

POLY-3-HYDROXYBUTYRATE AS AN EXAMPLE OF A BIOPOLYMER PRODUCED BY METHANOTROPHIC BACTERIA

Adam Kubaczyński*, Anna Pytlak, Zofia Stępniewska

The John Paul II Catholic University of Lublin, Institute of Biotechnology, Department of Biochemistry and Environmental Chemistry, Str. Konstantynów 1I, 20-708 Lublin

Received in July 2018, accepted in July 2019

Abstract: The objective of this review paper is to present the current state of knowledge about poly-3-hydroxybutyrate produced by methanotrophic bacteria. Methanotrophs are a large group of microorganisms, which live in different kinds of environment, but they preferably occupy places with high methane production, such as swamps, peat bogs, rice fields, or widely understood geological deposits. Methanotrophic bacteria are an important object of research for specialists of environmental biotechnology, are increasingly identified in environmental samples. Methanotrophs are Gram-negative microorganisms, they belonging to the group of *Proteobacteria* and classified as methylotrophs. In their metabolic cycle, they use methane as the main source of coal and energy. PHB is a linear polyester of 3-hydroxybutyric acid, PHB is accumulated in microorganisms during physiological stress, triggered by the deficit of biogenic elements, such as nitrogen or phosphorus and when the concentration of carbon source is high. Poly-3-hydroxybutyrate belongs to a large group of biodegradable polymers known as polyhydroxyalkanoates. PHB has a similar physico-chemical properties as conventional polymers. PHB is environmentally friendly due to the fast biodegradation and production non-toxic waste during degradation. For this reason poly-3-hydroxybutyrate is an interesting alternative to petrochemical polymers. PHB found a lot of applications in industry, medicine and pharmacy.

1. Introduction. 2. General characteristic of methanotrophic bacteria. 3. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate by methanotrophic bacteria. 4. Polyhydroxyalkanoates and poly-3-hydroxybutyrate characteristic. 5. Application of poly-3-hydroxybutyrate. 6. Biodegradation of poly-3-hydroxybutyrate in the environment. 7. Summary

POLI-3-HYDROKSYMAŚLAN JAKO PRZYKŁAD BIOPOLIMERU PRODUKOWANEGO PRZEZ BAKTERIE METANOTROFICZNE

Streszczenie: Poli-3-hydroksymaślan jest jednym z najbardziej użytecznych naturalnych biopolimerów produkowanych przez bakterie metanotroficzne. Metanotrofy stanowią liczną grupę mikroorganizmów występujących w różnorodnych środowiskach, jednak szczególnie chętnie zasiedlają miejsca charakteryzujące się wzmożoną produkcją metanu, takie jak bagna, torfowiska, pola ryżowe, czy szeroko pojęte złoża geologiczne. W próbach środowiskowych coraz częściej identyfikowane są bakterie metanotroficzne, będące ważnym obiektem badań dla specjalistów z dziedziny biotechnologii środowiskowej. Metanotrofy to Gram-ujemne mikroorganizmy, należące do typu *Proteobacteria* i zaliczane do metylotrofów. W swoim cyklu życiowym wykorzystują metan jako główne źródło węgla i energii. PHB (Poly-3-hydroxybutyrate) jest liniowym poliestrem kwasu 3-hydroksymasłowego, akumulowanym przez mikroorganizmy w warunkach stresu fizjologicznego, spowodowanego np. niedoborem pierwiastków biogennych, takich jak azot czy fosfor oraz przy jednoczesnym nadmiarze źródła węgla. Poli-3-hydroksymaślan należy do dużej grupy biodegradowalnych polimerów, określanej jako polihydroksyalkanolany. PHB wykazuje właściwości fizyczno-chemiczne podobne do konwencjonalnych polimerów. Jednocześnie pozostaje przyjazny środowisku ze względu na szybki przebieg biodegradacji, podczas której powstają nietoksyczne produkty rozpadu. Wobec tego poli-3-hydroksymaślan jest ciekawą alternatywą dla polimerów pochodzenia petrochemicznego. PHB znalazł już szereg zastosowań w przemyśle, medycynie i farmacji.

