

УДК 574.4

## СИНТЕЗ СОПОЛИМЕРОВ 3-ГИДРОКСИБУТИРАТА-СО-4-ГИДРОКСИБУТИРАТА ВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ

© 2011 г. Т. Г. Волова\*, Н. О. Жила\*\*, Г. С. Калачёва\*\*, В. А. Соколенко\*\*\*, Э. Дж. Сински\*\*\*\*

\*Сибирский федеральный университет, Красноярск, 660041

e-mail: volova45@mail.ru

\*\*Институт биофизики Сибирского отделения РАН, Красноярск, 660036

\*\*\*Институт химии и химической технологии Сибирского отделения РАН, Красноярск, 660036

\*\*\*\*Массачусетский технологический институт, Кембридж, Массачусетс, США, 02139

Поступила в редакцию 21.01.2011 г.

Исследован синтез сополимера 3- и 4-гидроксибутирата (ЗГБ-СО-4ГБ) как наиболее перспективного представителя семейства биоразрушаемых полигидроксиалканоев (ПГА). С использованием природных штаммов водородокисляющих бактерий *Ralstonia eutropha* B5786 и *Cupriavidus eutrophus* B10646 найдены условия культивирования для эффективного синтеза сополимера ЗГБ-СО-4ГБ. Получена серия высокоочищенных образцов сополимера ЗГБ-СО-4ГБ с различным содержанием 4ГБ (от 8.7 до 24.3 мол. %). Установлено, что включение 4ГБ в сополимер в большей степени, нежели 3-гидроксивалерат и 3-гидроксигексаноат, приводит к снижению кристалличности сополимера; получены образцы, имеющие степень кристалличности ниже 30%. Показано, что средневесовая молекулярная масса сополимеров ЗГБ-СО-4ГБ не зависит от соотношения мономеров и варьирует в широких пределах (от 540 до 1110 кДа).

В настоящее время уделяется значительное внимание исследованию синтеза микроорганизмами резервных полимеров — гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоев, ПГА). Связано это с комплексом высоких потребительских свойств, характерных для данного класса полимеров. ПГА представлены разнообразными полиэфирами, образованными однородными мономерами с различной длиной С-цепи, а также сополимерами, среди них — высококристаллические термопласты и термолабильные резиноподобные эластомеры [1]. Направленный синтез ПГА — весьма сложная технологическая задача, поэтому для получения ПГА заданного состава необходимы фундаментальные знания о закономерностях синтеза ПГА того или иного состава и о влиянии химической структуры полимеров на их физико-химические свойства.

Бактерии *Ralstonia eutropha* относят к перспективным продуцентам, так как они накапливают ПГА с высокими выходами на различных субстратах, включая отходы промышленных и сельскохозяйственных производств [2–5]. Доминирующим мономером в ПГА, синтезируемых природными штаммами *Ralstonia eutropha*, однако, является короткоцепочечный 3-гидроксибутират, выходы которого могут достигать в специализированных режимах до 80–90% от веса сухой биомассы [6]. До недавнего времени описанные в литературе

достигнутые уровни включения среднецепочечных мономеров (например, 3-гидроксигексаноата, 3-гидроксиоктаноата) в многокомпонентные ПГА не превышали у *R. eutropha* 1–2 мол. % [7–10]. В результате исследований закономерностей образования ПГА у бактерий *R. eutropha* B5786 нами предложено два подхода для синтеза полимеров различной структуры. Один подход базируется на параметрически управляемом культивировании бактерий с использованием комплексного углеродного субстрата с учетом знаний о том, что скорости синтеза общего пула полимера (главным образом, 3-гидроксибутирата), не совпадают со скоростью синтеза мономеров с более длинной С-цепью, а также, что соотношение мономеров в ПГА непостоянно, и максимальная величина включения, например 3-гидроксигексаноата, наблюдается через несколько часов после добавки дополнительного субстрата (соли алкановых кислот) в культуру. Следует учитывать также, что подобные субстраты-добавки, стимулирующие образование многокомпонентных ПГА, токсичны для бактерий, поэтому их использование возможно в установленных для штаммов индивидуальных предельно допустимых концентрациях [11]. Другой подход основан на метаболической регуляции путей биосинтеза ПГА с ингибированием реакций цикла  $\beta$ -окисления, что препятствует укорачиванию С-цепи среднецепочечных мономеров в реакциях  $\beta$ -окисления и, сле-

довательно, обеспечивает накопление их в клеточном пуле и последующее включение в ПГА. В результате реализованы режимы, позволившие синтезировать спектр многокомпонентных ПГА, в том числе новой химической структуры [12].

