New biotechnology. – 2017. Т. 37,. – С. 24-38.
5. Kourmentza, C. et al. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production // Bioengineering (Basel). – 2017. Т. 4. – №. 2. – С. 55.
6. Sedlacek, P. What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments / E.Slaninova, V.Enev, M.Koller, J.Nebesarova, I.Marova, K.Hrubanova, V.Krzyzanek, O.Samek, S.Obruca // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2019, – С. 103
7. Koller, M. Chemical and biochemical engineering approaches in manufacturing polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters of tailored structure with focus on the diversity of building blocks. Chem. Biochem. Eng. Q. 2018, 32, 413–438.
8. Lee, W.H. Effects of culture conditions on the composition of poly(3- hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by Comamonas acidovorans / M.N.M.Azizan, K.Sudesh // Polym Degrad Stab. – 2004, Т. 84, – С. 129–134.

9. Singh, A.K. Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. / Srivastava, J.K.; Chandel, A.K.; Sharma, L.; Mallick, N.; Singh, S.P. // *Microbiol. Biotechnol.* – 2019, T. 103, – C. 2007–2032.
10. Yang, X.S. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates / Zhao, K., Chen, G.Q. // *Biomaterials* 23, – 2002. – C/ 1391– 1397.
11. Talan, A. Bioconversion of oily waste to polyhydroxyalkanoates: sustainable technology with circular bioeconomy approach and multidimensional impacts / Kaur, R., Tyagi, R.D., Drogui, P. // *Bioresour. Technol. Rep.* – 2020/ – C. 11.
12. Talan, A. Biorefinery strategies for microbial bioplastics production: Sustainable pathway towards Circular Bioeconomy / Pokhrel, S., Tyagi, R.D., Drogui, P. // *Bioresour. Technol.* – 2022. – C. 17.
13. Sabapathy, P.C. Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production—A review / Devaraj, S., Meixner, K., Anburajan, P., Kathirvel, P., Ravikumar, Y., Zabed, H.M., Qi, X. // *Bioresour. Technol.* . – 2022. . – C. 306/
14. Essel, R. Meta analysis of 30 LCAs. / Carus, M. // *Bio-Plast. Mag.* – 2012. T.7, – C.46–49.
15. Sirohi, R. Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). / Pandey, J.P., Gaur, V.K., Gnansounou, E., Sindhu, R. // *Bioresour. Technol.* – 2020. – C. 311/
16. Choi, J.I. Process analysis and economic evaluation for poly (3- hydroxybutyrate) production by fermentation. / Lee, S.Y. // *Bioprocess Eng.* – 1997. T.17 (6), – C.335–342.
17. Lhamo, P. Process optimization, metabolic engineering interventions and commercialization of microbial polyhydroxyalkanoates production—A state-of-the art review. / Behera, S.K., Mahanty, B. // *Biotechnol. J.* – 2021. T. 16 (9).
18. Novelli, L.D.D. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives. / Sayavedra, S.M., Rene, E.R. // *Bioresour. Technol.* – 2021. – C. 331.

19. Bhatia, S.K. Biowaste-to bioplastic (polyhydroxyalkanoates): Conversion technologies, strategies, challenges, and perspective. / Otari, S.V., Jeon, J.M., Gurav, R., Choi, Y.K., Bhatia, R.K., Pugazhendhi, A., Kumar, V., Banu, J.R., Yoon, J.J., Choi, K.Y., Yang, Y.H. // *Bioresour. Technol.* – 2021. – C. 326.
20. Tripathi, A.D. Production of polyhydroxyalkanoates using dairy processing waste—a review. / Paul, V., Agarwal, A., Sharma, R., Hashempour-Baltork, F., Rashidi, L., Darani, K.K. // *Bioresour. Technol.* – 2021. – C. 326.
21. Yin, F. Poly (3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) production from pretreated waste lignocellulosic hydrolysates and acetate cosubstrate. / Li, D., Ma, X., Li, J., Qiu, Y., // *Bioresour. Technol.* – 2020. – C.316.
22. Martinez V. Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery: the case of the polyhydroxyalkanoates. – 2022.
23. Doi Y. Microbial polyesters. New York: VCH; – 1990.
24. Chee J.Y. Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. // *Curr Res Technol Educ Topics Appl Microbiol Microb Biotechnol.* – 2010.
25. Loo CY, Polyhydroxyalkanoates SK. bio-based microbial plastics and their properties. // *Malay Polym J.* – 2007.
26. Sen, K. Y. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source / Hussin M. H., Baidurah S. // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* – 2019. – T. 17. – C. 51-59.
27. Volova, T. et al. A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus euthrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs // *PLoS One.* – 2014. – T. 9. – №. 2. – C.87-551.
28. Luef K. Poly (hydroxy alkanoate) s in medical applications. / Stelzer F, Wiesbrock F. // *ChemBiochemEngQ.* – 2015.
29. Tan G.Y. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review. / Chen C.L, Li L. // *Polymers* – 2014.