1. Wprowadzenie. 2. Ogólna charakterystyka metanotrofów. 3. Biosynteza poli-3-hydroksymaślanu prowadzona przez metanotrofy. 4. Charakterystyka polihydroksyalkanolanów i poli-3-hydroksymaślanu. 5. Zastosowanie poli-3-hydroksymaślanu. 6. Biodegradacja poli-3-hydroksymaślanu w środowisku. 7. Podsumowanie

Key words: methanotrophic bacteria, biopolymers, poly-3-hydroxybutyrate, polyhydroxyalkanoates
Słowa kluczowe: bakterie metanotroficzne, biopolimery, poli-3-hydroksymaślan, polihydroksyalkanolany

1. Introduction

Progressive development of civilisation results in an increase in production and consumption, and thus increased accumulation of waste. A significant part of that waste are packaging materials made from

polymers of petrochemical origin. They are difficult to remove from the environment due to the long degradation times and hazardous decomposition products. The decomposition time of conventional polymers is estimated in tens, hundreds, and even thousands of years. In addition, non-renewable resources (mainly

* Corresponding author: M.Sc. Adam Kubaczyński, The John Paul II Catholic University of Lublin, Institute of Biotechnology, Department of Biochemistry and Environmental Chemistry, Str. Konstantynów 1I, 20-708 Lublin; e-mail: adamkubaczynski@interia.pl; phone: +48 665 721 615.

crude oil) are used for their production, and the energy used in the production process is difficult to recover. In response to these challenges, alternatives to conventional polymers have been sought. The industry focused on the production of plastics is now paying increasing attention to biopolymers of natural origin, which unlike the synthetic ones, are easily decomposed by soil microorganisms, and are broken down into non-toxic compounds such as carbon dioxide and water. On the other hand, biopolymers are similar to synthetic polymers in terms of their physicochemical properties [2, 12, 19, 39]. An interesting example of such biopolymer is poly-3-hydroxybutyrate (PHB), which has already found wide applications in the industry, as well as areas of medicine and pharmacy. PHB is synthesised and accumulated as a reserve material in the cells of many types of microorganisms [2, 21]. Across the world, research aimed at finding microorganisms that are particularly effective in the biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate, has been carried out for over 20 years.

2. General characteristic of methanotrophic bacteria

In the rich and largely unidentified bacterial flora inhabiting the surroundings of geological deposits, one can find representatives of various groups of microorganisms. In samples obtained from hard coal deposits and salt, methanotrophic bacteria have been increasingly identified by specialists in the field of environmental biotechnology as being particularly valuable objects of studies. Methanotrophs are Gram-negative bacteria, which use methane as the main source of carbon and energy in their life cycle. These belong to the *Proteobacteria* family and are classed as methylotrophs [27, 32, 33].

The main characteristic feature of methanotrophs is the ability to oxidise methane to methanol. This reaction is catalysed by a specific methane-monooxygenase (MMO) enzyme. Monooxygenase oxidises methane to methanol, and the role of MMO in this reaction comes down to breaking the double bond in the O₂ molecule. One of the oxygen atoms formed in this way is attached to the methane molecule resulting in the formation of methanol, while the other oxygen atom is reduced to H₂O. Methanol is subsequently further oxidised to formaldehyde by methanol dehydrogenase, and formaldehyde is converted to formate by formaldehyde dehydrogenase. The last step is the oxidation of formate to carbon dioxide and water by formate dehydrogenase, which are the final products of the reaction. There are two variants of MMO, which initiate methane oxidation: cytoplasmic soluble methane monooxygenase (sMMO) and particulate methane monooxygenase (pMMO). The role of the functional marker of methanotrophs is played by pMMO, because it occurs