Одним из перспективных, но трудно синтезируемым и мало изученным ПГА является сополимер 3-гидроксибутирата-СО-4-гидроксибутирата (**ЗГБ-СО-4ГБ**). Для этого типа ПГА характерны высокие скорости биодеградации *in vivo* и в окружающей среде, он является эластомером, имеет более высокие показатели удлинения при разрыве и относительно высокий предел прочности на разрыв в отличие от большинства общеизвестных полимеров этого класса [13]. Способность микроорганизмов (*Ralstonia eutropha*, ранее *Alcaligenes eutrophus* [14], *Alcaligenes latus* [15], *Comamonas testosteronii* [16], *Comamonas acidovorans* [17], *Hydrogenophaga pseudoflava* [18], *Chromobacterium* sp. [19], *Rhodococcus ruber* [20]) синтезировать этот тип ПГА при росте на средах, содержащих в качестве углеродного субстрата 4-гидроксимасляную кислоту,  $\gamma$ -бутиролактон или 1,4-бутандиол, показана в серии работ еще в 90-е годы прошлого века. Однако ингибирующее воздействие этих субстратов отрицательно сказывается на общем урожае биомассы и выходах сополимера. В последние годы изучение этого представителя ПГА активизировалось. В качестве новых продуцентов сополимера ЗГБ-СО-4ГБ описаны рекомбинантные и природные штаммы [21–24].

Цель работы – исследование возможности получения нового типа сополимера ЗГБ-СО-4ГБ с различным содержанием 4-гидроксибутирата (**4ГБ**) природными штаммами водородокисляющих бактерий на среде с  $\gamma$ -бутиролактоном и оценка влияния фракции 4ГБ на свойства сополимера.

#### МЕТОДИКА

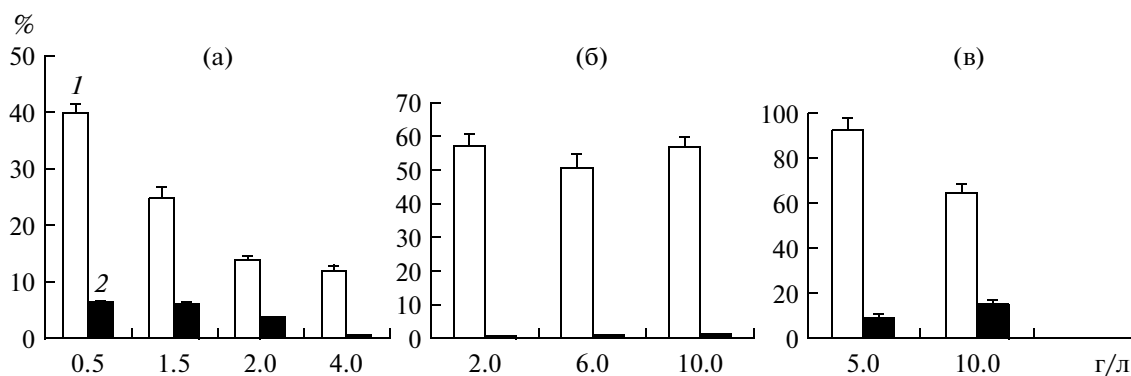
Исследованы 2 штамма водородокисляющих бактерий: *Ralstonia eutropha* B5786 [25] и *Cupriavidus eutrophus* B10646, которые культивировали в строго стерильном периодическом режиме на термостатируемой качалке “New Brunswick” (США) в стеклянных колбах объемом 1.0 л с коэффициентом заполнения 0.5 на минеральной солевой среде Шлегеля (г/л):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 9.1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 0.2,  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.025. Микроэлементы вводили в среду по прописи Хоагленда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит (г/л):  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0.228,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.030,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0.008,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.008,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.176,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.05,  $\text{NiCl}_2$  – 0.008. В автотрофных условиях в качестве источника углерода и