30. Muhammadi. Bacterial polyhydroxyalkanoateseco-friendly next generation plastic: production n, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. / Shabina, Afzal, M., Hameed, S. // *Green Chem. Lett. Rev.* – 2015. T.8 (3–4), – C.56–77.
31. Mokhtarzadeh, A. Recent advances on biocompatible and biodegradable nanoparticles as gene carriers. / Alibakhshi, A., Yaghoobi, H., Hashemi, M., Hejazi, M., Ramezani, M. // *Expet Opin. Biol. Ther.* – 2016. T.16 (6), – C.771–785.
32. Kalia, V.C. The dawn of novel biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates. / Ray, S., Patel, S.K., Singh, M., Singh, G.P. // In: *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Springer, Singapore, pp. – 2019. – C1–11.
33. Fabra, M.J. Improving the barrier properties of thermoplastic corn starch-based films containing bacterial cellulose nanowhiskers by means of PHA electrospun coatings of interest in food packaging. / Lopez-Rubio, ' A., Ambrosio-Martín, J., Lagaron, J.M // *Food Hydrocolloids* – 2016. T.61, – C.261–268.
34. Grigore, M.E. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. / Grigorescu, R.M., Iancu, L., Ion, R.M., Zaharia, C., Andrei, E.R. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* –2019.T.30 (9), – C.695–712.
35. Gopi, S. Manipulating the structure of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (MCL-PHA) to enhance thermal properties and crystallization kinetics. / Kontopoulou, M., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. T.119, - C.1248–1255.
36. Larranaga A., Lizundia, E.. A review on the thermomechanical properties and biodegradation behaviour of polyesters. *Eur. Polym. J.* - 2019. – C.121.
37. Wecker, P. Discovery of a mcl-PHA with unexpected biotechnical properties: the marine environment of French Polynesia as a source for PHA-producing bacteria. / Moppert, X., Simon-Colin, C., Costa, B., Berteaux-Lecellier, V. // *Amb. Express* – 2015. T.5 (1), – C.1–9.

- 38.Lorini, L. Downstream processing and characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) produced by mixed microbial culture (MMC) and organic urban waste as substrate. / Martinelli, A., Pavan, P., Majone, M., Valentino, F. // *Bio-mass Conversion and Biorefinery* – 2021. T.11, – C.693–703.
- 39.Anjum, A. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its co-polymers: a review of recent advancements. / Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2016. T.89, – C.161–174.
- 40.Meng, D.C. Synthetic biology of polyhydroxyalkanoates (PHA). / Chen, G.Q. // *Synthetic Biology–Metabolic Engineering* – 2017. – C.147–174.
- 41.Zhang, J. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. / Shishat-skaya, E.I., Volova, T.G., da Silva, L.F., Chen, G.Q. // *Mater. Sci. Eng.* – 2018. T.86, – C.144–150.
- 42.Raza, Z.A. Polyhydroxyalkanoates: properties and chemical modification approaches for their functionalization. / Riaz, S., Banat, I.M. // *Biotechnol. Prog.* – 2018. T.34 (1), – C.29–41.
- 43.Lim, J. Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds. / You, M., Li, J., Li, Z. // *Mater. Sci. Eng.* – 2017. T.79, – C.917–929.
- 44.Sanhueza, C. Polyhydroxyalkanoates as biomaterial for electrospun scaffolds. / Acevedo, F., Rocha, S., Villegas, P., Seeger, M., Navia, R // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. T.124, – C.102–110.
- 45.Tanadchangsaeng, N. Structure, chemomechanical properties and degradability of polyhydroxyalkanoates: a review. *Bulletin Health Sci. Technol.* – 2014. T.12, – C.9–21.
- 46.Sharma, V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and modifications. / Sehgal, R., Gupta, R. // *Polymer.* – 2021. T.212.
- 47.Penkhrue, W. Response surface method for polyhydroxybutyrate (PHB) bio-plastic accumulation in *Bacillus drentensis* BP17 using pineapple peel./ Jendrossek, D., Khanongnuch, C., Pathom-Aree, W., Aizawa, T., Behrens, R.L., Lumyong, S.// – 2020.

48. Choi, S.Y. Biosynthesis and characterization of poly (d-lactate-co-glycolate-co-4-hydroxybutyrate). / Chae, T.U., Shin, J., Im, J.A., Lee, S.Y. *Biotechnol. Bioeng.* // – 2020. T.117 (7) – C.2187–2197.
49. Chotchindakun, K. Low Crystallinity of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Bioproduction by Hot Spring Cyanobacterium *Cyanosarcina* sp. AARL T020. / Pathom-Aree, W., Dumri, K., Ruangsuriya, J., Pumas, C., Pekkoh, J. // *Plants.* – 2021. T.10 (3), – C.503.
50. Grigore, M.E. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates / , Grigorescu, R.M., Iancu, L., Ion, R.M., Zaharia, C., Andrei, E.R. // *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* – 2019. T.30 (9), – C.695–712.
51. Keskin, G. Potential of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymers family as substitutes of petroleum based polymers for packaging applications and solutions brought by their composites to form barrier materials. / Kızıllı, G., Bechelany, M., Pochat-Bohatier, C., Oner, M. *Pure Appl. Chem.* – 2017. T.89 (12), – C.1841–1848.
52. Kalia, V.C. Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications. / Patel, S.K.S., Shanmugam, R., Lee, J.K. // *Bioresour. Technol.* – 2021. – C.326.
53. Jo, M. The Modification of Poly (3- hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Melt Blending. / ., Jang, Y., Lee, E., Shin, S., Kang, H.J. // *Polymers* – 2022. T.14 (9), - C.1725.
54. Zhila, N. Properties of PHA bi-, ter-, and quarter-polymers containing 4-hydroxybutyrate monomer units. / Shishatskaya, E. // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. T.111, – C.1019–1026.
55. X. Chen. *Bioresour.* / J. Yin, J. Ye, H. Zhang, X. Che, Y. Ma, M. Li, L.-P. Wu, G.-Q. Chen // *Technol.* – 2017, T.244, – C.534.
56. O. K. Shittu. *Acute Dis.* / S. Y. Aaron, M. D. Oladuntoyee, B. Lawal, J. // – 2018. T.7, – C.36.
57. Gorenflo V. Development of a Process for the Biotechnological Large-Scale Production of 4- Hydroxyvalerate-Containing Polyesters and Characterization

