

Министерство науки и высшего образования РФ
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__2024г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Синтез сополимера поли(3-гидроксибутират-со-4-
гидроксибутират) бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 при использовании
4-хлормасляной кислоты
(тема)

Научный руководитель _____
Подпись, дата

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

Н. О. Жила
инициалы, фамилия

Выпускник _____
Подпись, дата

Ю.А. Пятикова
инициалы, фамилия

Красноярск 2024

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Синтез сополимера поли(3-гидроксибутират-*co*-4-гидроксибутират) бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 при использовании 4-хлормасляной кислоты» содержит 42 страницы текстового документа, 15 иллюстраций, 1 таблицу и 46 использованных источников.

Ключевые слова: ПГА, ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ПОЛИМЕР, 4-ХЛОРМАСЛЯНАЯ КИСЛОТА, 4-ГИДРОКСИБУТИРАТ, БИОСИНТЕЗ, *CUPRIVIDUS NECATOR*.

Целью данной работы является изучение способности культуры *Cupriavidus necator* В-10646 синтезировать сополимер поли(3-гидроксибутират-*co*-4-гидроксибутират) при использовании 4-хлормасляной кислоты в качестве предшественника мономеров 4-гидроксибутирата (4ГБ).

Для этого было необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать влияние различных концентраций 4-хлормасляной кислоты на накопление биомассы, полимера и включений 4ГБ бактериями *Cupriavidus necator* В-10646.
2. Исследовать влияние режима внесения 4-хлормасляной кислоты на накопление биомассы, полимера и включений 4ГБ бактериями *Cupriavidus necator* В-10646.
3. Исследовать физико-химические свойства полученных сополимеров с различным включением 4ГБ.

Актуальность: сегодня стоит острый вопрос о загрязнении окружающей среды неразлагаемыми пластиками. Альтернативой таким нефтехимическим пластикам являются полигидроксиалканоаты, получаемые биотехнологическим путём. Исследование новых предшественников для синтеза полигидроксиалканоатов позволяет получать полимеры с разнообразными свойствами за счет включения мономеров различной химической структуры, тем самым расширяя возможности их использования как альтернативу полимерам нефтехимической природы.

ОГЛАВЛЕНИЕ

РЕФЕРАТ.....	2
ОГЛАВЛЕНИЕ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.2 Продуценты ПГА	10
1.3. Биосинтез ПГА	11
1.3.1 Потенциальные источники углерода для синтеза ПГА	15
1.3.2 Предшественники для синтеза сополимера П(ЗГБ-со-4ГБ).....	15
1.4 Характеристика сополимера П(ЗГБ-со-4ГБ).....	17
1.5 Характеристика 4-хлормасляной кислоты, как предшественника синтеза мономеров 4-гидроксibuтирата.....	18
1.6 Применение ПГА	19
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	23
2.1 Культивирование и условия роста бактерий.....	23
2.2 Определение оптической плотности.....	23
2.3 Определение концентрации фруктозы в среде	24
2.4 Определение концентрации биомассы бактерий.....	24
2.5 Выделение полимера	25
2.6 Определение содержания полимера	25
2.7 Определение молекулярных характеристик полимера	26
2.8 Определение степени кристалличности	26
2.9 Определение температурных характеристик полимера	26
2.10 Статистическая обработка данных.....	26

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	28
3.1 Влияние различных концентраций 4-хлормасляной кислоты на накопление биомассы, полимера и включений 4ГБ у бактерий <i>C. necator</i> В-10646	28
3.2 Влияние режима внесения 4-хлормасляной кислоты на накопление биомассы, полимера и включений 4ГБ у бактерий <i>C. necator</i> В-10646	33
3.3 Физико-химические свойства полученных сополимеров с различным включением 4-гидроксibuтирата	35
ВЫВОДЫ.....	37
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	38
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	39

ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия загрязнение окружающей среды пластиком является одной из важнейших проблем современного мира. Это происходит ввиду неразлагаемости синтетических пластмасс, что смещает баланс углеродного цикла в природе.

Решением данной проблемы могут служить биополимеры, которые, в отличие от полимеров нефтехимической природы, способны к разложению в аэробных условиях до безопасных продуктов – углекислого газа и воды, и потому играют важную роль в концепции экономики замкнутого цикла. Одним из наиболее перспективных направлений в этой сфере является получение полимеров микробиологического происхождения. Полигидроксиалканоаты (ПГА) — это биополиэфиры, накапливаемые микроорганизмами в качестве внутриклеточного запасного материала, обладают следующими характеристиками: биоразлагаемостью и биосовместимостью. Один из многочисленных представителей этого класса полимеров – поли(3-гидроксибутират-*co*-4-гидроксибутират) П(ЗГБ-*co*-4ГБ) по сравнению с другим хорошо изученным полимером поли(3-гидроксибутиратом) П(ЗГБ) имеет более низкую степень кристалличности, что расширяет возможности его применения.

Для синтеза большинства сополимеров ПГА штаммом бактерий *Cupriavidus necator* B-10646 обязательным условием является наличие в питательной среде веществ-предшественников целевых мономеров, однако, многие из них ингибируют рост микроорганизмов, из-за чего концентрация биомассы клеток и выходы ПГА снижаются.

Эти негативные эффекты предшественников могут быть сведены к минимуму с использованием различных стратегий, в том числе режима добавления предшественника. В этой работе будет исследован режим дробного добавления предшественника 4-хлормасляной кислоты.

Целью данной работы является изучение способности культуры *Cupriavidus necator* B-10646 синтезировать сополимер поли(3-гидроксибутират-

со-4- гидроксibuтират) при использовании 4-хлормасляной кислоты в качестве предшественника мономеров 4-гидроксibuтирата.

Для этого было необходимо решить следующие задачи:

1. Исследовать влияние различных концентраций 4-хлормасляной кислоты на накопление биомассы, полимера и включений 4ГБ бактериями *Cupriavidus necator* В-10646.

2. Исследовать влияние режима внесения 4-хлормасляной кислоты на накопление биомассы, полимера и включений 4ГБ бактериями *Cupriavidus necator* В-10646.

3. Исследовать физико-химические свойства полученных сополимеров с различным включением 4ГБ.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика ПГА

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой класс микробных изотактических полиэфиров гидроксиалкановых кислот со средней молекулярной массой, варьирующейся от 50 000 Да до более миллиона, которые запасаются внутри клеток различных микроорганизмов в качестве источника углерода и энергии [1].