энергии использовали смесь газов ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$ ). С помощью компрессора удаляли из колб воздух, замещая объем газовой смесью из газгольдера, соединенного с колбами системой герметичных шлангов. Соотношение компонентов в газовой смеси было следующим:  $\text{CO}_2$ – $\text{O}_2$ – $\text{H}_2$  как 1 : 2 : 7 по объему. При гетеротрофных условиях выращивания бактерий использовали фруктозу или масляную кислоту. Применяли разработанный ранее режим культивирования бактерий с лимитированием роста по азоту на первом этапе (0.4–0.5 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) и в безазотной среде – на втором, при pH 7.0 и 30°C [26]. Для стимулирования образования мономеров 4ГБ и синтеза сополимеров ЗГБ-СО-4ГБ в состав среды в качестве предшественника мономеров 4ГБ вносили  $\gamma$ -бутиролактон (“Fluka”, Германия). Длительность культивирования штаммов в зависимости от условий углеродного питания культур в отдельных экспериментах составляла от 48 до 144 ч. Подачу  $\gamma$ -бутиролактона в культуру варьировали как по количеству, так и концентрации добавок.

Концентрацию фруктозы в среде определяли реорциновым методом [27]. Урожай биомассы регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры. Содержание сополимера в клетках определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза биомассы на хромато-масс-спектрометре Agilent 5975 Inert, “Agilent” (США); в качестве внутреннего стандарта использовали бензойную кислоту. Для корректного определения соотношения мономеров 3- и 4-гидроксибутирата в сополимере, помимо регистрации масс-спектров, сняты  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры растворов сополимера в  $\text{CDCl}_3$  (ЯМР-спектрометр Avance III 600 “Bruker” (Германия). Текущую концентрацию  $\gamma$ -бутиролактона в культуре анализировали хроматографически.

Рентгеноструктурный анализ и определение степени кристалличности образцов ПГА выполнены на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE “Bruker” (Германия) (графитовый монохроматор на отраженном пучке). Для этого сняты спектры в пошаговом режиме (“scan-step”) с шагом  $0.04^\circ$  и 2-секундной выдержкой для измерения интенсивности в точке (режим работы прибора – 40 кВ  $\times$  40 мкА).

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение ПГА исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии Breeze System (“Waters”, США) относительно полистироловых стандартов (“Fluka”, Швейцария, Германия). Находили средневесовую ( $M_w$ ) и среднечисловую ( $M_n$ ) молекулярную массу, а также полидисперсность ( $PD = M_w/M_n$ ).



**Рис. 1.** Выход сополимера 3-гидроксибутирата-СО-4-гидроксибутирата (% от веса сухой биомассы) (1) и содержание 4-гидроксибутирата в сополимере (мол. %) (2) в условиях автотрофной (а), гетеротрофной, субстрат – фруктоза (б) или масляная кислота (в) культуры бактерий *R. eutropha* B5786 при различных концентрациях  $\gamma$ -бутиролактона в среде (г/л).

Эксперименты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку результатов осуществляли общепринятыми методами [28] с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В автотрофной культуре *R. eutropha* B5786, выращиваемой в колбах на качалке, при дефиците в среде азота на моноуглеродном субстрате ( $\text{CO}_2$ ), урожай и выход полимера за 68 ч ферментации составили соответственно  $6.1 \pm 0.2$  г/л и  $65.4 \pm 4.2\%$ . В составе полимера, синтезированного штаммом *R. eutropha* B5786 на моноуглеродном субстрате, было 99.2 мол. % 3-гидроксибутирата и 0.8 мол. % 3-гидроксиивалерата. Ранее нами было показано, что более длительное культивирование бактерий в колбах, а также использование совершенной ферментационной техники позволяет увеличить выход полимера до 85–90% [29]. Однако в данном исследовании главный вопрос, на который следовало получить ответ, обладает ли данный штамм способностью включать в ПГА в качестве мономера 4ГБ и какие ростовые условия для культуры следует для этого обеспечить. Вопрос о выходе собственно биомассы в культуре был второстепенным, поэтому длительность культивирования в автотрофной культуре в колбах обычно не превышала 60–70 ч.