- of Their Physical and Mechanical Properties / Schmack G., Vogel R., Steinbuechel, A. // *Biomacromolecules*. – 2001. – C.45-57.
58. Sheu, Der-Shyan et al., Cultivation temperature modulated the monomer composition and polymer properties of polyhydroxyalkanoate synthesized by *Cupriavidus* sp. L7L from levulinate as sole carbon source // *International journal of biological macromolecules*. – 2018. – T. 118. – C. 1558-1564
59. Lee, Y.H. Regulating the molar fraction of 4-hydroxybutyrate in poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate) biosynthesis by *Ralstonia eutropha* using propionate as a stimulator. / Kang, M.S.; Jung, Y.M. // *J. Biosci. Bioeng.* – 2000, T.89, – C.380.
60. Cavaleiro, J.M. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. / Raposo, R.S.; de Almeida, M.C.M.; Cesário, M.T.; Sevrin, C.; Grandfils, C.; Da Fonseca, M.M.R. // *Biores. Technol.* – 2012, T.111, – C.391.
61. Hermann-Krauss, C. Archaeal production of polyhydroxyalkanoate (PHA) co- and terpolyesters from biodiesel industry-derived by-products. / Koller, M.; Muhr, A.; Fasl, H.; Stelzer, F.; Braunegg, G. // *Archaea* – 2013.
62. Ramachandran, H. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate). Terpolymer with various monomer compositions by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4. / Iqbal, N.M.; Sipaut, C.S.; Abdullah, A.A.A. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2011, T.164, – C.867–877.
63. Kucera D. et al. Biotechnological production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) terpolymer by *Cupriavidus* sp. DSM 19379 // *Bioengineering*. – 2019. – T. 6. – №. 3. – C. 74.
64. Cavaleiro J. M. B. T. et al. On the heterogeneous composition of bacterial polyhydroxyalkanoate terpolymers // *Bioresource technology*. – 2013. – T. 147. – C. 434-441.

65. Kunioka, M. Crystalline and thermal properties of bacterial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). / Tamaki, A., Doi, Y. // *Macromolecules* 22, – 1989. – C.694–697
66. Madden, L.A. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures. / Anderson, A.J., Asrar, J., Berger, P., Garret, P. *Polymer* 41// – 2000. – C. 3499–3505.
67. N.O. Zhila. Biosynthesis and properties of a P(3HB-co-3HV-co-4HV) produced by *Cupriavidus necator* B-10646 / K.Y. Sapozhnikova, E.G. Kiselev, I.V. Nemtsev, A.V. Lukyanenko, E. I. Shishatskaya, T.G. Volova // *Polymers (Basel)* T.14 – 2022.
68. M. Koller, Polyhydroxyalkanoate biosynthesis at the edge of water activity in haloarchaea as biopolyester factories // *Bioengineering* 6 - 2019.
69. Oh S. J. et al. Controlled production of a polyhydroxyalkanoate (PHA) tetramer containing different mole fraction of 3-hydroxybutyrate (3HB), 3-hydroxyvalerate (3 HV), 4 HV and 5 HV units by engineered *Cupriavidus necator* // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2024. – T. 266.

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования

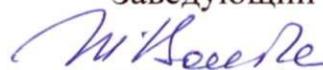
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт

Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

«24» июня 2024г

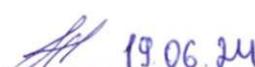
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Закономерности аккумуляции и свойства четырехкомпонентных
полигидроксиалканоатов, синтезированных природным штаммом

Cupriavidus necator B-10646

06.04.01 - Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	 подпись, дата	<u>к.б.н., доцент</u> должность, ученая степень	<u>Н. О. Жила</u> инициалы, фамилия
Выпускник	 подпись, дата	<u>19.06.24</u> дата	<u>Д. А. Гурбанова</u> инициалы, фамилия
Рецензент	 подпись, дата	<u>н.с., к.б.н.</u> должность, ученая степень	<u>А.В. Мурзев</u> инициалы, фамилия

Красноярск 2024