in the cells of these bacteria much more widely than the sMMO. In addition, pMMO is more substrate-specific and more active in the oxidation of low molecular weight hydrocarbons such as methane. Based on selected methanotrophs (*Methylococcus cupsulurus* and *Methylosinus trichosporium* OB3b), it was shown that the production of a given MMO variant is dependent on the availability of copper ions. The pMMO form arises when the optimal amount of Cu²⁺ ions is available in the environment, while sMMO is synthesised in conditions deficient of Cu²⁺. The presence of O₂ and NADH is also required for the proper functioning of both types of MMO [29, 31, 42, 44].

Methanotrophic bacteria are a large group of microorganisms occurring in diverse environments (both land and water); however, they particularly like to settle in places characterised by increased methane production such as swamps, peat bogs, rice fields, or various geological deposits. Bacteria of this type have the ability to oxidise methane to carbon dioxide using atmospheric oxygen. Methane is a gas present in the atmosphere at a concentration of approx. 1000 times smaller than that of carbon dioxide, but has a much stronger greenhouse effect than CO₂. Biological oxidation of methane is considered as one of the most effective processes for eliminating excess of this greenhouse gas from the atmosphere. Methanotrophs are estimated to consume about 10% of the methane in the atmosphere. They also conduct intensive oxidation of methane contained in soils and waters, contributing to the minimisation of the greenhouse effect. For this reason, methanotrophs play a significant role in the running of the global methane cycle [13, 15].

Over the past twenty-five years, many extremophilic groups of methanotrophic bacteria have been discovered, among them: halophiles, thermophiles, acidophiles, alkalophiles, and many others. Due to their adaptations, they can successfully survive without any light access e.g., in coal mines, highly saline environments such as salt mines and at low or high temperatures (in the range from 4°C to over 70°C), thus they can be found in places with various climates. These organisms are observed in both alkaline and acidic environments [16, 35].

The adaptation potential of methanotrophs is enormous, and the structural and functional conditions from which this potential results are not yet fully understood. Currently, two main adaptation mechanisms are being used by these bacteria. The first one is based on the intracellular synthesis and accumulation of organic osmoprotectants such as: sucrose, glutamate, ectoine, and potassium ions. The second type of the adaptation mechanisms are modifications in the structure and the function of cell membranes, often including: changes in the arrangement of phospholipid