С учетом имеющихся данных о токсичности  $\gamma$ -бутиролактона [14] исследовано влияние концентрации этого дополнительного субстрата на рост и синтез ПГА *R. eutropha* B5786 в диапазоне концентраций от 0.5 до 4.0 г/л. Результаты биосинтеза ПГА и включения 4ГБ в сополимер на смешанном углеродном субстрате ( $\text{CO}_2 + \gamma$ -бутиролактон) представлены на рис. 1а, из которого следует, что  $\gamma$ -бутиролактон ингибировал рост и накопление полимера. Показано, что увеличение концентрации  $\gamma$ -бутиро-

лактона в среде не только не увеличивало содержание 4ГБ в сополимере, но ингибировало процесс превращения  $\gamma$ -бутиролактона в 4ГБ. Если при концентрации  $\gamma$ -бутиролактона в среде 0.5 г/л степень его превращения в 4ГБ составила 0.21, то при 4 г/л – менее 0.02. Эти результаты согласуются с данными других авторов по образованию 4ГБ из токсичного  $\gamma$ -бутиролактона. Так, у штамма *Cupriavidus* sp. USNAA1020 при росте только на  $\gamma$ -бутиролактоне степень его превращения в 4ГБ варьировала от 0.04 до 0.1 [30], у *Comamonas acidovorans* составила 0.12 [17], у *Hydrogenophaga pseudoflava* – 0.33 [18].

Независимо от величины добавки  $\gamma$ -бутиролактона, урожай культуры не превышал 5.0 г/л, что на 25–30% ниже контроля (рост бактерий в аналогичных условиях на моноуглеродном субстрате –  $\text{CO}_2$ ). При исследовании влияния добавок  $\gamma$ -бутиролактона на синтез полимера обнаружено дозозависимое снижение внутриклеточной концентрации полимера; при этом максимальный выход полимера ( $39.9 \pm 1.7\%$ ) получен при минимальной однократной добавке  $\gamma$ -бутиролактона в дозе 0.5 г/л. Синтезированный в этих условиях полимер содержал 3 мономера: доминирующий 3-гидроксибутират, 4ГБ и минорные включения 3-гидроксиивалерата. Наличие 4ГБ выявлено во всех пробах, максимальная величина включения этого мономера составила 6.3 мол. % (рис. 1а).

Для снижения токсического действия на культуру  $\gamma$ -бутиролактона использовали режим дробного дозирования. Варьируя величину подаваемой в культуру бактерий дозы  $\gamma$ -бутиролактона и последующее время культивирования, удалось повысить общий урожай бактерий, а также выход полимера. При двух добавках  $\gamma$ -бутиролактона (суммарная концентрация 6 г/л) выход полимера составил 55.7% от веса сухой биомассы без потери общей продуктивности культуры, однако величина вклю-

чения 4ГБ осталась на прежнем уровне и не превышала 6 мол. %. При подаче  $\gamma$ -бутиролактона в концентрации 9.0 г/л тремя добавками по 3 г/л с перерывами в 8 ч выход полимера составил 50.3% при общем урожае биомассы 6.0 г/л и аналогично низком (не выше 6 мол. %) содержании 4ГБ.

