

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 полимера поли(3-гидроксibuтират-co-4-гидроксibuтират)
бактериями *Cupriavidus necator B-10646* на среде с различными источниками
азота

Научный руководитель	_____	<u>к.б.н.,доцент</u>	<u>Н.О.Жила</u>
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы,фамилия
Студент ББ20-04Б, №042049333	_____		<u>А.Г.Беглюк</u>
	подпись, дата		инициалы,фамилия

Красноярск 2024

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Синтез полимера поли(3-гидроксibuтират-со-4-гидроксibuтират) бактериями *Cupriavidus necator* В-10646 на среде с различными источниками азота» содержит 42 страницы текстового документа, 7 иллюстраций, 1 таблицу и 51 использованный источник.

Ключевые слова: БИОСИНТЕЗ, ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ИСТОЧНИКИ АЗОТА, МОНОМЕРЫ 4-ГИДРОКСИБУТИРАТА, ϵ -КАПРОЛАКТОН, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА.

Цель: исследовать влияние различных источников азота на синтез полимера и включение 4ГБ у природного штамма *Cupriavidus necator* В-10646.

Задачи:

1. Изучить влияние различных источников азота на рост бактерий и синтез сополимера П(3ГБ-со-4ГБ) в присутствии ϵ -капролактона.
2. Исследовать влияние режима внесения ϵ -капролактона на накопление биомассы, полимера и включений 4ГБ у *Cupriavidus necator* В-10646.
3. Исследовать физико-химические свойства синтезируемых сополимеров с различным включением 4ГБ.

Актуальность: получение биополимеров ПГА, посредством изучения способности бактерий к синтезу П(3ГБ-со-4ГБ) с высоким включением 4ГБ и с использованием различных источников азота.

Основные выводы и результаты:

Среди исследованных органических и неорганических источников азота, максимальное включение 4ГБ при сохранении высоких показателей биомассы и полимера показано в присутствии ацетата аммония.

Добавление ϵ -капролактона в различных режимах в культуру бактерий позволило получить сополимеры П(3ГБ-со-4ГБ) с включением 4ГБ до 33,05

мол. % при сохранении высоких показателей концентрации биомассы и содержания полимера.

Средневесовая молекулярная масса (M_w) сополимеров составляла 320-417 кДа, при этом отсутствовала четкая взаимосвязь между содержанием 4ГБ и M_w . Увеличение содержания 4ГБ приводит к снижению степени кристалличности (S_x) (с 73% для П(3ГБ) до 48% для сополимера с включением 4ГБ 33,1 мол. %).

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	8
1.1 Характеристика ПГА, их свойства и применение	8
1.2 Синтез ПГА.....	10
1.3 Сополимеры ПГА.....	12
1.4 Микробный синтез П(4ГБ).....	13
1.4.1. Продуценты сополимера с включениями 4ГБ	14
1.4.2 Добавка прекурсоров для получения сополимеров, содержащих 4ГБ	14
1.4.3 Использование различных субстратов для синтеза сополимера П(3ГБ- <i>co</i> -4ГБ).....	16
1.4.4 Параметры культивирования, влияющие на синтез сополимера П(3ГБ- <i>co</i> -4ГБ).....	17
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	20
2.1 Культивирование бактерий.....	20
2.2 Определение оптической плотности.....	21
2.3 Определение концентрации фруктозы в среде	21
2.4 Определение концентрации биомассы	21
2.5 Экстракция полимера	22
2.6 Определение содержания полимера и включений 4ГБ	22
2.7 Определение физических характеристик полимера.....	22
2.8 Статистическая обработка результатов.....	23
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	24
ВЫВОДЫ.....	34
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	35
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	36

ВВЕДЕНИЕ

Мировое количество синтетических полимеров, произведенных на сегодняшний день на основе ископаемых ресурсов, оценивается в 10 миллиардов метрических тонн. От этого количества только 9% неразлагающихся пластмасс перерабатывается, лишь 12% сжигается для выработки энергии, в то время как остальное просто выбрасывается на свалку или попадает непосредственно в экосистемы [1].

Ни один из этих вариантов конечного использования нельзя считать устойчивым: переработка ухудшает качество пластика с каждым последующим циклом и приводит к усиленному распаду пластика на нано- и микропластик. Эти частицы попадают в пищевую цепочку, организм человека и представляют угрозу для биосферы [2]. Сжигание, в свою очередь, несмотря на возможность преобразования химической энергии в тепловую энергию, которую можно использовать для отопления и выработки электроэнергии, приводит к образованию избыточного атмосферного CO₂, содержащего углерод, который миллионы лет выводился из глобального углеродного цикла, фиксируясь в ископаемом сырье. Захоронение на свалке, в конечном счете, приводит к образованию куч пластиковых отходов и их переносу в водоемы и наземную среду, где они снова образуют микропластик в результате механического истирания и дезинтеграции, например, под воздействием солнечного излучения [3].

Приведенные выше сценарии иллюстрируют, что человечеству необходимо заменить такие виды пластика альтернативными, которые производятся из возобновляемых ресурсов, поддаются биологическому разложению в приемлемые сроки и могут быть компостированы как в домашних условиях, так и в промышленности. В то же время они должны конкурировать с известными пластмассами по своим свойствам или, в лучшем случае, даже превосходить их [4].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) - группа природных биополимеров, которые синтезируются многими микроорганизмами, запасаются в виде гранул в цитоплазме. Накопление ПГА осуществляется при избыточном содержании углерода и недостатке азота или фосфора. В зависимости от используемого углеродного субстрата можно получать ПГА с различным составом и свойствами [5].

Однако высокая стоимость производства ПГА и трудность в подборе конкретных методов обработки полимера являются одними из основных факторов, затрудняющих их реализацию на мировом уровне [6].

В связи с этим, перед учеными стоит задача в оптимизации процесса культивирования продуцентов с высоким выходом ПГА. Для этого необходимо поддерживать определенное соотношение источника углерода и азота.

На сегодняшний день в достаточном количестве для прикладных исследований доступны только некоторые ПГА, включая поли(3-гидроксибутират) (П(3ГБ)). Однако его сополимеры обладают более ярко выраженными механическими свойствами, что влечет за собой заинтересованность ученых в их получении [7].