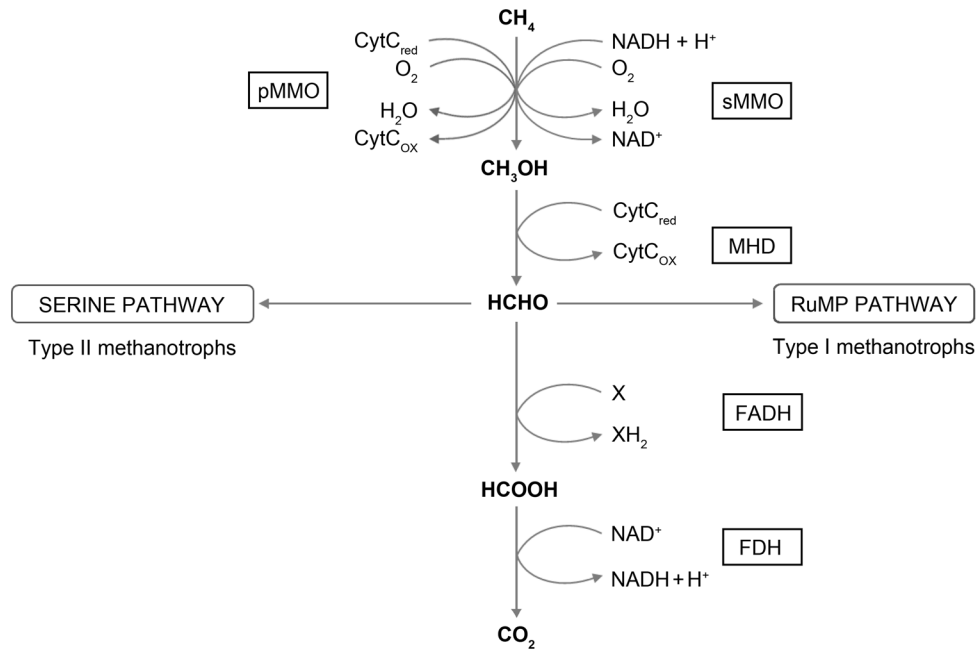


Fig. 1. Methane oxidation and carbon assimilation pathways conducted by type I and II methanotrophs. Explanations: pMMO – particulate form of methane monooxygenase; sMMO – cytoplasmic methane monooxygenase; cytC – cytochrome c; MDH – methanol dehydrogenase; FADH – formaldehyde dehydrogenase; FDH – formate dehydrogenase. Based on Zhang *et al.* [45].

membranes and increased concentration of surface glycoproteins on the S-side [15].

Based on the preferred concentration of methane in the environment, methanotrophs have been divided into two groups. The first includes methanotrophs, which successfully reside in atmospheric methane concentration due to high affinity for CH_4 . The second group consists of methanotrophs preferring much higher methane concentrations than those found in the atmosphere, because they have a low affinity for CH_4 [31].

3. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate by methanotrophic bacteria

Methanotrophs biosynthesising PHB

Methanotrophic bacteria are a diverse group of microorganisms. They exhibit various preferences as to the chosen ecosystems, methane concentrations in the atmosphere, temperature or the pH of the environment. They use different types of methane monooxygenase (MMO) enzymes during oxidation of the substrate. It is also known that some types of methanotrophs are able to synthesise poly-3-hydroxybutyrate (PHB) as a backup material. The reasons for these differences are to be found in the metabolism of methanotrophs, and more specifically in the carbon assimilation methods [15, 16, 27].

In the course of the enzymatic reactions, methane is gradually oxidised to form numerous intermediates. Two major pathways for carbon assimilation are dis-

tinguished: the ribulose monophosphate (RuMP) and the serine pathways. Initially, methane is oxidised by MMO to methanol. Further oxidation of formaldehyde may have a different course, depending on the pathway of carbon assimilation. Based on the type of the coal assimilation pathway and the membrane structure analysis, methanotrophs are divided into type I or type II. In addition, within type I, two subgroups are differentiated: type 1a and type 1b. Type 1a of methanotrophs oxidises formaldehyde using the ribulose monophosphate route, while type 1b uses the ribulose-serine pathway for this purpose. Type 1a methanotrophs accumulate much larger amounts of PHB than the type 1b ones. Representatives of the type 1a methanotrophs are, among others, bacteria of the genera: *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas*, *Methylosarcina*, *Methylosphaera*. Types of bacteria belonging to type 1b are *Methylococcus* and *Methylocaldum*. Methanotrophic bacteria classified as type II perform carbon assimilation according to the serine pathway, which translates into their decidedly highest efficiency of PHB accumulation. Type II is represented by methanotrophic bacteria of the genera: *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocapsa* and *Methylocella* [6, 24, 34, 45] (Fig. 1).

The mechanism of the PHB biosynthesis

Poly-3-hydroxybutyrate is a reserve material of bacterial cells and its synthesis takes place under physiological stress conditions. Production and storage of PHB occurs particularly intensively in the shortage of biogenic elements such as: nitrogen, phosphorus,