При гетеротрофном выращивании бактерий *R. eutropha* B5786 на фруктозе в качестве основного субстрата ингибирующий эффект  $\gamma$ -бутиролактона был выражен в меньшей степени (рис. 1б). Доза однократной подачи  $\gamma$ -бутиролактона в культуру составила 2.0, 6.0 и 10.0 г/л. Ингибирование роста бактерий имело место только при самой высокой концентрации  $\gamma$ -бутиролактона; урожаем биомассы при этом не превысил 4.5 г/л. В двух других вариантах урожаем биомассы был близок к контролю, порядка 7.0–7.5 г/л при длительности культивирования 58 ч. В этих условиях потребление  $\gamma$ -бутиролактона культурой было более активное по сравнению с автотрофным процессом, и через 34 ч после его добавления концентрация  $\gamma$ -бутиролактона в культуре не превышала 0.1–0.2 г/л. При ингибирующей концентрации  $\gamma$ -бутиролактона выход полимера составил  $56.7 \pm 2.9\%$  от веса сухой биомассы, но доля 4ГБ в полимере при этом не превысила 2 мол. %. При подаче  $\gamma$ -бутиролактона в культуру в дозе 6.0 и 2.0 г/л выход полимера соответственно составил  $50.6 \pm 4.1$  и  $57.3 \pm 3.4\%$  от веса сухой биомассы, однако содержание 4ГБ в сополимере было менее 2 мол. %. Переход на режим дробной подачи  $\gamma$ -бутиролактона в культуру обеспечил увеличение урожая полимера до 65.9–78.1% от веса сухой биомассы, однако с незначительным изменением содержания в нем 4ГБ, до 3.8–4.1 мол. %.

Замена фруктозы масляной кислотой (использовали натриевую соль масляной кислоты) положительно влияла на выход сополимера и его состав. В связи с тем, что концентрация масляной кислоты свыше 5.0 г/л ингибировала рост бактерий, использовали режим с дробными добавками этого субстрата. Выращивание *R. eutropha* B5786 на среде с масляной кислотой и с двумя добавками  $\gamma$ -бутиролактона (суммарная концентрация  $\gamma$ -бутиролактона составила 6 г/л) позволило достичь выхода полимера до 81.7%. Однако увеличения доли 4ГБ в сополимере не происходило; величина фракции не превысила 4.4 мол. %.

Таким образом, варьируя условия углеродного питания, включая тип и концентрацию основного углеродного субстрата и режим дозирования дополнительного субстрата ( $\gamma$ -бутиролактон), удалось увеличить выходы полимера и урожая биомассы в культуре *R. eutropha* B5786 и обеспечить получение сополимеров 3ГБ-СО-4ГБ с включением 4ГБ от 0.6 до 6.3 мол. %.

Согласно данным литературы, для увеличения доли 4ГБ в сополимере в среду с  $\gamma$ -бутиролактоном добавляют ацетат, пропионовую кислоту, аминокислоты. Это позволило в отдельных случаях увеличить включение 4ГБ до 60–80 мол. %, однако при общем низком выходе полимера (19–38% от веса сухой биомассы) [22, 30, 31]. Позитивное влияние данных дополнительных углеродных субстратов на синтез сополимера и соотношение в нем мономеров 3- и 4-гидроксibuтирата, возможно, связано с тем, что утилизация этих соединений сопровождается увеличением внутриклеточного пула ацетил-СоА, что, в свою очередь, ингибирует реакцию расщепления 4-гидроксibuтирил-СоА до двух молекул ацетил-СоА и, соответственно, приводит к возрастанию содержания 4ГБ и включению его в сополимер [30].

Реализованный далее режим выращивания *R. eutropha* B5786 на среде, содержащей в качестве основного субстрата пропионовую кислоту в концентрации 2 г/л и добавки  $\gamma$ -бутиролактона, позволил незначительно повысить содержание 4ГБ в полимере (до 8.1 мол. %), при этом в нем, помимо 3-гидроксibuтирата, присутствовал в качестве третьего мономера 3-гидроксивалерат (35.2 мол. %).

Выращивание бактерий на масляной кислоте с добавками  $\gamma$ -бутиролактона позволило получить более высокие результаты (рис. 1в). Урожай бактерий и выход полимера варьировали в широких пределах в зависимости от соотношения в культуре масляной кислоты и добавки  $\gamma$ -бутиролактона, максимальные выходы составили соответственно 7.1 г/л и 92.7% от веса сухой биомассы; при этом содержание 4ГБ варьировало в диапазоне 8.7–16 мол. %.