Среди различных типов ПГА поли(4-гидроксибутират) (П(4ГБ)) является единственным полимером, получившим одобрение FDA для медицинского применения. Тем не менее, большинство микроорганизмов, продуцирующих ПГА, не способны синтезировать П(4ГБ) или ПГА, содержащие мономеры 4-гидроксибутирата (4ГБ), из-за отсутствия у них метаболического пути образования 4ГБ. Таким образом, большинство микроорганизмов нуждаются в добавке прекурсоров 4ГБ для синтеза соответствующих мономеров [8]. Однако использование прекурсоров 4ГБ влечет за собой дополнительные трудности, среди которых наличие ингибирующего рост продуцентов эффекта при высоких концентрациях прекурсоров 4ГБ, дополнительные затраты на их введение в питательные

среды и др. Поэтому исследования, посвящённые поиску наиболее подходящих условий культивирования продуцентов сополимеров, содержащих мономеры 4ГБ, в настоящее время крайне актуальны.

Целью данной работы было исследовать влияние различных источников азота на синтез полимера и включение 4ГБ у природного штамма *Cupriavidus necator* В-10646.

Для этого было необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить влияние различных источников азота на рост бактерий и синтез сополимера П(3ГБ-со-4ГБ) в присутствии ϵ -капролактона.
2. Исследовать влияние режима внесения ϵ -капролактона на накопление биомассы, полимера и включений 4ГБ у *Cupriavidus necator* В-10646.
3. Исследовать физико-химические свойства синтезируемых сополимеров с различным включением 4ГБ.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика ПГА, их свойства и применение

Полигидроксиалканоаты (ПГА) — это биополимеры, которые синтезируются многочисленными бактериями и запасаются в виде гранул в качестве резервного источника энергии внутри клетки. Клетки бактерий рода *Cupriavidus*, содержащие гранулы ПГА представлены на рис.1. Накопление ПГА происходит, как правило, в том случае, если, например, источник азота или фосфора находится в дефиците, а источник углерода, напротив, присутствует в избыточной концентрации. Поли(3-гидроксибутират) является наиболее изученным представителем этого полимера. В 1927 году французский микробиолог Морис Лемуан обнаружил и охарактеризовал П(ЗГБ), выделенный из *Bacillus megaterium*. Позже было показано, что данный полимер продуцируется и другими видами микроорганизмов, среди которых *Cupriavidus necator* (ранее *Ralstonia eutropha* или *Alcaligenes eutrophus*) [9].

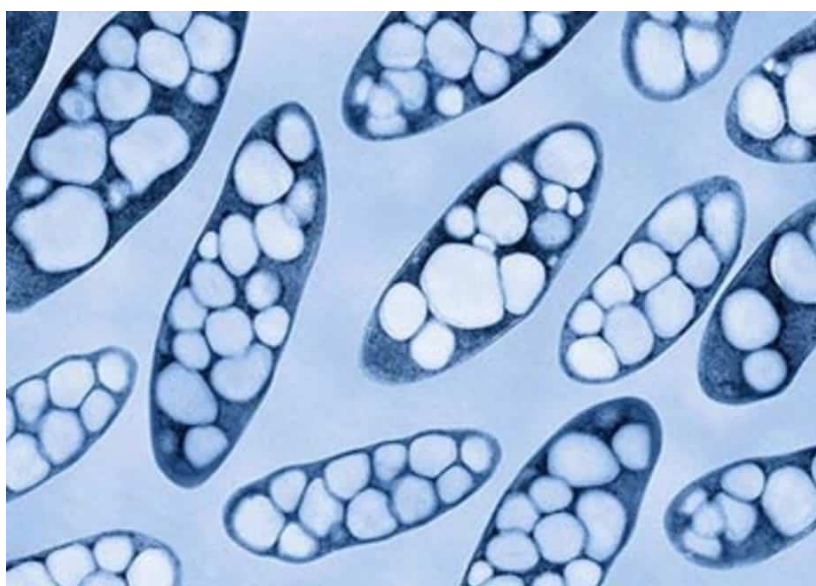


Рисунок 1 – Клетки бактерий рода *Cupriavidus*, содержащие гранулы ПГА. URL: <https://www.chungvisinh.com/cupriavidus-necator-nbrc-102504.html>

Полигидроксиалканоаты обладают значительными сходствами с полипропиленом и полиэтиленом по своим физико-химическим свойствам,

которые широко используются и наносят огромный урон окружающей среде [10]. С другой стороны, ПГА обладают отличительными особенностями. За счет того, что они характеризуются такими свойствами и признаками как гидрофобность, устойчивость к ультрафиолетовому излучению и гидролитическому воздействию, ПГА способны составить конкуренцию известным пластмассам. Помимо прочего, ПГА – это биodeградируемые материалы, они не накапливаются в окружающей среде и не влияют негативно на организм человека, за счет своей биосовместимости. [11].

Несмотря на полную биоразлагаемость в природе, механические, кристаллические и термические свойства ПГА практически сопоставимы с нефтяными аналогами [12]. Важно отметить, что свойства ПГА-полимеров так или иначе зависят от их мономерного состава. Изменяя тип и состав мономера, можно получить ПГА с улучшенными свойствами [13]. Существует не менее 150 различных мономеров ПГА [14]. В зависимости от длины углеродной цепи этих мономеров ПГА классифицируют на короткоцепочечные (SCL-ПГА, 3-5 атомов углерода), среднецепочечные (MCL-ПГА, 6-14 атомов углерода) и длинноцепочечные (LCL-ПГА, более 14 атомов углерода) [15].