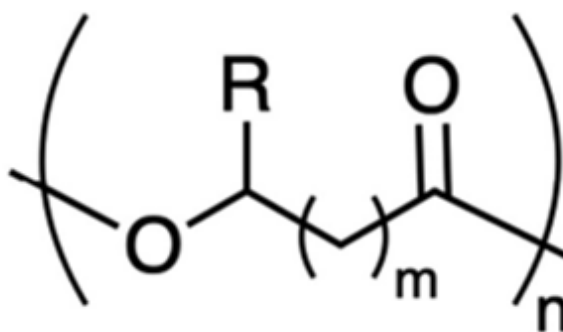


Рисунок 1 – Молекулярная структура ПГА

ПГА соответствуют классу полимерных материалов, которые демонстрируют исключительный потенциал для частичной замены полимеров на нефтехимической основе [2]. В настоящее время производство продуктов на основе ПГА в больших масштабах ограничена главным образом производственными затратами, которые относительно высоки по сравнению с традиционными полиэфирами. Многие микроорганизмы производят ПГА как резервуары для запасаения углерода и энергии. В производственных процессах часто используются сахара, включая глюкозу, фруктозу и ксилозу, стоимость которых составляют более 45% общих затрат на производство. В качестве альтернативы, применение отходов производств (например, рыбоперерабатывающих) или лигноцеллюлозной биомассы в качестве сырья

представляет собой перспективный подход к снижению затрат и повышению конкурентоспособности цены на рынке для ПГА-содержащих продуктов [3].

В зависимости от питательной среды, условий ферментации, видов и штаммов бактерий может быть синтезировано множество различных типов ПГА, заметно различающихся по длине их боковых цепей [4].

Начало технологической и научной разработки ПГА произошло с обнаружением растворимых в хлороформе соединений, накопленных в клетках *Bacillus subtilis* в виде липидных включений, а химический состав П(3ГБ) впервые был определен Лемуаном в 1927 г [5].

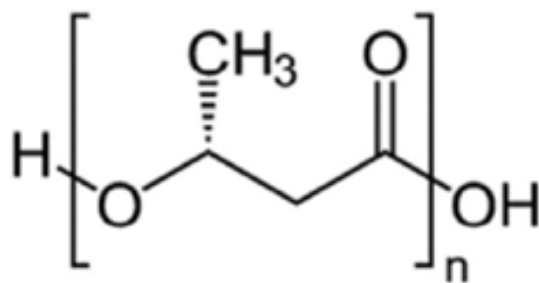


Рисунок 2 – Химическая структура поли(3-гидроксibuтирата) (ПЗГБ)

Биоразлагаемый и биосовместимый П(3ГБ) синтезируется и накапливается внутри микробных клеток в качестве источника углерода и энергии при неблагоприятных условиях. В отличие от большинства нефтехимических полимеров, его промышленное производство не приводит к образованию побочных продуктов, вредных для окружающей среды. Пленки на основе П(3ГБ) обладают хорошими газонепроницаемыми свойствами и рассматриваются как перспективные материалы для упаковки и биомедицинских приспособлений. Однако некоторые недостатки, такие как высокие производственные затраты, термическая нестабильность, близкая к температуре плавления (175–180 °С) и высокая степень кристалличности ограничивают его применение по сравнению с традиционными обычно используемыми промышленными полимерами [5].

Показатель кристалличности П(ЗГБ) колеблется в пределах 50-70%, что приводит к получению жесткого, достаточно хрупкого и трудно перерабатываемого полимера. Для успешного применения полимера прибегают к смешиванию П(ЗГБ) с другими макромолекулами для получения химически модифицированных сополимеров [6]. Включение в полимерную цепь 3-гидроксибутирата (ЗГБ) мономеров 4-гидроксибутирата (4ГБ) позволяет улучшить показатели термических и механических свойств полимеров [7].

Полигидроксиалканоаты обладают свойствами, схожими с традиционными синтетическими пластиками и рассматриваются в качестве их экологичной альтернативы. Постепенная замена неразлагаемых пластмасс экологически чистыми биоразлагаемыми материалами поможет сократить накопление пластиковых отходов в окружающей среде. ПГА накапливаются внутри клеток в виде гранул в качестве запасного вещества. Синтез ПГА инициируется условиями, ограничивающими количество питательных веществ (например, азота или фосфора), и избыточным поступлением источника углерода. Поли(3-гидроксибутират) является наиболее изученным типом ПГА; следовательно, он обычно используется в исследованиях, связанных с ПГА. ПГА разлагаются до углекислого газа и воды, которые не несут вред окружающей среде. Способность биополимеров к разложению зависит от микроорганизмов, имеющих в окружающей среде. Способность микроорганизмов разрушать ПГА в окружающей среде в основном зависит от секреции специфических внеклеточных деполимераз ПГА (гидролазы, вызывающие расщепление биологических полимеров) [8].

Исследования показали, что существует примерно 30 таких деполимераз с подтвержденной активностью. Чаще всего эти ферменты ассоциируются с бактериями родов *Cupriavidus*, *Alcaligenes*, *Comamonas* и *Pseudomonas*. Обнаружение этих бактерий указывает на широкое распространение ПГА-деполимераз в природе. Большинство из этих ферментов специфичны к ПГА с короткими цепями, например, к таким соединениям, как 3-гидроксибутират (ЗГБ), 3-гидроксивалерат (ЗГВ) и 4-гидроксибутират (4ГБ) [8].

Существует два типа деполимераз ПГА, которые могут быть классифицированы как внутриклеточные и внеклеточные, в зависимости от способа их реакции с субстратами [9]. Бактерии, секретирующие внеклеточные ПГА-деполимеразы гидролизуют ПГА в водорастворимые промежуточные продукты, которые затем используются бактериями в качестве источников углерода и энергии для их роста. В естественной среде гранулы ПГА, накапливающиеся в бактериях, высвобождаются в окружающую среду при лизисе клеток. Известно также, что некоторые бактерии, продуцирующие ПГА, гидролизуют ПГА (внутриклеточная деградация) в условиях нехватки углерода для выживания. Скорость биodeградации ПГА зависит от физических свойств полимера и от условий окружающей среды, таких как температура и pH, а также популяций микроорганизмов в данной среде [8].

1.2 Продуценты ПГА

Существует около 300 известных штаммов продуцентов полигидроксиалканоатов. Они включают как природные штаммы, так и генетически модифицированные, аэробные и анаэробные, хемоорганотрофные, хемолитоавтотрофные, фототрофные, археобактерии и др. [10, 11]. В промышленности используются только некоторые виды микроорганизмов. Это азотфиксирующие бактерии *Azotobacter vinelandii*, метилотрофы *Methylomonas* и *Methylobacterium organophilum*, а также хемолитоавтотрофы *Cupriavidus necator* [12].

Бактерии *Cupriavidus necator* способны производить большое количество поли(3-гидроксимасляной кислоты), или П(ЗГБ). В последние десятилетия *C. necator* занимает ключевую позицию в разработке новых биоматериалов, благодаря своей уникальной способности накапливать ПГА с высокой эффективностью и в разнообразных формах. Эта бактерия может производить как гомополимер П(ЗГБ), так и сополимеры, такие как поли(3-гидроксибутират-*co*-4-гидроксибутират) П(ЗГБ-*co*-4ГБ). Содержание включений 4-гидроксибутирата в сополимере П(ЗГБ-*co*-4ГБ) определяет его физические свойства: степень кристалличности, эластичность, температурные свойства и пр.