Использование в качестве продуцента сополимера 3ГБ-СО-4ГБ штамма *Cupriavidus eutrophus* B10646, обладающего повышенной толерантностью к воздействию  $\gamma$ -бутиролактона, в качестве моноуглеродного субстрата в концентрации 10 г/л позволило увеличить содержание 4ГБ в сополимере до 24.3 мол. %.

Все полученные нами образцы сополимера 3ГБ-со-4ГБ были дополнительно проверены на включение 4ГБ в полимер методом  $^1\text{H}$ -ЯМР. Проведенные исследования подтвердили наличие 4ГБ в полимере. На рис. 2 представлены спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР образцов сополимера с включением 4ГБ 8.7 и 16 мол. %.

Таким образом, синтезированы сополимеры различного состава, которые были очищены до гомогенного состояния, что позволило исследовать их свойства.

Важнейшими характеристиками полимеров служат величина молекулярной массы (ММ) и степень

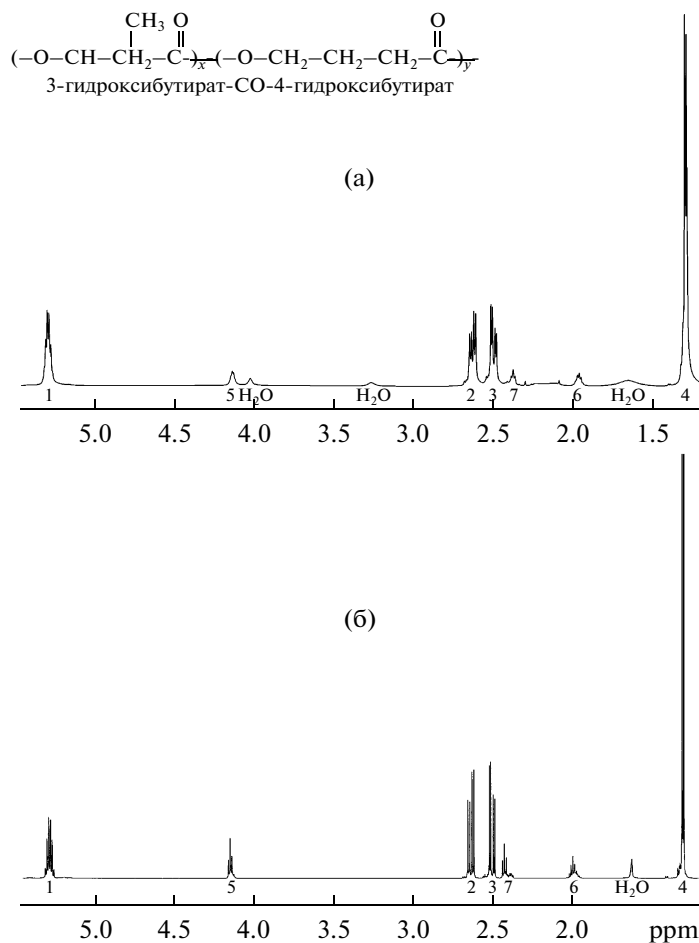


Рис. 2. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР сополимера 3ГБ-СО-4ГБ с содержанием 4ГБ 8.7% (а) и 16% (б).

полимеризуемости. Полидисперсность позволяет оценить, каково соотношение в полимере фрагментов с различной степенью полимеризуемости. Корректная регистрация данных параметров возможна только с применением гелепроникающей хроматографии, которая позволяет определить ММ и полидисперсность полимера.

С использованием гелепроникающей хроматографии определена ММ серии синтезированных образцов сополимеров 3ГБ-СО-4ГБ (таблица). В исследованном диапазоне соотношения мономеров в сополимере (включение 4ГБ варьировало от 8.7 до 24.3 мол. %) не обнаружено влияния этого параметра на ММ и полидисперсность сополимера. Сред-