Короткоцепочечные ПГА являются наиболее часто синтезируемыми ПГА у бактерий. Наиболее полно изучены и охарактеризованы такие SCL-ПГА, как поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)), поли(3-гидроксивалерат) (П(ЗГВ)) и поли(4-гидроксибутират) (П(4ГБ)). Поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)), гомополимер ЗГБ, является наиболее распространенным типом ПГА. П(ЗГБ) является хрупким и высококристаллическим по своей природе, имеет высокую температуру плавления, что затрудняет его промышленную переработку [16]. Однако, сополимер ЗГБ и ЗГВ, поли(3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксивалерат) (П(ЗГБ-*co*-ЗГВ)), демонстрирует улучшенные механические свойства, такие как более высокие прочность на растяжение, ударная вязкость и модуль Юнга, а также пониженную температуру плавления [17]. Полимер становится менее кристаллическим, что повышает его

пригодность к технологической переработке. Гомополимер 4ГБ, поли(4-гидроксибутират) (П(4ГБ)), обладает превосходными свойствами и является единственным ПГА, получившим одобрение FDA для медицинского применения с 2007 года [18].

Молекулярная масса ПГА является наиболее значимым параметром, характеризующим физико-механические свойства получаемого полимера. Чем выше данный показатель, тем более улучшенными механическими свойствами обладает ПГА [19]. Стоит учитывать тот факт, что к концу ферментации молекулярная масса полимера может уменьшаться, так как микроорганизмы способны использовать готовый полимер в качестве дополнительного источника углерода. Исследования показывают, что на молекулярную массу ПГА огромное влияние оказывают температура культивирования, источник углеродного субстрата, концентрация и каталитическая активность ПГА-синтазы, pH среды и наличие в ней микроэлементов [20].

Термопластичность полигидроксиалканоатов позволяет с использованием различных методов обработки (прессования, экструзии) получать разнообразные изделия и материалы. Это могут быть гибкие пленки, мембраны, шовные нити, нетканые материалы, упаковочные материалы, гели и клеи, которые могут найти свое применение в системах доставки лекарств, защите окружающей среды, тканевой инженерии, разработке вакцин, пищевой и косметической промышленности, сельском и хозяйстве, радиоэлектронике и других сферах [21].

1.2 Синтез ПГА

Количество ПГА, образующегося в ходе биосинтетических путей, зависит исключительно от уровня присутствующего источника углерода (сахара/жирные кислоты, аминокислоты и др.). Биосинтез ПГА может осуществляться по трем основным метаболическим путям.

Путь I, является наиболее известным среди биосинтетических путей ПГА, используемых *S. necator*. Схема метаболического пути синтеза П(ЗГБ) представлена на рис.2. Все начинается с конденсации двух молекул ацетил-КоА из ЦТК с образованием ацетоацетил-КоА ферментом β -кетотиолаза. Под действием ацетоацетил-КоА-редуктазы идет превращение ацетоацетил-КоА в 3-гидроксибутирил-КоА. На заключительном этапе, фермент ПГА-синтаза катализирует полимеризацию путем этерификации 3-гидроксибутирил-КоА в поли(3-гидроксибутират). [22]



Рисунок 2 – Метаболический путь синтеза ПГБ

Второй путь биосинтеза ПГА подразумевает наличие двух ферментов: 3-гидроксиацил-АПБ-КоА трансфераза (PhaG) и малонил-КоА-АПБ трансацилаза (FabD), катализирующих образование 3-гидроксиацил-АПБ,

который далее превращается в 3-гидроксиацил-КоА и в последствии полимеризуется ПГА-синтазой [23].

Третий путь генерирует мономеры через цикл β -окисления жирных кислот и характерен для представителей таксона *Pseudomonas*. Промежуточное звено β -окисления транс-2-еноил-КоА преобразуется в (*R*)-3-гидроксиацил-КоА под действием (*R*)-специфичной гидратазы еноил-КоА [24].

1.3 Сополимеры ПГА

На сегодняшний день в достаточном количестве для прикладных исследований доступны только некоторые ПГА, включая поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)), поли(3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксивалерат) (П(ЗГБ-*co*-ЗГВ)), поли(3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксигексаноат) (П(ЗГБ-*co*-ЗГГ)), поли(3-гидроксиоктаноат) (П(ЗГО)) и поли(3-гидроксибутират-*co*-4-гидроксибутират) (П(ЗГБ-*co*-4ГБ)).

Одним из наиболее часто используемых сополимеров является поли(3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксивалерат) (П(ЗГБ-*co*-ЗГВ)), который обладает большей гибкостью, прочностью, повышенным удлинением на разрыв, более низкой температурой плавления кристалличностью и меньшей жесткостью по сравнению с П(ЗГБ) [25]. Другой сополимер, поли(3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксигексаноат) (П(ЗГБ-*co*-ЗГГ)), проявляет хорошие термомеханические свойства гибкости, прочности, ударной вязкости, пластичности и эластичности в дополнение к физико-химическим свойствам полиэфиров, таким как окрашиваемость и пригодность для печати. Его также можно смешивать с полимолочной кислотой (ПЛА) и термопластичным крахмалом, чтобы добавить больше полезных свойств [26].

П(ЗГБ-*co*-4ГБ) представляет собой сополимер, который проявляет широкий спектр механических свойств от твердого кристаллического пластика до очень эластичной резины в зависимости от молярной доли

мономера 4ГБ в полимерной цепи [27]. Для большинства применений это является преимуществом по сравнению с гомополимером П(3ГБ). Фактически, П(3ГБ) обладает высокой жесткостью и кристалличностью, что ограничивает некоторые из его применений, а также его технологичность. Помимо привлекательных механических свойств, сополимер П(3ГБ-*co*-4ГБ), а также гомополимер П(4ГБ) обладают достаточными свойствами для применения в медицине и фармацевтике, а именно хорошей биосовместимостью и отсутствием воспалительной реакции [28].

Поли(3-гидроксibuтират-*co*-4-гидроксibuтират) (П(3ГБ-*co*-4ГБ)) с высоким содержанием мономера 4ГБ обладает улучшенной биосовместимостью и механическими свойствами, которые полезны в качестве имплантируемого и рассасывающегося биоматериала в медицине и фармацевтике [29].

Таким образом, сополимеры являются предпочтительными материалами при выборе ПГА для переработки в товарные изделия различными методами.