Сополимеры, с высоким содержанием 4ГБ являются эластомерами, что делает их перспективными заменителями традиционных пластиков, включая полиэтилен. [13].

1.3. Биосинтез ПГА

Путь биосинтеза П(ЗГБ) состоит из трех ферментативных реакций, катализируемых тремя различными ферментами (Рисунок 3). Первая реакция состоит из конденсации двух молекул ацетилкофермента А (ацетил-КоА) в ацетоацетил-КоА под действием β -кетоацил-КоА-тиолазы (кодируемой *phbA*). Вторая реакция представляет собой восстановление ацетоацетил-КоА до (R)-3-гидроксибутирил-КоА с помощью НАДФН-зависимой ацетоацетил-КоА-редуктазы (кодируемой *phbB*). Наконец, мономеры (R)-3-гидроксибутирил-КоА полимеризуются в поли(3-гидроксибутират) под действием полимеразы П(ЗГБ) (кодируемой *phbC*). Хотя накопление П(ЗГБ) является широко распространенной чертой прокариот, биохимические исследования ферментативных механизмов β -кетоацил-КоА-тиолазы, ацетоацетил-КоА-редуктазы и полимеразы П(ЗГБ) были сосредоточены только на двух природных продуцентах — *Zoogloea ramigera* и *Ralstonia eutropha* (ранее известная как *Alcaligenes eutrophus*).

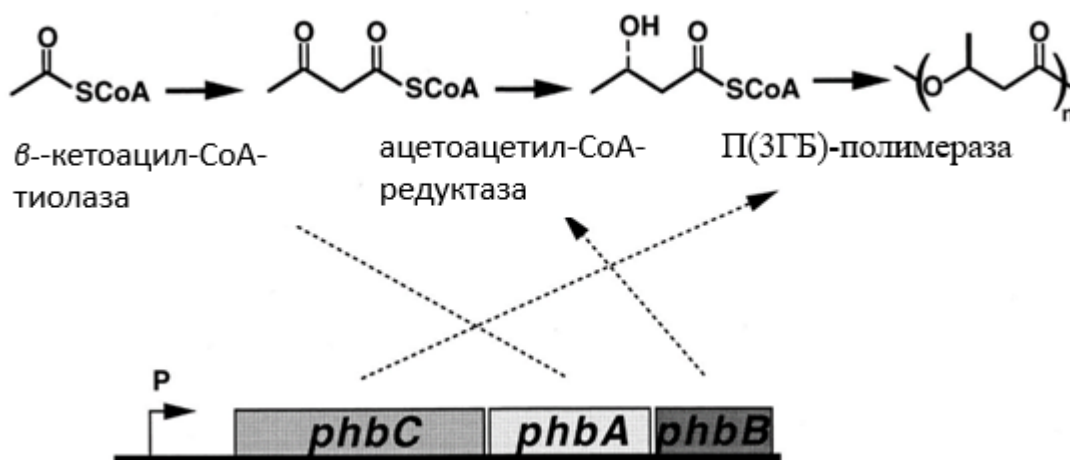


Рисунок 3 – Путь биосинтеза П(ЗГБ). П(ЗГБ) синтезируется в результате трех реакций, катализируемых β -кетоацил-СоА-тиолазой (*PhbA*), ацетоацетил-СоА-редуктазой (*PhbB*) и П(ЗГБ)-полимеразой (*PhbC*). Эти три фермента кодируются генами оперона *phbCAB*. Промотор выше *phbC* транскрибирует полный оперон [14].

Более детально особенности функционирования основных ферментов метаболического пути синтеза ПГА будут рассмотрены ниже.

β -кетоацил-КоА-тиолаза, также известная как биосинтетическая тиолаза поли(3-гидроксibuтирата) или ацетил-КоА:ацетил-КоА-ацетилтрансфераза, играет ключевую роль в первом этапе синтеза поли(3-гидроксibuтирата) (П(ЗГБ)). Этот фермент принадлежит к семейству тиолаз, которые участвуют в тиолитическом расщеплении различных субстратов до ацил-КоА и ацетил-КоА. β -кетоацил-КоА-тиолазы делятся на две основные категории в зависимости от субстратной специфичности. Тиолазы первой категории обладают широким спектром действия и могут взаимодействовать с β -кетоацил-КоА, имеющими длину цепи от C4 до C16. Эти ферменты в основном задействованы в метаболизме жирных кислот и находятся в цитоплазме прокариотических клеток, а также в митохондриях и пероксисомах эукариотических клеток. Биосинтетические β -кетоацил-КоА-тиолазы второй категории характеризуются более узким спектром действия, ограниченными субстратами с длиной цепи от C3 до C5. Эти ферменты выполняют различные функции, включая производство кетоновых тел, биосинтез стероидов и изопреноидов, а также участвуют в формировании П(ЗГБ).

Тиолаза, участвующая в синтезе П(ЗГБ), относится ко второй категории и обладает высокой специфичностью к ацетоацетил-КоА. Это делает её важным ферментом в процессе биосинтеза полимера, который используется для создания биоразлагаемых пластиков [15]. Учитывая растущий интерес к устойчивому развитию и снижению отходов пластика, исследования и разработки в области улучшения эффективности и функциональности таких ферментов, как β -

кетואцил-КоА-тиолаза, имеют большое значение для экологически чистого производства биополимеров.

Cupriavidus necator (ранее *R. eutropha*) содержит две β -кетотиолазы (фермент А и фермент В), которые способны действовать в биосинтетическом пути синтеза П(ЗГБ). Основное различие между этими двумя ферментами заключается в их субстратной специфичности. Первоначально считалось, что основная роль фермента В заключается в расщеплении жирных кислот, тогда как основная роль фермента А (*PhbA*) заключается в биосинтезе П(ЗГБ) [16]. Однако недавно было показано, что фермент В является основным источником мономера ЗГБ для образования П(ЗГБ-*co*-ЗГВ) [17].

Фермент *PhbA*, ключевой в синтезе поли(3-гидроксibuтирата) (ПЗГБ), инициирует двухстадийный процесс, приводящий к слиянию двух молекул ацетил-коэнзима А (ацетил-КоА) в ацетоацетил-КоА. На первой стадии цистеиновый остаток в активном центре фермента атакует ацетил-КоА, образуя ацетил-фермент. Затем, второй цистеиновый остаток отщепляет протон от новой молекулы ацетил-КоА, активируя её для последующей реакции с ацетил-ферментом, что приводит к формированию ацетоацетил-КоА [18].