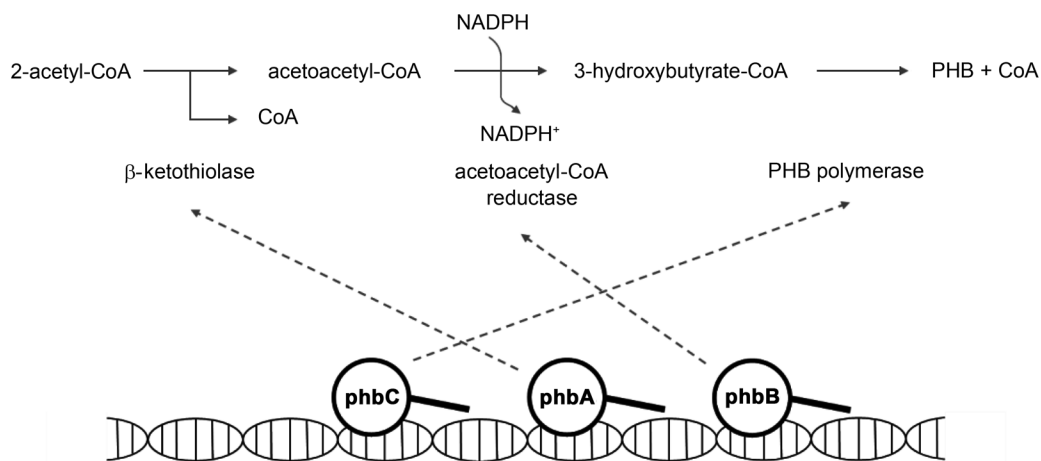


Fig. 2. The course of the PHB biosynthesis including the enzymes catalysing subsequent reaction steps and the *phbCAB* operon genes encoding them. Based on Madison *et al.* [17].

magnesium, and simultaneous excess of the carbon source in the environment [7, 22, 23].

The individual phases of the PHB synthesis are catalysed by specific enzymes (Fig. 2). Their presence determines the correct course of individual reactions. The biosynthesis of poly-3-hydroxybutyric acid begins with the condensation of two molecules of acetyl-CoA catalysed by the β -ketothiolase enzyme. The resulting acetoacetyl-CoA is reduced to 3-hydroxybutyrate-CoA under the influence of acetoacetyl-CoA reductase. PHB synthase catalyses the polymerisation reaction of 3-hydroxybutyrate-CoA molecules (monomer units) to poly-3-hydroxybutyrate. During the elongation of the polymer, the PHB synthesis remains covalently bound to the molecular chain [17, 46].

Further enzymes in the PHB synthesis pathway are encoded by the genes from the *phbCAB* group and so: the *phbA* gene encodes β -ketothiolase, *phbB* is responsible for the formation of acetoacetyl-CoA reductase, and *phbC* is the gene encoding PHB synthase. The presence of *phbCAB* genes in the genome of methanotrophic bacteria is a determinant for the efficient synthesis of PHB. These genes were identified in the majority of type II methanotrophs; however, they were not detected in type I methanotrophs. This confirms the hypothesis regarding type II methanotrophs being the most efficient producers of poly-3-hydroxybutyric acid [4, 17, 24].

Studies on the PHB pathway have shown that the key enzymes, which catalyse individual reactions, exist as isoforms. The presence of different structural forms of the same enzyme causes differences in the course of the enzymatic reaction and affects the structures of the resulting products. On the other hand, the large similarity in the structures of isoenzymes results in different variants of the same enzyme having identical elemental composition and similar molecular

weight. They are also characterised by similar physicochemical properties [37].

The β -ketothiolase enzyme exists in three forms, which are responsible for acetylation of substrates and which differ in the length of the carbon chains. The isoenzyme showing selectivity for short-chain substrates (containing 2 or 4 carbon atoms) catalyses the reversible transfer of the acetyl group to the acetyl-CoA molecule, thus playing a key role in the biosynthesis of PHB. The activity of the second β -ketothiolase isoenzyme is associated with substrates with a medium carbon chain length (4 to 16 carbon atoms), and its role is the β -oxidation of fatty acids. The third form of this enzyme is reserved for eukaryotic cells in which β -ketothiolase catalyses the condensation of acetyl-CoA molecules to acetoacetyl-CoA. In eukaryotes, acetoacetyl-CoA acts as a precursor in the synthesis of steroids [1, 34].