1.4 Микробный синтез П(4ГБ)

В отличие от ПГБ, основной трудностью является то, что к синтезу гомополимера П(4ГБ) способны лишь ограниченное количество видов бактерий. Большинство микроорганизмов не могут продуцировать гомополимер П(4ГБ), но способны включать в основную цепь 3ГБ мономеры 4ГБ, образуя сополимер П(3ГБ-*co*-4ГБ). Как *co*-, так и терполимеры, содержащие 4ГБ, обладают новыми и удивительными свойствами, которые предпочтительнее П(3ГБ) и П(3ГБ-*co*-3ГВ). Тем не менее, баланс между соотношением мономерных звеньев имеет решающее значение. Иногда высокое содержание мономеров 3ГБ в П(3ГБ-*co*-3ГВ) затмевает преимущества содержания 4ГБ [30]. Поэтому оптимизация мономерного состава ПГА часто является сложной задачей и требует обширных исследований.

1.4.1. Продуценты сополимера с включениями 4ГБ

Hydrogenophaga pseudoflava является одним из немногих известных микроорганизмов, способных продуцировать сополимер с включениями мономеров 4ГБ из структурно не связанных источников углерода. Используя в качестве субстрата L-арабинозу, штамм синтезировал терполимер поли(3-гидроксибутират-*co*-3-гидроксивалерат-*co*-4-гидроксибутират) (П(3ГБ-*co*-3ГВ-*co*-4ГБ)) с содержанием ПГА 45,3 % [31].

До сих пор сообщалось о нескольких штаммах бактерий дикого типа, способных продуцировать сополимер П(3ГБ-*co*-4ГБ): *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Comamonas acidovorans*, *Comamonas testosteroni* и *Hydrogenophaga pseudoflava* [32]. *Cupriavidus necator* является водородокисляющей бактерией, имеет отличные показатели накопления ПГА в клетке. Синтез сополимеров П(3ГБ-*co*-4ГБ) *C. necator* с использованием различных источников углерода таких как ацетат, бутират, пропионат, глюкоза, фруктоза, отходы промышленности и сельскохозяйственных производств, с добавлением прекурсора или без него, осуществим, однако выход ПГА пока остается низким [33].

Синтез гомополимера П(4ГБ) требует генерации мономера 4ГБ-КоА. Используя структурно неродственные источники углерода, такие как глюкоза, 4ГБ-КоА синтезируется из сукцинил-КоА [33].

Чаще всего гены, участвующие в пути генерации 4ГБ-КоА, отсутствуют или подавлены у микроорганизмов, и, таким образом, они не способны синтезировать гомополимер П(4ГБ) из неродственных источников углерода. Это обуславливает необходимость добавления структурно родственных прекурсоров 4ГБ для включения мономеров 4ГБ в полимерную цепь [31].

1.4.2 Добавка прекурсоров для получения сополимеров, содержащих 4ГБ

Добавки прекурсоров являются наиболее важным шагом для синтеза сополимеров с включениями мономеров 4ГБ для многих микроорганизмов.

Чаще всего в качестве прекурсоров мономеров 4ГБ выступают: γ -бутиролактон, 1,4-бутандиол и 1,6-гександиол. Эти предшественники метаболизируются с образованием 4ГБ, а затем 4ГБ превращается в 4ГБ-КоА с помощью 4ГБ-КоА: КоА-трансферазы.

Впервые синтез 4ГБ-содержащего ПГА-полимера наблюдался у *Cupriavidus necator*. Штамм продуцировал П(3ГБ) в присутствии источников углерода, таких как фруктоза или масляная кислота. Добавление γ -бутиролактона приводило к синтезу сополимера П(3ГБ-*co*-4ГБ). Сам по себе γ -бутиролактон увеличивал содержание 4ГБ до 21,0 мол. % в полимере. Однако, совместная подача γ -бутиролактона и фруктозы снижала содержание 4ГБ до 4,0 мол. %, так как фруктоза приводила к образованию большего количества 3ГБ-КоА. В свою очередь смесь γ -бутиролактона и масляной кислоты давала более высокую молярную долю 4ГБ (24,0 мол. %), что указывает на то, что масляная кислота также способствовала образованию мономера 4ГБ-КоА [34].

После этого было изучено несколько стратегий подачи прекурсоров для достижения более высокого содержания 4ГБ в полимерах ПГА. Например, культивирование с использованием цитрата, сульфата аммония и 4-гидроксимасляной кислоты приводило к синтезу гомополимера П(4ГБ) в *S. necator*. К сожалению, содержание П(4ГБ) было очень низким (до 2,0%) [35]. Вместо этого добавление *n*-алкановой кислоты, такой как пропионовая кислота, в присутствии сульфата аммония и 4-гидроксимасляной кислоты увеличивало содержание гомополимера П(4ГБ) до 34,0% [36].

Comamonas acidovorans продуцировали сополимер П(3ГБ-*co*-4ГБ) из 4-гидроксимасляной кислоты и глюкозы или 3-гидроксимасляной кислоты. Кроме того, они продуцировали терполимер П(3ГБ-*co*-3ГБ-*co*-4ГБ) из 1,4-бутандиола и пентанола [37]. Интересно, что штамм продуцировал 28,0% гомополимера П(4ГБ) с использованием 1,4-бутандиола или 4-

гидроксимасляной кислоты в качестве единственного источника углерода [35].

Azohydromonas lata является природным продуцентом П(ЗГБ). В присутствии сахарозы и γ -бутиролактона штамм продуцировал П(ЗГБ-*co*-4ГБ) [38]. Эффективность превращения γ -бутиролактона в мономер 4ГБ составила почти 60,0%.

H. pseudoflava продуцирует П(ЗГБ) из глюкозы [31]. Добавление γ -бутиролактона приводило к включению 4ГБ до 66,0 мол. %. Кроме того, был также использован ϵ -капролактон в качестве предшественника 4ГБ при использовании глюкозы в качестве основного источника углерода и получено до 20,0 мол. % 4ГБ

С 2000 года все больше и больше микробных штаммов исследуются для синтеза сополимеров с включениями 4ГБ с использованием смеси прекурсоров 4ГБ различного состава. Комбинация 1,4-бутандиола и γ -бутиролактона обеспечила синтез П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с содержанием 4ГБ до 84,0 мол. % у *Cupriavidus malaysiensis* [39]. *C. malaysiensis* продуцировал 70,0 % П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с фракциями 4ГБ в диапазоне от 31,0 до 41,0 мол. % при использовании смеси 1,4-бутандиола и 1,6-гександиола [40].