Этот процесс является начальным этапом в биосинтезе П(ЗГБ), который важен для производства биоразлагаемых пластиков. Фермент *PhbA* относится к классу тиолаз, которые играют важную роль в метаболизме жирных кислот и биосинтезе различных биополимеров. В контексте производства П(ЗГБ), эффективность фермента *PhbA* напрямую влияет на скорость и объем производства полимера, что делает его потенциальной мишенью для генетической инженерии с целью улучшения промышленных процессов биосинтеза.

Ацетоацетил-КоА-редуктаза, которая также известен как (*R*)-3-гидроксиацетил-КоА-дегидрогеназа, выполняет функцию катализатора на втором этапе биосинтеза П(ЗГБ), преобразуя ацетоацетил-КоА в 3-гидроксibuтирил-КоА. В экстрактах клеток *Cupriavidus necator* была обнаружена активность ацетоацетил-КоА-редуктазы, зависящая как от НАДФН, так и от НАДН, однако

только НАДФН-зависимая активность участвует в процессе синтеза П(ЗГБ) [20]. На данный момент известен только один фермент ацетоацетил-КоА-редуктаза, который зависит от НАДН и играет роль в синтезе П(ЗГБ), и он был найден в бактерии *C. vinosum* [19].

Предпочтительной реакцией для тиолазы является тиолитическое расщепление, которое происходит в направлении, противоположном пути биосинтеза П(ЗГБ). Однако в условиях накопления П(ЗГБ) фермент действует против своего термодинамически выгодного направления, когда активность ацетоацетил-КоА-редуктазы и полимеразы П(ЗГБ) замедляет реакцию конденсации [20]. Поэтому наличие восстанавливающих эквивалентов в форме НАДФН считается движущей силой образования П(ЗГБ).

П(ЗГБ)-полимераза является третьим ферментом биосинтетического пути производства П(ЗГБ). Первая описанная нуклеотидная последовательность *phbC* была получена из *Cupriavidus necator* [21]. Полимераза П(ЗГБ) — лишь один член семейства ПГА-полимераз. Подавляющее большинство полимераз имеют молекулярную массу около 63 000 Да [22, 23]. ПГА-полимераза обнаруживается как в растворимом (гидрофильном), так и в связанном с гранулами (гидрофобном) состояниях. Широкое разнообразие микроорганизмов, продуцирующих ПГА, соответствует широкому спектру внутриклеточных условий, к которым эти ферменты должны будут адаптироваться. Это объясняет низкий уровень общей идентичности консервативных последовательностей между различными ПГА-полимеразми.

П(ЗГБ) является только одним из многочисленных ПГА, которые производятся множеством разнообразных микроорганизмов. Каждый из этих микроорганизмов занимает уникальную экологическую нишу и обладает отдельной эволюционной историей. Биосинтетические пути, по которым они создают ПГА, не являются идентичными, так как их метаболические процессы различаются. Например, трехэтапный процесс создания П(ЗГБ), который включает в себя реакции, катализируемые тиолазой, редуктазой и полимеразой,

характерен для *Cupriavidus necator* и *Zoogloea ramigera*. В то же время, другие продуценты ПГА могут использовать другие механизмы для их синтеза.

В случае отсутствия тиолазы и редуктазы, бактерия *Aeromonas caviae* применяет еноил-КоА-гидратазу для получения (*R*)-3-гидроксимомера из кротонил-КоА или гексаноил-КоА. Другие виды бактерий производят сополимеры П(3ГБ-*co*-3ГВ) из сахаров в результате процесса, в котором 3-ГВ формируется по метилмалонил-КоА пути. Обнаружено два дополнительных механизма в псевдомонадах, принадлежащих к группе I гомологии рРНК, которые либо используют β -окисление, либо промежуточные продукты биосинтеза жирных кислот для создания ПГА средней длины цепи. Таким образом, биосинтетические маршруты для двух типов ПГА различаются на уровне путей доставки мономера-КоА, в то время как полимеразы адаптировались к синтезу мономеров с короткой и средней длиной цепи [24].

1.3.1 Потенциальные источники углерода для синтеза ПГА

Сырье, используемое для производства ПГА, занимают значительную часть общих затрат, что стимулирует поиск альтернативных субстратов для удешевления и коммерциализации процесса. В качестве потенциальных субстратов для биосинтеза ПГА рассматриваются такие вещества, как смесь водорода и диоксида углерода, глюкоза, фруктоза, маниока, меласса, лактоза, молочная сыворотка, метанол, тапиока [25]; углеводородные кислоты (пентановая, олеиновая, октановая, нонановая) и октан, глюконат, белковые гидролизаты (пептона, казеина), ксилоза, гидролизаты гемицеллюлоз, смеси жирных кислот животного и растительного происхождения, отходы производства оливкового и пальмового масла [26]; а также метакриловая кислота, триглицериды, масляная кислота [27].

1.3.2 Предшественники для синтеза сополимера П(3ГБ-*co*-4ГБ)

4-гидроксимасляная кислота, 1,4-бутандиол [28], γ -бутиролактон [29], 1,6-гександиол, 4-хлормасляная кислота [30], 4-броммасляная кислота используются для синтеза мономеров 4ГБ в качестве предшественника в составе

питательной среды. Штаммовая и видовая специфика микроорганизмов определяет их применение в качестве оптимального субстрата.

Данных об использовании 4-хлормасляной кислоты в качестве предшественника мономеров 4ГБ в доступной литературе крайне мало. Так, в своем исследовании М. Каниока показал влияние различных предшественников на синтез ПГА у бактерий *Alcaligenes eutrophus* (*C. necator*); добавление 4-гидроксимасляной кислоты, 1,4-бутандиола, γ -бутиролактона и 4-хлормасляной кислоты привело к снижению показателей биомассы бактерий и содержания полимера. Наибольшее содержание мономеров 4ГБ в полимере было получено при добавлении 4-хлормасляной кислоты (37 мол.% на 48 ч, при концентрации предшественника 1,5 г/л) [31]. Ш. Накамура провел исследование в котором получил сополимеры П(3ГБ-со-4ГБ) с содержанием 4ГБ до 70-86 мол.%, содержание полимера 27% от биомассы при добавлении 4-гидроксимасляной кислоты и масляной кислоты в присутствии сульфата аммония и дегидрогенцитрата калия. Показано, что повышение концентрации 4-гидроксимасляной кислоты с 15 до 20 г/л приводит к увеличению содержания 4-гидроксибутитрата в сополимере (с 75 мол.% до 86 мол.% на 96 час), но ингибирует рост (с 5,4 г/л до 4,6 г/л, 96 час) и накопление сополимера (с 26% до 16%, 96 ч) в клетках *C. necator* [32]. Продолжил изучение 4-гидроксимасляной кислоты в качестве предшественника целевых мономеров 4ГБ Х. Кимура. В качестве углеродного источника он использовал пропионовую кислоту, также добавлялся сульфат аммония и в зависимости от эксперимента дегидрогенцитрат калия в качестве источников азота. Показано, что эксперименты без дегидрогенцитрата калия привели к большим показателям биомассы и содержания ПГА, без значительных отличий по содержанию мономеров 4ГБ, а повышение концентрации 4-гидроксимасляной кислоты с 12 до 20 г/л привело к снижению показателей биомассы (с 7,3 до 2,8 г/л) и содержания полимера (с 29 до 19%), содержание 4ГБ при этом увеличилось с 62 мол.% до 79 мол.% [33].