Молекулярная масса и степень кристалличности сополимеров, синтезируемых *R. eutropha* B5786

| Содержание 4ГБ в сополимере 3ГБ-СО-4ГБ, мол. % | Среднечисловая молекулярная масса ( $M_n$ ), кДа | Средневесовая молекулярная масса ( $M_w$ ), Да | Полидисперсность | Степень кристалличности, % |
|--|--|--|------------------|----------------------------|
| 0  | $760 \pm 15.2$                                   | $1300 \pm 28.7$                                | $1.60 \pm 0.03$  | 76                         |
| 8.7  | $230 \pm 1.7$                                    | $630 \pm 3.5$                                  | $2.76 \pm 0.03$  | 44                         |
| 10.7   | $480 \pm 9.1$                                    | $1110 \pm 17.9$                                | $2.32 \pm 0.06$  | 43                         |
| 14.9   | $320 \pm 6.6$                                    | $850 \pm 12.2$                                 | $2.65 \pm 0.04$  | 44                         |
| 16   | $370 \pm 5.2$                                    | $970 \pm 18.2$                                 | $2.59 \pm 0.04$  | 43                         |
| 17   | $370 \pm 12.2$                                   | $850 \pm 24.2$                                 | $2.31 \pm 0.06$  | 25                         |
| 24.3   | $285 \pm 5.3$                                    | $540 \pm 9.6$                                  | $1.91 \pm 0.01$  | 12                         |

нечисловая молекулярная масса у серии образцов варьировала в диапазоне 230–480 кДа; средневесовая молекулярная масса составила 540–1110 кДа; полидисперсность от 1.91 до 2.76 без четкой связи с содержанием 4ГБ в сополимере. Это подтверждает ранее полученные результаты об отсутствии связи между составом ПГА и молекулярной массой [29].

Установлено, что включение 4ГБ резко (существенно в большей степени по сравнению с 3-гидроксивалератом и 3-гидроксигексаноатом) влияет на соотношение кристаллической и аморфной зон в сополимере, значительно снижая кристалличность последнего (таблица). Впервые удалось получить образцы ПГА, имеющие пониженную степень кристалличности (от 44 до 12%).