Используя источники углерода, такие как пропионовая кислота или масляная кислота с 4-гидроксимасляной кислотой в присутствии α -аминокислот, *S. necator* продуцировал П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с 72–86 мол. % 4ГБ [36].

Все эти ранние исследования установили важность добавок прекурсоров для улучшения фракции 4ГБ в полимерах, содержащих 4ГБ.

1.4.3 Использование различных субстратов для синтеза сополимера П(ЗГБ-*co*-4ГБ)

Из-за высокой стоимости углеродного субстрата предпринимаются многочисленные усилия по получению дешевого сырья для производства сополимера П(ЗГБ-*co*-4ГБ). *S. necator* способен синтезировать сополимер поли(3-гидроксibuтират-*co*-4-гидроксibuтират), используя недорогие

субстраты, включая отработанное пальмовое масло и отработанный глицерин [41]. Используя отработанное пальмовое масло, оставшееся после жарки, и 1,4-бутандиол, штамм продуцировал П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с 15,0 мол. % 4ГБ [42]. Аналогичным образом, при использовании отработанного глицерина биодизельного завода и γ -бутиролактона было получено П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с включением 4ГБ до 21,5 мол. % [43]. Кроме того, при добавлении γ -бутиролактона и соевого масла *S. necator* продуцировал П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с молярными фракциями 4ГБ в диапазоне от 6 до 10,0 мол. % [44]. Глицериновый пек является обычным отходом, образующимся в олеохимической промышленности. *Cupriavidus* sp. USMANM13 продуцировал П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с молярной долей 4ГБ 43,0 мол. % с использованием глицериновой смолы и 1,4-бутандиола [45]. Гидролизаты пшеничной соломы служат отличным субстратом для производства ПГА в *Burkholderia sacchari*. При использовании γ -бутиролактона и гидролизатов пшеничной соломы штамм накапливал П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с 5,0 мол. % 4ГБ [28]. При комбинации глюкозы и γ -бутиролактона, рекомбинантный *H. bluephagenesis*, синтезировал П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с выходом биомассы 81,4 г/л, содержанием полимера – 73,8% и включением 4ГБ – 11,6 мол. % [46]. При замене глюкозы отходами глюконата, полученными при переработке кукурузного крахмала, штамм продуцировал 68,1 г/л биомассы, содержащей 70,6% П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с 12,4 мол. % 4ГБ.

1.4.4 Параметры культивирования, влияющие на синтез сополимера П(ЗГБ-*co*-4ГБ)

Помимо типа источника углерода, синтез полимеров в значительной степени зависит от условий культивирования. Производство сополимера П(ЗГБ-*co*-4ГБ) в *S. necator* было улучшено за счет использования стратегии DO-stat для совместной подачи фруктозы и γ -бутиролактона [47]. В экспериментах с колбами с использованием фруктозы и γ -бутиролактона была получена молярная фракция 4ГБ до 27,4 мол. %, но более высокие

концентрации обоих субстратов ингибировали рост клеток. Кроме того, в присутствии стимулятора, такого как пропионат или ацетат, была достигнута молярная фракция 4ГБ 53,0 мол. %, но синтез ПГА (0,27 г/л) был значительно снижен. Тем не менее, стратегия периодического добавления субстрата улучшила выход полимера, поскольку выход ПГА в диапазоне 14,0–24,4 г/л был получен путем изменения соотношения фруктозы и γ -бутиролактона в питательном растворе.

Азот играет важную роль на процесс накопления ПГА в бактериальных клетках. Используя различные соединения азота (хлорид аммония, сульфат аммония, нитрат аммония, мочевины, дрожжевой экстракт) удалось изучить их влияние на рост бактерий *V. megaterium* и содержание полимера. В присутствии мочевины концентрация биомассы составила – 4,6 г/л, содержание полимера – 21%. Концентрация биомассы на хлориде аммония была ниже (4,2 г/л), чем на мочевины, но существенной разницы в накоплении ПГА не наблюдалось. Среди используемых источников азота нитрат аммония меньше всего способствовал накоплению полимера (11% при концентрации биомассы 3,9 г/л) [48].

Аналогичным образом соотношение субстратов повлияло на молярную долю 4ГБ в П(3ГБ-*co*-4ГБ) в *S. necator* A-04 [49]. Используя смесь γ -гидроксимасляной кислоты и масляной кислоты в качестве источника углерода и сульфата аммония в качестве источника азота, путем изменения отношения C/N были получены различные композиции мономеров. При высоком соотношении C/N, т.е. в условиях дефицита азота, предпочтение отдавалось включению 3ГБ, тогда как при низком соотношении C/N (т.е. при условии достаточного количества азота) предпочтение отдавалось 4ГБ. Отношение C/N, равное 4, привело к молярной доле 4ГБ 70,0 мол. % в *S. necator* A-04.

Варьирование источников азота также оказало большое влияние на включение мономеров 4ГБ в состав сополимера, синтезированного

Cupriavidus sp. USMAN13. Из всех используемых источников азота (сульфат аммония, молибдат аммония, ацетат аммония, нитрат аммония, хлорид аммония и мочевины) благоприятно повлиявших на рост бактерий и синтез сополимера П(3ГБ-*co*-4ГБ), наибольший эффект накопление мономера 4ГБ оказал ацетат аммония (44,0 мол. %)[50]. Концентрация биомассы и содержание полимера на данном источнике азота составили 5,7 г/л и 35% соответственно, которые также превышают значения по сравнению с другими источниками азота: молибдат аммония (2,7 г/л, 34%, 19% мол. %), сульфат аммония (4,9 г/л, 31%, 27 мол. %), мочевина (4,9 г/л, 29%, 29 мол. %), нитрат аммония (5,2 г/л, 30%, 27 мол. %), хлорид аммония (5,5 г/л, 25%, 29 мол. %).