То есть, большинство предшественников целевых мономеров ингибируют рост микроорганизмов, из-за чего концентрация биомассы клеток и выходы ПГА

снижаются. Эти негативные эффекты предшественников могут быть сведены к минимуму с использованием различных стратегий, в том числе режима добавления предшественника (например, дробное добавление).

1.4 Характеристика сополимера П(ЗГБ-*co*-4ГБ)

В ПГА, синтезируемых природными штаммами микроорганизмов, например, таких как *Cupriavidus necator*, содержание П(ЗГБ) может достигать значений 80-90% от веса сухой биомассы [34]. При этом П(ЗГБ) является хрупким материалом (прочность на растяжение примерно 43 Мпа; примерно 3,5 Гпа модуль Юнга). К тому же он низкоэластичен (растяжение на разрыв около 5%, что в 80 раз меньше, чем у изотактического полипропилена). Кроме того, температура плавления П(ЗГБ) составляет 170-180 °С [35].

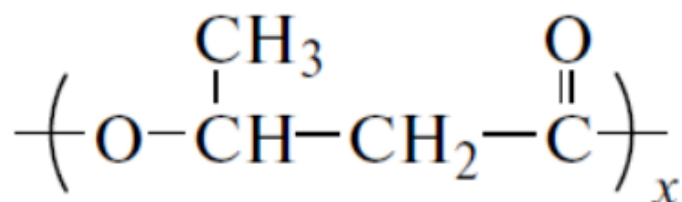


Рисунок 4 – Структурная формула поли(3-гидроксibuтирата)

Факторы, перечисленные выше мешают технологической обработке данного полимера, поэтому его модифицируют, к примеру, при смешивании с другими биополимерами или получением сополимеров.

Мономер 4-гидроксibuтират отличается от ЗГБ по своей структуре, он не имеет метильной боковой группы.

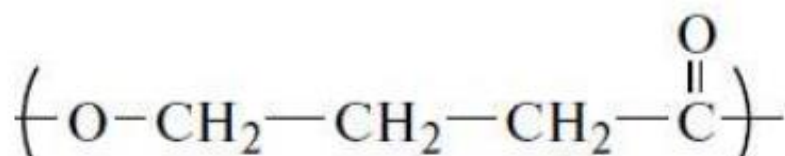


Рисунок 5 – Структурная формула 4-гидроксibuтирата

Его свойства тоже отличаются, П(4ГБ) является высокоэластичным и гибким материалом, в отличие от кристаллического П(3ГБ). Это объясняется большим расстоянием между сложноэфирными группами основной полимерной цепи [36].

Сополимер П(3ГБ-*co*-4ГБ), в состав которого входят короткоцепочечные мономеры 3ГБ и 4ГБ, синтезируется микроорганизмами родов *Cupriavidus*, *Comamonas*, *Chromobacterium*, *Rhodococcus*, *Hydrogenophaga* [37].

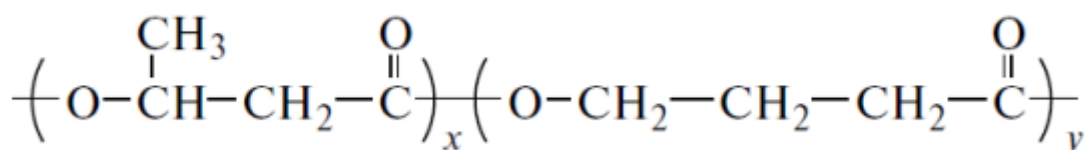


Рисунок 6 – Структурная формула П(3ГБ-*co*-4ГБ)

Для данного сополимера характерна более низкая температура плавления и стеклования по сравнению с гомополимером П3ГБ, также с увеличением содержания мономеров 4ГБ в П(3ГБ-*co*-4ГБ) возрастает эластичность этого материала (имеет более высокие показатели удлинения при разрыве и показатели предела прочности на разрыв в отличие от большинства других ПГА). С увеличением содержания мономеров 4ГБ в сополимере снижается степень кристалличности. Это позволяет использовать его как достойную альтернативу нефтехимических пластмасс и в качестве биомедицинских материалов [38].

1.5 Характеристика 4-хлормасляной кислоты, как предшественника синтеза мономеров 4-гидроксибутирата

4-хлормасляная кислота (также 4-Хлорбутирил хлорид, гамма-Хлорбутирилхлорид, гамма-Хлормасляной кислоты хлорангидрид, Хлорангидрид гамма-хлормасляной кислоты, C₄H₆Cl₂O) – одноосновная кислота класса карбоновых кислот. Молекулярная масса 122,55 г/моль; температура кипения 173-174 ° С. Структурная формула представлена на рисунке 7.

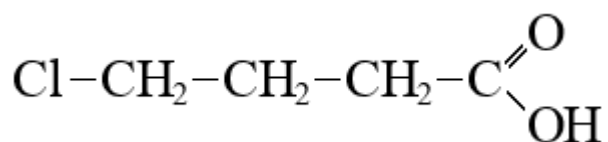


Рисунок 7 – Структурная формула 4-хлормасляной кислоты

Путь биосинтеза П(ЗГБ-*co*-4ГБ) из сахаров и 4-хлормасляной кислоты в клетках бактерий включает превращение его в ацетил-КоА или 4-гидроксибутирил-КоА и метаболизм сахаров в ацетил-КоА по пути Энтнера Дудорова (гексозы) или через пентозофосфатный путь (пентозы). Во время метаболизма лактонное кольцо-бутиролактона открывается и превращается в 4-гидроксимасляную кислоту. Путь синтеза П(ЗГБ-*co*4ГБ) включает только частичную конверсию 4-гидроксимасляной кислоты в 4-гидроксибутирил-КоА. Основная фракция 4-гидроксимасляной кислоты катаболизируется далее до полуальдегида янтарной кислоты и превращается в ацетил-КоА, из которого синтезируется 3-гидроксибутирил-КоА. Аналогично включается в 4ГБ мономер γ -бутиролактона и 1,4-бутандиола, предварительно превратившись в 4-гидроксибутират [39].

1.6 Применение ПГА

ПГА являются природным термопластиком и часто используется в качестве альтернативы традиционным полимерам, получаемым из нефти, для изготовления упаковочных материалов и покрытий. Благодаря широкому спектру физических свойств и возможности улучшения характеристик путем добавления различных добавок, полимеры ПГА находят применение в разнообразных областях, что подтверждается множеством патентов.