В результате выполненных исследований найдены условия культивирования водородокисляющих бактерий, позволяющие получать высокие общие выходы высокомолекулярного и низкокristаллического сополимера с включением 4ГБ свыше 20 мол. %.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, Пост. Правительства РФ № 220 (проект “Биотехнологии новых биоматериалов”), и Программы интеграционных исследований Президиума СО РАН (проект № 96).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Philip S., Keshavarz T., Roy I. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 2007. Т. 82. № 3. P. 233–247.
2. Fukui T., Doi Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 49. № 3. P. 333–336.
3. Bormann E.J., Roth M. // Biothechnol. Lett. 1999. V. 21. № 12. P. 1059–1063.
4. Ishizaki A., Tanaka K., Taga N. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. V. 57. № 1–2. P. 6–12.
5. Volova T.G., Kalacheva G.S., Altuhova O.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. № 5. P. 675–678.
6. Doi Y., Tamaki A., Kunioka M., Soga K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. V. 28. № 4–5. P. 330–334.
7. Liebergesell M., Hustede E., Timm A., Steinbüchel A., Fuller R.C., Lenz R.W., Schlegel H.G. // Arch. Microbiol. 1991. V. 155. № 5. P. 415–421.
8. Dennis D., McCoy M., Stangl A., Valentin H.E., Wu Z. // J. Biotechnol. 1998. V. 64. № 2–3. P. 177–186.
9. Antonio R.V., Steinbüchel A., Rehm B.H.A. // FEMS Microbiol. Lett. 2000. V. 182. № 1. P. 111–117.
10. Green P.R., Kemper J., Schechtman L., Guo L., Satkowski M., Fiedler S., Steinbüchel A., Rehm B.H.A. // Biomacromolecules. 2002. V. 3. № 1. P. 208–213.
11. Волова Т.Г., Миронов П.В., Васильев А.Д. // Пластические массы. 2006. № 5. С. 35–41.
12. Volova T.G., Kalacheva G.S., Steinbüchel A. // Macromol. Symposia. № 1. 2008. V. 269. № 1. P. 1–7.
13. Martin D.P., Williams S.F. // Biochem. Eng. J. 2003. V. 16. № 2. P. 97–105.
14. Nakamura S., Doi Y., Scandola M. // Macromolecules. 1992. V. 25. № 17. P. 4237–4241.
15. Hiramitsu M., Koyama N., Doi Y. // Biotechnol. Lett. 1993. V. 15. № 5. P. 461–464.
16. Renner G., Pongratz K., Brauneegg G. // Food Technol. Biotechnol. 1996. V. 34. № 2–3. P. 91–95.
17. Saito Y., Doi Y. // Int. J. Biol. Macromol. 1994. V. 16. № 2. P. 99–104.
18. Choi M.H., Yoon S.C., Lenz R.W. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 4. P. 1570–1577.
19. Kimura H., Iwama M., Sasaki S., Takeishi M. // Chem. Lett. 1999. V. 28. № 8. P. 737–738.
20. Haywood G.W., Anderson A.J., Williams D.R., Dawes E.A., Ewing D.F. // Int. J. Biol. Macromol. 1991. V. 13. № 2. P. 83–88.
21. Li Z.-J., Shi Z.-Yu, Jian J., Guo Y.-Y., Wu Q., Chen G.-Q. // Metabolic Engineering. 2010. V. 12. № 4. P. 352–359.
22. Chanprateep S., Katakura Yo., Visetkoop S., Shimizu H., Kulpreecha S., Shioya S. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 35. № 11. P. 1205–1215.
23. Vigneswari S., Vijaya S., Majid M.I.A., Sudesh K., Sripaut C.S., Azizan M.N.M., Amirul A.A. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2009. V. 36. № 4. P. 547–556.
24. Патент США. 2007. № 7229804.
25. Стасишина Г.Н., Волова Т.Г. // Патент РФ. 1992. № 2053292.
26. Волова Т.Г., Калачёва Г.С., Константинова В.М., Пузырь А.П. // Прикл. биохимия и микробиология. 1992. Т. 28. № 2. С. 221–229.
27. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. Л.: Колос, 1972. 306 с.
28. Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии. М.: Изд-во МГУ, 1980. 150 с.
29. Волова Т.Г., Калачёва Г.С. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 1. С. 63–69.
30. Lee Y.-H., Kang M.-S., Jung Y.-M. // J. Biosci. Bioeng. 2000. V. 89. № 4. P. 380–383.
31. Kimura H., Ohura T., Matsumoto T., Ikarashi T. // Polym. Int. 2008. V. 57. № 1. P. 149–157.

## Synthesis of 3-Hydroxybutyrate-CO-4-Hydroxybutyrate Copolymers by Hydrogen-Oxidizing Bacteria

T. G. Volova<sup>a</sup>, N. O. Zhila<sup>b</sup>, G. S. Kalacheva<sup>b</sup>, V. A. Sokolenko<sup>c</sup>, and E. J. Sinski<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Siberian Federal University, Krasnoyarsk, 660041 Russia

e-mail: volova45@mail.ru

<sup>b</sup> Biophysics Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia

<sup>c</sup> Chemistry and Chemical Technology Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, 660036 Russia

<sup>d</sup> Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, 02139 United States of America

Received January 21, 2011

**Abstract**—Synthesis of 3- and 4-hydroxybutyrate copolymer (<sup>3</sup>HB-CO-4HB), the most promising member of the biodegradable polyhydroxyalcanoate (PHA) family, has been studied. Cultivation conditions of naturally occurring strains of hydrogen-oxidizing bacteria *Ralstonia eutropha* B5786 and *Cupriavidus eutrophus* B10646 have been optimized to ensure efficient synthesis of the 3HB-CO-4HB copolymer. A set of highly pure samples of the 3HB-CO-4HB copolymer with 4HB content varying from 8.7 to 24.3 mol % has been obtained. Incorporation of 4-HB into the copolymer was shown to cause a more pronounced decrease in polymer crystallinity than the incorporation of 3-hydroxyvalerate or 3-hydroxyhexanoate; samples with a degree of crystallinity below 30% have been obtained. The weight average molecular mass of the 3HB-CO-4HB copolymers was shown to be independent on the monomer ratio and to vary broadly (from 540 to 1110 kDa).