Дробная подача предшественника 4ГБ позволила увеличить включения 4ГБ в сополимере П(3ГБ-*co*-4ГБ), синтезированным *Burkholderia sacchari* [51]. Добавление γ -бутиролактона в концентрации 10 г/л на начальной фазе накопления полимера, с последующим его постоянным добавлением со скоростью, аналогичной его расходу, обеспечивало максимальное включение 7,1 мол. % 4ГБ.

В совокупности синтез поли(3-гидроксибутират-*co*-4-гидроксибутират), содержащего желаемую долю 4ГБ, напрямую связан с составом и концентрацией субстратной смеси и параметрами культивирования.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Культивирование бактерий

В ходе эксперимента был использован штамм бактерий *Cupriavidus necator B-10646*. Бактерии выращивали в стеклянных колбах на 500 мл, заполняя культурой на 40 % от объема. Культивирование проводилось на солевой среде Шлегеля следующего состава:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (натрий фосфорнокислый) - 9,0 г/л;
- KH_2PO_4 (калий фосфорнокислый) - 1,5 г/л;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (сульфат магния) - 0,2 г/л;
- $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \times \text{H}_2\text{O}$ (железо лимоннокислое) – 5,0 г/л.
- Микроэлементы вводятся из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 л среды.

В качестве источника углерода выступали фруктоза в концентрации 15 г/л и ацетат натрия в концентрациях 5,0 г/л и 2,0 г/л. Для синтеза мономера 4ГБ в качестве прекурсора в составе питательной среды использовали ϵ -капролактон. В зависимости от эксперимента его добавляли в концентрации 1,0 г/л на 0, 24 и 48 час культивирования.

В роли источников азота были использованы хлорид аммония, сульфат аммония, мочевины, пептон, дрожжевой экстракт, ацетат аммония в концентрации 1,0 г/л.

Ферментацию проводили в термостатируемом шейкере-инкубаторе «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США), культивирование проводили при 30 °С и 200 об/мин. Время культивирования составляло 72 ч. В роли контрольных точек были выбраны: 24, 48 и 72 часы культивирования.

Прирост биомассы бактериальных клеток в процессе культивирования отмечали по оптической плотности культуры и концентрации сухой биомассы.

Для этого необходимо было проводить регулярный отбор образцов в течение всего культивирования для последующего анализа.

2.2 Определение оптической плотности

Оптическую плотность культуры определяли на спектрофотометре UNICO-2100 (Юнико-2100) при $\lambda=440$ нм и длине оптического пути 1 мм; для измерения оптической плотности к культуре бактерий добавляли дистиллированную воду в соотношении 1:5.

2.3 Определение концентрации фруктозы в среде

Концентрацию фруктозы определяли, используя резорциновый метод.

Для этого отбирали 2 мл культуральной жидкости, центрифугировали при 6000 об/мин 2 минуты (Centrifuge 5417 R, «Eppendorf», Германия). Затем 0,5 мл надосадочной жидкости отбирали и доводили дистиллированной водой до 25 мл. К 1 мл приготовленной пробы добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина и 3 мл 80 % раствора соляной кислоты. В качестве контроля использовали дистиллированную воду, смешанную с растворами резорцина и соляной кислоты. Пробирки выдерживали на водяной бане 20 минут при $t=80$ °С. Затем охлаждали до комнатной температуры. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре UNICO-2100 при длине волны 540 нм (длина оптического пути 5 мм). Концентрацию фруктозы определяли по предварительно построенному калибровочному графику.

2.4 Определение концентрации биомассы

Концентрацию биомассы бактерий определяли с помощью весового метода. Для этого 20 мл бактериальной суспензии центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) 7 мин при 6500 об/мин, после чего осадок промывали дистиллированной водой и вновь центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия). Повторяли этапы трижды. Полученную биомассу переносили в предварительно доведенные до постоянного веса бюксы. Далее бюксы с биомассой размещали в сушильном

шкафу Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) при 105 °С 24 ч. После этого охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах Adventurer, «OHAUS», США. Биомасса бактерий определялась, как разница между весом бюкса, содержащим биомассу, и его исходным весом.

2.5 Экстракция полимера

Для выделения полимера 150 мл культуры из каждой колбы поочередно центрифугировали 6 мин при 6500 об/мин (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия). К осадку приливали 10 мл спирта и 30 мл хлороформа и переносили в конические колбы объемом 100 мл. Экстракцию проводили в течении 24 часов, после чего фильтровали. Растворитель удаляли на вакуумном роторном испарителе Rotavapor R-210 (BUCHI). Осаждение полимера проводили с помощью гексана. Высушивали и взвешивали полученный полимер.

2.6 Определение содержания полимера и включений 4ГБ

Для определения общего содержания полимера к навеске 3,9-4,5 мг сухой биомассы добавляли 0,85 мл метанола, 1 мл внутреннего стандарта и 0,15 мл концентрированной серной кислоты. Затем смеси выдерживали на водяной бане под обратным холодильником 2 ч 40 мин. По окончании метанолиза добавляли 1 мл дистиллированной воды и оставляли в холодильнике для расслоения фаз. Общее содержание полимера и его состава в биомассе определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза проб сухой биомассы на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 7890A с масс детектором Agilent Technologies 5975C («Agilent», США).

2.7 Определение физических характеристик полимера

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера определяли с использованием гельпроникающей хроматографии (Agilent Technologies 1260 Infinity, США). Определяли средневесовую (M_w) молекулярную массу и полидисперсность (D).

Термический анализ ПГА осуществляли с использованием дифференциального сканирующего калориметра ДСК-1 и термогравиметрического анализатора ТГА (оба от Mettler Toledo, Германия). Образцы ПГА в виде порошка весом $4,0 \pm 0,2$ мг помещали в алюминиевые тигли и подвергали нагреву со скоростью $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ до температуры 200°C . Затем образцы охлаждали до -20°C , выдерживали в течение 20 минут и снова нагревали до 320°C . Температуры плавления и деградации определяли на основе характеристических пиков на термограммах, анализ которых проводился с помощью программы «StarE».

Степень кристалличности полигидроксиалканоатов определяли при помощи рентгеновского спектрометра D8 ADVANCE (от «Bruker», Германия). Запись спектров проводилась с интервалом в $0,04^\circ$ и выдержкой 2 секунды на каждую точку измерения. Для расчета степени кристалличности использовалось специализированное программное обеспечение Bruker AXS TOPAS v.4.2 (Германия).