Изначально внимание уделялось использованию ПГА для создания потребительской упаковки, например, бутылок и контейнеров для косметики. В патентах США номер 4826493 и 4880592 описывается процесс изготовления пленок из полимеров П(ЗГБ) и П(ЗГБ-*co*-3ГВ), которые применяются в качестве внутреннего слоя в детских подгузниках. Эти и другие пленки, отличные от

П(ЗГБ-*co*-ЗГВ), могут быть использованы для создания различных биоразлагаемых или компостируемых изделий личной гигиены. ПГА также перерабатывались в волокна, которые затем использовались для изготовления таких материалов, как нетканые материалы. П(ЗГБ) и П(ЗГБ-*co*-ЗГВ) описаны как термоплавкие клеи, а ПГА с гидроксикислотами с более длинной боковой цепью использовались в составах клеев, чувствительных к давлению. ПГА также можно использовать для замены нефтехимических полимеров или в качестве ионопроводящих полимеров. ПГА можно использовать в качестве латекса, например, для покрытия бумаги, или для производства заменителей молочных сливок или ароматизаторов в пищевых продуктах [40].

ПГА являются биосовместимыми и биоразлагаемыми, а их продукты разложения нетоксичны, что определяет их возможность для дальнейшего применения в медицинских устройствах [41]. Более низкая кислотность и биологическая активность ПГА обеспечивают минимальные риски по сравнению с другими биополимерами такие как поли (молочная кислота) (ПМК) и поли (гликолевая кислота) (ПГК). Кроме того, универсальность ПГА с точки зрения модификации поверхности, широкий спектр физических и химических свойств и возможность использования в качестве поддержки клеточного роста, наряду с отсутствием канцерогенных эффектов, приводят к многочисленным потенциальным применениям в биомедицинских системах и в устройствах регенерации, таких как имплантаты *in vivo*, шовные материалы, адгезионные барьеры, клапаны направленные на восстановление тканей, пластыри для сердечно-сосудистой системы, каркасы для восстановления суставного хряща, заменители костных трансплантатов и нервные проводники [1].

Расширение терапевтических применений ПГА в сторону более совершенных систем часто зависит от молекулярно-химических модификаций для настройки гидрофильности, доступных химических функциональных возможностей и гидролитической стабильности полимерных цепей [42]. Множество различных функциональных групп может быть включено в концевое положение боковых цепей ПГА, включая, ароматические, гидроксильные,

эпоксидные и карбоксильные группы. Функциональные группы могут влиять на такие свойства, как механическая прочность, характеристики поверхности и гидрофильность в соответствии с требованиями конкретного применения (например, карбоксильные и гидроксильные группы повышают гидрофильность).

Несмотря на перспективность ПГА как возобновляемых материалов, только несколько из них производятся в больших масштабах с ограниченным успехом на рынке, а именно поли(3-гидроксибутират) П(ЗГБ), поли(4-гидроксибутират) П(4ГБ), их сополимер П(ЗГБ-*co*-4ГБ) и поли(3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксивалерат) П(ЗГБ-*co*-3ГВ) [43]. До настоящего момента только несколько биополимеров, таких как поли (молочная кислота) (ПМК), поли (гликолевая кислота) (ПГК), поли(молочно-*co*-гликолевая кислота) П(М-*co*-ГК), П(ЗГБ) и П(4ГБ) были одобрены для их применения в клинических биомедицинских системах доставки лекарств [44]. Среди ПГА, П(ЗГБ), П(ГБ-*co*-ГВ), П(4ГБ), поли(3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксигексаноат) П(ЗГБ-*co*-ГГ), поли(3-гидроксибутират-*co*-4-гидроксибутират) П(ЗГБ-*co*-4ГБ) и поли(3-гидроксиоктаноат) П(ЗГО) в основном рассматриваются для систем тканевой инженерии [45].

Помимо этого, ПГА представляет собой перспективный источник для получения низкомолекулярных соединений. Посредством химического гидролиза ПГА, её мономеры могут быть трансформированы в экономически выгодные молекулы, включая β -гидроксикислоты, β -гидроксиалканола, β -ациллактоны, β -аминокислоты и сложные эфиры β -гидроксикислот. Эти соединения, особенно сложные эфиры β -гидроксикислот, привлекают внимание благодаря их потенциалу в качестве биоразлагаемых растворителей [46].

Таким образом, ПГА имеют высокий потенциал для применений в биотехнологии, медицине и экологии. Важно исследовать новые предшественники для синтеза ПГА с различным составом и, следовательно, различными свойствами для расширения возможностей применения биополимеров. Большинство предшественников целевых мономеров

ингибируют рост бактерий, что снижает концентрацию биомассы и выходы ПГА, поэтому также важно исследовать режимы внесения предшественников для получения высоких выходов как 4ГБ, так и биомассы и содержания полимера.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлся природный штамм бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 (грамотрицательные, палочковидные, водородокисляющие бактерии, способные синтезировать ПГА).

2.1 Культивирование и условия роста бактерий

Культивирование бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 проводили в колбах объемом 500 мл, содержащих 200 мл питательной среды и 20 мл инокулята. Ферментацию проводили в термостатируемом шейкере-инкубаторе «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США), культивировали при 30°C и 200 об/мин, 72 ч.

Бактерий выращивали в жидкой солевой среде Шлегеля, которая состоит из: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 9,0 г/л; KH_2PO_4 - 1,5 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 г/л; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \times \text{H}_2\text{O}$ - 5 г/л. Микроэлементы вводятся из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Раствор микроэлементов содержит: H_3BO_3 - 0,288 г/л; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,03 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,008 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,008 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,176 г/л; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,05 г/л; NiCl_2 - 0,008 г/л. В качестве источника азота использовали NH_4Cl - 1 г/л.

В качестве основного источника углерода использовали фруктозу с начальной концентрацией в среде 12-15 г/л. По мере исчерпания фруктозы в ходе роста бактерий в культуру добавляли субстрат в той же концентрации.

В качестве предшественника 4-гидроксibuтирата использовали 4-хлормасляную кислоту ($\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$). Предшественник добавлялся в среду в различных концентрациях и в различное время в зависимости от эксперимента. Длительность культивирования – 72 часа.

2.2 Определение оптической плотности

Измерение оптической плотности бактериальной культуры проводилось с использованием спектрофотометра UNICO-2100 на длине волны 440 нм и оптическом пути 1 мм. Для определения оптической плотности к образцу бактерий добавляли дистиллированную воду, соблюдая пропорцию 1 к 5.