Another enzyme involved in the synthesis of PHB is acetoacetyl-CoA reductase, which carries out the enzymatic reduction of acetoacetyl-CoA to 3-hydroxybutyrate-CoA. It occurs in the cell in the form of two isoenzymes, one of which is specific for NADH and the other for NADPH. As a result of the reaction carried out by the first or second type of acetoacetyl-CoA reductase, 3-hydroxybutyrate-CoA molecules with different spatial configurations are formed. The D(-)-3-hydroxybutyrate-CoA product is formed when the reduction is catalysed by an isoenzyme specific for NADPH. Conversely, the isoenzyme dependent on NADH determines the formation of L(+)-3-hydroxybutyrate-CoA. Due to the fact that further PHB synthesis takes place only with the participation of D(-)-3-hydroxybutyrate-CoA, the L(+)-3-hydroxybutyrate-CoA product, formed in the cell concurrently, requires enzymatic conversion to the D(-) configuration [4].

PHB synthase is the third important enzyme in the poly-3-hydroxybutyric acid synthesis pathway. It cataly-

ses the polymerisation of D(-)-3-hydroxybutyrate-CoA molecules leading to the elongation of the polymer chain and thus to the formation of poly-3-hydroxybutyrate. Currently, three PHB synthase variants have been identified, and the functions of two of them have been thoroughly studied. The first of the isoenzymes shows specificity for CoA derivatives and short chain carboxylic acids (composed of 3 to 5 carbon atoms). The second form of the PHB synthase is specific for CoA derivatives with medium length chains (6 to 14 carbon atoms). The isoenzymes exist in the dissolved form (unstable) or remain associated with the synthesised PHB granules (forming stable structures) [37, 41].

Poly-3-hydroxybutyrate is the cell's reserve material, which in the conditions of carbon source deficiency, initiates the PHB degradation process. Enzymatic degradation of poly-3-hydroxybutyric acid is carried out by appropriate depolymerases, 3-hydroxybutyrate dehydrogenases and acetoacetyl transferases. The last step is the reversible conversion of acetoacetyl-CoA to two acetyl-CoA molecules, which is controlled by β -ketothiolase. The PHB degradation is used to obtain a source of carbon and energy, and thus maintain metabolic continuity. The PHB synthesis and degradation occurs in the cell cyclically, and thereby mitigates the effects of physiological stress [37, 46].

4. Polyhydroxyalkanoates and poly-3-hydroxybutyrate characteristic

General characteristics of PHA

PHB belongs to a large group of biodegradable polymers known as polyhydroxyalkanoates (PHA). An in-depth characterisation of PHB also requires providing basic information regarding the structure of the polyhydroxyalkanoates themselves. The compounds are composed of hydroxycarboxylic acid residues present in the molecule in a number that may vary from several hundred to tens of thousands, which translates directly into the high molecular weight of polymers. The general monomer formula can be represented as follows: $[\text{HO-CH(R)-CH}_2\text{-COOH}]_n$, in which R is an alkyl substituent. PHA monomers, which are actually linear fatty acid molecules, can reach various sizes, and therefore may vary in the number of carbon atoms in their structure. The length of the alkyl substituent determines the physical properties of the polymer. As a result, polyhydroxyalkanoates with different flexibilities are formed. Each monomer contains a hydroxyl group at one end of the chain, and a carboxyl group at the other. Such arrangement of the functional groups in the fatty acid molecule allows the formation of an ester bond between the hydroxyl group of one monomer, and the carboxyl group of the other. Due to the abundance of

ester bonds linking the numerous PHA monomers, they are classified as polyesters [11, 38, 39].