2.8 Статистическая обработка результатов

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

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Страницы 24-33 изъяты в связи с авторским правом.

ВЫВОДЫ

Среди исследованных органических и неорганических источников азота, максимальное включение 4ГБ при сохранении высоких показателей биомассы и полимера показано в присутствии ацетата аммония.

Добавление ϵ -капролактона в различных режимах в культуру бактерий позволило получить сополимеры П(ЗГБ-*co*-4ГБ) с включением 4ГБ до 33,05 мол. % при сохранении высоких показателей концентрации биомассы и содержания полимера.

Средневесовая молекулярная масса (M_v) сополимеров составляла 320-417 кДа, при этом отсутствовала четкая взаимосвязь между содержанием 4ГБ и M_v . Увеличение содержания 4ГБ приводит к снижению степени кристалличности (C_x) (с 73% для П(ЗГБ) до 48% для сополимера с включением 4ГБ 33,1 мол. %).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПГА – полигидроксиалканоаты

П(ЗГБ) – поли(3-гидроксибутират)

П(4ГБ) –поли(4-гидроксибутират)

4ГБ– 4-гидроксибутират

3ГБ– 3-гидроксибутират

3ГВ– 3-гидроксивалерат

П(3ГБ-со-4ГБ) – поли(3-гидроксибутират-со-4-гидроксибутират)

П(3ГБ-со-3ГВ) – поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат)

П(3ГБ-со-3ГГ) –поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксигексаноат)

П(3ГО) –поли(3-гидроксиоктаноат)

Д – полидисперсность

M_v – средневесовая молекулярная масса

C_x – степень кристалличности

$T_{дегр}$ –температура деградации

$T_{пл}$ – температура плавления

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. 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.
2. M. Wagner, C. Scherer, D. Alvarez-Muñoz, N. Brennholt, X. Bourrain, S. Buchinger, E. Fries, C. Grosbois, J. Klasmeier, T. Marti, S. Rodriguez-Mozaz, R. Urbatzka, A. D. Vethaak, M. Winther-Nielsen, G. Geifferscheid, Microplastics in freshwater ecosystems: What we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur.* 26, 12 (2014)
3. Geyer R. Production, use, and fate of synthetic polymers // *Plastic waste and recycling*. – Academic Press, 2020. – С. 13-32.
4. Dietrich K. et al. Producing ПГАs in the bioeconomy—Towards a sustainable bioplastic // *Sustainable production and consumption*. – 2017. – Т. 9. – С. 58-70
5. Rathbone S, Furrer P, Lubben J, Zinn M, Cartmell S: Biocompatibility of polyhydroxyalkanoate as a potential material for ligament and tendon scaffold material. *J Biomed Mater Res.* 2010, 93A: 1391-1403
6. Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Brauneegg, G. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (ПГА) biopolyesters in a sustainable manner // *New biotechnology*. – 2017. Т. 37. – С. 24-38.
7. Andrew J. Cal, Rena E. Kibblewhite, W. Dirk Sikkema, Lennard F. Torres, William M. Hart-Cooper, William J. Orts, Charles C. Lee, Production of polyhydroxyalkanoate copolymers containing 4-hydroxybutyrate in engineered *Bacillus megaterium*, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 168, 2021, Pages 86-92

8. Mitra R, Xiang H, Han J. Current Advances towards 4-Hydroxybutyrate Containing Polyhydroxyalkanoates Production for Biomedical Applications. *Molecules*. 2021
9. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // *Proc. Biochem.* - 2004. – С. 607 – 619.
10. Polyhydroxyalkanoates (ПГА): From production to nanoarchitecture / R. Tarrahi, Z. Fathi, M. Ö. Seydibeyoğlu [et al.] – 2020. – Vol. 146. – P. 596-619
11. Жила, Н. О. Характеристика культуры *Cupriavidus eutrophus* в-10646, синтезирующей полигидроксиалканоаты при росте на сахарах и липидных субстратах / Н.О. Жила, Т.Г. Волова, Г.С. Калачева; *Журнал Сибирского федерального университета. Биология.* – Красноярск: СФУ, 2014. – 161- 173 с.
- 12 . Reddy C.S.K., Ghai R., Kalia V. Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresour. Technol.* 2003;87: 137–146.
13. Chen G.Q., Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*. 2005;26: 6565–6578.
14. Steinbüchel A., Lütke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem. Eng. J.* 2003; 16:81–96.
15. Huang P., Okoshi T., Mizuno S., Hiroe A., Tsuge T. Gas chromatography-mass spectrometry-based monomer composition analysis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates biosynthesized by *Pseudomonas* spp. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2018;82: 1615–1623.
16. Barbosa J.L., Perin G.B., Felisberti M.I. Plasticization of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with an Oligomeric Polyester: Miscibility and Effect of the Microstructure and Plasticizer Distribution on Thermal and Mechanical Properties. *ACS Omega*. 2021;6: 3278–3290.
17. Han J., Wu L.P., Liu X.B., Hou J., Zhao L.L., Chen J.Y., Zhao D.H., Xiang H. Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly (3-

hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers. *Biomaterials*. 2017; 139:172–186.

18. Martin DP, Williams SF: Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochem Eng J*. 2003, 16: 97-105.

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

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

21 . Киселев Е. Г. Техничко-технологические основы производства разрушаемых полигидроксиалканоатов / Е.Г. Киселев, О.Н. Шишацкий, С. Э. Дж; Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – Красноярск: СФУ, 2012. – 161-173 с.

22. Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D., Radecka, I., 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* 102, 1437-1449.

23. Anbreen Anjum, Mohammad Zuber*, Khalid Mahmood Zia*, Aqdas Noreen, Muhammad Naveed Anjum, Shazia Tabasum, Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) and copolymers: A review of recent advancements. / *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – Vol. 89. – P. 161–174

24. Anbreen Anjum, Mohammad Zuber, Khalid Mahmood Zia*, Aqdas Noreen, Muhammad Naveed Anjum, Shazia Tabasum, Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHA) and copolymers: A review of recent advancements. / *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – Vol. 89. – P. 161–174

25. Ciesielski S, Mozejko J, Pisutpaisal N. Plant oils as promising substrate for polyhydroxyalkanoates production. *Clean J Prod.* 2015;106:408–421.