2.3 Определение концентрации фруктозы в среде

Измерение уровня фруктозы проводилось с использованием резорцинового метода. Вначале, для анализа брали 2 мл культурального раствора и центрифугировали его в течение 2 минут при скорости 6000 оборотов в минуту с использованием центрифуги модели 5417 R производства компании Eppendorf, Германия. Затем объем 0,5 мл культуральной жидкости разбавляли до 25 мл с помощью дистиллированной воды. К 1 мл полученного раствора добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина, который готовили путем растворения 50 мг резорцина в 50 мл 95%-ого этилового спирта, и 3 мл 80%-ого раствора соляной кислоты. В качестве контрольного образца использовали дистиллированную воду. Пробы подвергали термической обработке в водяной бане в течение 20 минут при температуре 80 °С, после чего охлаждали до комнатной температуры. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре UNICO-2100 при длине волны 540 нм и длине оптического пути 5 мм. Расчет концентрации фруктозы осуществляли на основе калибровочной кривой.

2.4 Определение концентрации биомассы бактерий

Биомассу бактерий определяли с помощью весового метода. Для этого 25 мл бактериальной суспензии центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 10 мин при 7000 об/мин. Затем промывали клетки водой и вновь центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия). Данную процедуру повторяли дважды, после этого осадок промывали дистиллированной водой. Полученную биомассу переносили в предварительно доведенные до постоянного веса бюксы. Бюксы с биомассой размещали в сушильном шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) при 95 °С 24 ч. После этого бюксы охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах Adventurer, «OHAUS», США. Биомассу бактерий определяли, как разницу между весом бюкса, содержащим биомассу, и его исходным весом.

2.5 Выделение полимера

Метод выделения полимера из бактериальной суспензии заключался в следующем: образцы суспензии подвергались центрифугированию на устройстве Centrifuge 5810 R производства Eppendorf, Германия, в течение 6 минут на скорости 6000 оборотов в минуту. После отделения надосадочной жидкости, осадок перекладывали в плоскодонную колбу с притертой крышкой, ресуспендируя его в этаноле объемом 10 мл, после чего добавляли 20 мл хлороформа для экстракции полимера. Процесс экстракции осуществлялся в течение 24 часов при температуре 30 °С. Далее раствор фильтровали через бумажный фильтр в круглодонную колбу и выпаривали на вакуумном роторном испарителе Rotavapor R-210 фирмы BUCHI. Для осаждения полимера использовали гексан.

2.6 Определение содержания полимера

Определение содержания полимера в биомассе осуществляли методом хроматографии метиловых эфиров жирных кислот, которые получали в результате метанолиза сухих образцов биомассы на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A с масс-детектором Agilent Technologies 5975C (Agilent, США). В процессе анализа к 0,0039 - 0,0045 г сухой биомассы добавляли 1 мл внутреннего стандарта (50 мг бензойной кислоты, растворенной в 100 мл хлороформа), 0,85 мл метанола и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Смесь инкубировали на водяной бане под обратным холодильником в течение 2 часов 40 минут при температуре 80°C. Затем к смеси добавляли 1 мл дистиллированной воды и оставляли для разделения фаз в холодильнике. После этого для хроматографического анализа использовали нижнюю фазу.

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.

2.7 Определение молекулярных характеристик полимера

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

2.8 Определение степени кристалличности

Степень кристалличности ПГА определяли с использованием рентгеноспектрометра 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).

2.9 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».

2.10 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Excel, высчитывая стандартную ошибку по трем повторностям эксперимента.

Страницы №28-36 изъяты в связи с авторским правом

ВЫВОДЫ

1. С увеличением концентрации 4-хлормасляной кислоты с 0,5 до 5,0 г/л концентрация биомассы снижалась с 7,1 до 4,1 г/л. Содержание полимера при всех концентрациях, за исключением концентрации 5 г/л, было сопоставимым. В независимости от концентрации предшественника содержание 4ГБ снижалось к концу культивирования в 2-4 раза от значений, зафиксированных в начале культивирования (24 ч), составляя 1,6-7,0 мол.%.
2. Добавление 4-хлормасляной кислоты в различных режимах в культуру бактерий позволило получить сополимеры П(3ГБ-*co*-4ГБ) с включением 4ГБ до 22,8 мол.% при сохранении высоких показателей концентрации биомассы и содержания полимера.
3. Увеличение содержания 4ГБ в полимере приводит к снижению средневесовой молекулярной массы и снижению степени кристалличности (до 57% для сополимера с включением 4ГБ 22,8 мол.%).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПГА – полигидроксиалканоаты

ЗГБ – 3-гидроксибутират

4ГБ – 4-гидроксибутират

П(ЗГБ) – поли(3-гидроксибутират)

П(4ГБ) – поли(4-гидроксибутират)

П(ЗГБ-*co*-4ГБ) – поли(3-гидроксибутират-*co*-4-гидроксибутират)

П(ЗГВ) – поли(3-гидроксивалерат)

ПМК – поли(молочная кислота)

ПГК – поли(гликолевая кислота)

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sanhueza C. et al. Polyhydroxyalkanoates as biomaterial for electrospun scaffolds //International journal of biological macromolecules. – 2019. – Т. 124. – С. 102-110.
2. Sabbagh F., Muhamad I. I. Production of poly-hydroxyalkanoate as secondary metabolite with main focus on sustainable energy //Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2017. – Т. 72. – С. 95-104.
3. Bhatia S. K. et al. Bioconversion of plant biomass hydrolysate into bioplastic (polyhydroxyalkanoates) using *Ralstonia eutropha* 5119 //Bioresource Technology. – 2019. – Т. 271. – С. 306-315.
4. Ali I., Jamil N. Polyhydroxyalkanoates: current applications in the medical field //Frontiers in biology. – 2016. – Т. 11. – С. 19-27.
5. Carvalho L. T. et al. Recent advances in the production of biomedical systems based on polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides //International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Т. 183. – С. 1514-1539.
6. Raza Z. A., Khalil S., Abid S. Recent progress in development and chemical modification of poly (hydroxybutyrate)-based blends for potential medical applications //International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Т. 160. – С. 77-100.
7. Sabbagh F., Muhamad I. I. Production of poly-hydroxyalkanoate as secondary metabolite with main focus on sustainable energy //Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2017. – Т. 72. – С. 95-104.
8. Vigneswari S. et al. Extracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase by *Acidovorax* sp. DP5 //Enzyme research. – 2015. – Т. 2015.
9. Tokiwa Y., Calabia B. P. Biodegradability and biodegradation of polyesters //Journal of Polymers and the Environment. – 2007. – Т. 15. – С. 259-267.
10. G.-Q. Chen, X.-R.Jiang, Y. Guo. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA) // Synthetic and Systems Biotechnology. - 2016-V.1 p. 236-242

11. Sabbagha, Farzaneh, Production of poly-hydroxyalkanoate as secondary metabolite with main focus on sustainable energy / Farzaneh Sabbagha, Ida Idayu Muhamada. // Renewable and Sustainable Energy Reviews .- 2017. – p. 95–104.

12. Madison L.L., Huisman G.V. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic // Microbiol. And Molecular Biology Rev. - 1999. - Vol.63. - P.1-25.