26. Sehgal R, Gupta R. Polyhydroxyalkanoate and its efficient production: an eco-friendly approach towards development. *3 Biotech.* 2020 Dec;10(12):549

27. M. Teresa Cesário, Rodrigo S. Raposo, M. Catarina M.D. de Almeida, Frederik van Keulen, Bruno S. Ferreira, João P. Telo, M. Manuela R. da Fonseca, Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 71, 2014, Pages 59-67

28. Cesário M.T., Raposo R.S., de Almeida M.C.M., Van Keulen F., Ferreira B.S., Telo J.P., da Fonseca M.M.R. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014;71:59–67.

29. Adriana Kovalcik, Jiri Smilek, Michal Machovsky, Michal Kalina, Vojtech Enev, Hana Dugova, Nicole Cernekova, Maria Kovacova, Zdenko Spitalsky, Properties and structure of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) filaments for fused deposition modelling, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 183,2021, Pages 880-889

30. Ramachandran H., Iqbal N.M., Sipaut C.S., Abdullah A.A.A. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer with various monomer compositions by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011;164:867–877.

31 . Choi M.H., Song J.J., Yoon S.C. Biosynthesis of copolyesters by *Hydrogenophaga pseudoflava* from various lactones. *Can. J. Microbiol.* 1995;41:60–67.

32. Le Meur S., Zinn M., Egli T., Thöny-Meyer L., Ren Q. Poly (4-hydroxybutyrate) (P4HB) production in recombinant *Escherichia coli*: P4HB synthesis is uncoupled with cell growth. *Microb. Cell Fact.* 2013;12:1–11.

33. Zhou X.Y., Yuan X.X., Shi Z.Y., Meng D.C., Jiang W.J., Wu L.P., Chen J.C., Chen G.Q. Hyperproduction of poly (4-hydroxybutyrate) from glucose by recombinant *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* 2012;11:1–8
34. Doi Y., Segawa A., Kunioka M. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 1990;12:106–111.
35. Saito Y., Nakamura S., Hiramitsu M., Doi Y. Microbial synthesis and properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) *Polym. Int.* 1996;39:169–174.
36. Kimura H., Ohura T., Takeishi M., Nakamura S., Doi Y. Effective microbial production of poly (4-hydroxybutyrate) homopolymer by *Ralstonia eutropha* H16. *Polym. Int.* 1999;48:1073–1079.
37. Kimura H., Yoshida Y., Doi Y. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Pseudomonas acidovorans*. *Biotechnol. Lett.* 1992;14:445–450.
38. Hiramitsu M., Koyama N., Doi Y. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*. *Biotechnol. Lett.* 1993;15:461–464.
39. Vigneswari S., Nik L.A., Majid M.I.A., Amirul A.A. Improved production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer using a combination of 1, 4-butanediol and γ -butyrolactone. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010;26:743–746.
40. Huong K.H., Teh C.H., Amirul A.A. Microbial-based synthesis of highly elastomeric biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) thermoplastic. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017;101:983–995.
41. Muigano, Martin N., Anami, Sylvester E., Onguso, Justus M., Mauti, Godfrey O., Optimized Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) Production by Moderately Haloalkaliphilic Bacterium *Halomonas alkalicola* Ext, *International Journal of Polymer Science*, 2024, 6667843, 17 pages, 2024.

42. Rao U., Sridhar R., Sehgal P.K. Biosynthesis and biocompatibility of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. *Biochem. Eng. J.* 2010;49:13–20.

43. Cavaleiro J.M., Raposo R.S., de Almeida M.C.M., Cesário M.T., Sevrin C., Grandfils C., Da Fonseca M.M.R. 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. *Bioresour. Technol.* 2012;111:391–397.

44. Park D.H., Kim B.S. Production of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* from soybean oil. *New Biotechnol.* 2011;28:719–724.

45. Ramachandran H., Amirul A.A. Yellow-pigmented *Cupriavidus* sp., a novel bacterium capable of utilizing glycerine pitch for the sustainable production of P (3HB-co-4HB) *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2013;88:1030–1038.

46. Huang W., Wang D., Chen F., Yin J., Li T., Zhang H., Chen G.Q. Pilot scale-up of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by *Halomonas bluephagenesis* via cell growth adapted optimization process. *Biotechnol. J.* 2018;13:1800074.

47. Kim J.S., Lee B.H., Kim B.S. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. *Biochem. Eng. J.* 2005;23:169–174.

48. Lokesh BE, Hamid ZAA, Arai T, Kosugi A, Murata Y, Hashim R, Sulaiman O, Mori Y, Sudesh K: Potential of oil palm trunk sap as a novel inexpensive renewable carbon feedstock for polyhydroxyalkanoate biosynthesis and as a bacterial growth medium. *Clean – Soil, Air, Water.* 2012, 40 (3): 310-317.

49. Chanprateep S., Katakura Y., Visetkoop S., Shimizu H., Kulpreecha S., Shioya S. Characterization of new isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyester poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008;35:1205–1215.

50. Ramachandran H, Amirul AA. Bioconversion of glycerine pitch into a novel yellow-pigmented P(3HB-co-4HB) copolymer: synergistic effect of ammonium acetate and polymer characteristics. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014 Jan;172(2):891-909.

51. Raposo R.S., de Almeida M.C.M., da Fonseca M.M.R., Cesário M.T. Feeding strategies for tuning poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) monomeric composition and productivity using *Burkholderia sacchari*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017;105:825–833.

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

« 21 » июня 2024г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

Синтез полимера поли(3-гидроксibuтират-co-4-гидроксibuтират)
бактериями *Cupriavidus necator* B-10646 на среде с различными источниками
азота

Научный руководитель



к.б.н., доцент

Н.О.Жила

подпись, дата

должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Студент ББ20-04Б, №042049333



А.Г.Беглюк

подпись, дата

инициалы, фамилия

Красноярск 2024