13. Bellini S., Tommasi T., Fino D. Poly (3-hydroxybutyrate) biosynthesis by *Cupriavidus necator*: A review on waste substrates utilization for a circular economy approach //Bioresource Technology Reports. – 2022. – C. 100985.

14 Madison L. L., Huisman G. W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic //Microbiology and molecular biology reviews. – 1999. – T. 63. – №. 1. – C. 21-53.

15 Masamune S. et al. Poly-(R)-3-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis: mechanistic studies on the biological Claisen condensation catalyzed by β -ketoacyl thiolase //Pure and Applied Chemistry. – 1989. – T. 61. – №. 3. – C. 303-312.

16 Haywood G. W. et al. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus* //FEMS microbiology letters. – 1988. – T. 52. – №. 1-2. – C. 91-96.

17 Slater S. et al. Multiple β -ketothiolases mediate poly (β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha* //Journal of bacteriology. – 1998. – T. 180. – №. 8. – C. 1979-1987.

18 Masamune S. et al. Bio-Claisen condensation catalyzed by thiolase from *Zoogloea ramigera*. Active site cysteine residues //Journal of the American Chemical Society. – 1989. – T. 111. – №. 5. – C. 1879-1881.

19Liebergesell M., Steinbüchel A. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D //European journal of biochemistry. – 1992. – T. 209. – №. 1. – C. 135-150.

20 Masamune S. Walsh C. T. Sinskey A. J. Peoples O. P. Poly-(R)-3-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis: mechanistic studies on the biological Claisen condensation catalyzed by β -ketoacyl thiolase

21 Peoples O. P., Sinskey A. J. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*) // *Journal of Biological Chemistry*. – 1989. – Т. 264. – №. 26. – С. 15298-15303.

22 Hein S., Tran H., Steinbüchel A. *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria // *Archives of microbiology*. – 1998. – Т. 170. – С. 162-170.

23 Kaneko T. et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions // *DNA research*. – 1996. – Т. 3. – №. 3. – С. 109-136.

24 Madison L. L., Huisman G. W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic // *Microbiology and molecular biology reviews*. – 1999. – Т. 63. – №. 1. – С. 21-53.

25. Волова, Т.Г., Миронов, П.В., Васильев, А.Д. Синтез и исследование многокомпонентных полигидроксиалканоатов. – 2006

26. Волова, Т.Г., Шишацкая, Е.И., Жила, Н.О., Киселев, Е.Г., Миронов, П.В., Васильев, А.Д., Петерсон, И.В., Сински, Э.Д. Фундаментальные основы производства и применения биodeградируемых полигидроксиалканоатов. – 2012

27. Киселев, Е.Г., Шишацкий, О.Н., Сински, Э.Дж. Техникотехнологические основы производства разрушаемых полигидроксиалканоатов. – 2012 г.


28 Amirur, A. A., Ahmad R. M. Yahya, K. Sudesh, M. N. M. Azizan, M. I. A. Majid, Isolation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) producer from Malaysian environment using *c*-butyrolactone as carbon source. – 2009.

- 29 Hsieh Wen-Chuan, Yuki Wada, Chih-Pong Chang, Fermentation, biodegradation and tensile strength of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Delftia acidovorans*. – 2009
30. Hui-Ling Chai, Rahayu Ahmad, A. R. M. Yahya, M. I. A. Majid, Microbial synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 through a two step cultivation process. – 2009
31. Kunioka M., Kawaguchi Y., Doi Y. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* // *Applied microbiology and biotechnology*. – 1989. – Т. 30. – С. 569-573.
32. Nakamura S., Doi Y., Scandola M. Microbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) // *Macromolecules*. – 1992. – Т. 25. – №. 17. – С. 4237-4241.
- 33 Kimura H. et al. Effective microbial production of poly (4-hydroxybutyrate) homopolymer by *Ralstonia eutropha* H16 // *Polymer international*. – 1999. – Т. 48. – №. 11. – С. 1073-1079.
34. Волова Т. Г. Современные биоматериалы: мировые тренды, место и роль микробных полигидроксиалканоатов // *Журнал Сибирского федерального университета. Биология*. – 2014. – Т. 7. – №. 2. – С. 103-133.
35. Gao X. et al. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels // *Current opinion in biotechnology*. – 2011. – Т. 22. – №. 6. – С. 768-774.
36. Huong K. H., Teh C. H., Amirul A. A. Microbial-based synthesis of highly elastomeric biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) thermoplastic // *International journal of biological macromolecules*. – 2017. – Т. 101. – С. 983-995.
37. Шишацкая Е. И. и др. Синтез и исследование сополимеров 3-гидроксибутирата/4-гидроксибутирата // *Перспективные материалы*. – 2013. – №. 3. – С. 20-26.
38. Myung J. et al. Expanding the range of polyhydroxyalkanoates synthesized by methanotrophic bacteria through the utilization of omega-hydroxyalkanoate co-substrates // *Amb Express*. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-10.

39. Lopes, M. S. PHB biosynthesis in catabolite repression mutant of *Burkholderia sacchari* / M. S. G. Lopes, G. Gosset, R. C. S. Rocha, J. G. C. Gomez, Luiziana Ferreira da Silva //Current microbiology. - 2011. - T. 63. - No. 4. - P. 319.
- 40 Madison L. L., Huisman G. W. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic //Microbiology and molecular biology reviews. – 1999. – T. 63. – №. 1. – C. 21-53.
41. Chen G. Q., Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials //Biomaterials. – 2005. – T. 26. – №. 33. – C. 6565-6578.
42. Ke Y. et al. Surface modification of polyhydroxyalkanoates toward enhancing cell compatibility and antibacterial activity //Macromolecular Materials and Engineering. – 2017. – T. 302. – №. 11. – C. 1700258.
43. Zheng Y. et al. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction //Metabolic engineering. – 2020. – T. 58. – C. 82-93.
44. Mokhtarzadeh A. et al. Bacterial-derived biopolymers: Advanced natural nanomaterials for drug delivery and tissue engineering //TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2016. – T. 82. – C. 367-384.
45. Dwivedi R. et al. Poly hydroxyalkanoates (PHA): Role in bone scaffolds //Journal of oral biology and craniofacial research. – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 389-392.
46. Williams S. F., Peoples O. P. Biodegradable plastics from plants //Chemtech. – 1996. – T. 26. – №. 9. – C. 38-44.

Министерство науки и высшего образования РФ
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
«20» июня 2024г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Синтез сополимера поли(3-гидроксибутират-*co*-4-
гидроксибутират) бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 при использовании
4-хлормасляной кислоты
(тема)

Научный руководитель

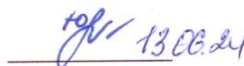


Подпись, дата

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

Н. О. Жила
инициалы, фамилия

Выпускник



Подпись, дата

Ю.А. Пятикова
инициалы, фамилия

Красноярск 2024