Polyhydroxyalkanoates are being increasingly considered as an alternative to synthetic plastics. PHAs are accumulated inside the cells of many bacteria in the environment of nitrogen deficiency and carbon source excess, and their content in dry cell mass reaches up to 80%. The possibility of harvesting polyhydroxyalkanoates from microbial cultures puts them in opposition to synthetic polymers, production of which consumes large amounts of non-renewable resources (mainly petroleum). The appropriate length of the alkyl radical in fatty acids allows the acquirement of PHAs with expected mechanical properties (from hard elastomers, through fragile and brittle materials, to flexible foils). In addition, PHAs are fully biodegradable, and the enzyme responsible for this process is esterase. Consequently, unlike synthetic polymers, PHAs do not remain in the environment, polluting and creating a serious threat to nature. Given all these aspects, PHAs are considered as the main raw material for the production of packaging in the future. It is known that the packaging production is a large branch of industry with a wide range of applications, and the use of biodegradable polymers on a big scale will be beneficial to the environment. While it is a significant application of PHAs, it is not the only one. Owing to the diverse properties of PHAs, attempts are being made to employ them in the medicine and dentistry areas as implants, and in the pharmaceutical industry in the design of experimental drugs [9, 14, 25, 28].

The chemical structure of PHB

The history of the discovery of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) dates back to 1925, when the French researcher Maurice Lemoigne noticed the ability of bacteria to synthesise PHB under physiological stress caused by nutrient deficiency and carbon source excess. Later studies demonstrated that poly-3-hydroxybutyrate accumulates in the cells of microorganisms classified as: *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Oscillatoria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Spirillum*. PHB is a backup material utilised when other substrates, which are sources of energy and carbon, are not available. It is present in the cells in the form of grains whose diameter varies from 100 to 800 nm. The diversity in the size and the amount of PHB grains present in the bacterial cell is mainly a result of diversity among microorganisms, and the conditions under which bacteria develop [3, 10, 22, 40].

Molecules of 3-hydroxybutyric acid form a natural polyester, such as poly-3-hydroxybutyrate. The molecular weight of the polymer is not constant as it is dependent on the amount of interconnected monomers. These can be present in a number up to 20,000 in

a single PHB chain. Despite such complexity, the PHB molecule is characterised by a regular and organised structure. The polymer chains form a helix, and the side groups attached to it are directed from the center of the helix. Based on the positioning of almost all side groups in the same direction, PHB is classed as an isotactic polymer. The polymer structure promotes tight packing of the chains, and therefore the formation of crystals. The crystalline form of the polymer affects its mechanical properties, such as stiffness and brittleness. In addition, poly-3-hydroxybutyrate is an optically active compound; however, the center of chirality of each repetitive monomer occurs in the R absolute configuration [2, 30].

Physicochemical properties

The majority of household waste consists of used plastic packaging, which is transported to landfills every day, contributing to an increase in the amount of residual waste. At the same time, such materials are poisonous to the air, water and soil as a result of their combustion, or long-term degradation in the environment [28].

Biopolymers do not cause such problems. The advantage of biodegradable polymers over synthetic polymers stems from their low persistence in the environment, and harmless products generated during their decomposition. This is of crucial importance, considering the increasing difficulties associated with waste management. Biodegradable polymers, such as PHB, are being increasingly considered as a materials for the production of new generation packaging. However, in order for biopolymers to successfully compete with conventional plastics, they must be characterised by a number of specific physicochemical properties. The requirements of the biopolymers used in the industry result primarily from the expected properties of the product and the employed production technologies. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) is characterised by many valuable properties sought by various industries, including medicine (Tab. I). The use of PHB in medicine is additionally promoted by its full biocompatibility and non-toxicity [26, 39].

The main property of poly-3-hydroxybutyrate, which distinguishes it from a number of other biodegradable polymers, is its insolubility in water. Most of the currently available biodegradable polymers dissolve and degrade in contact with water (e.g. polycaprolactone). The high resistance of the PHB biopolymer to hydrolytic degradation significantly extends its applicability. Moreover, PHB is quite resistant to ultraviolet radiation. It also does not react with oily substances. Owing to these properties, poly-3-hydroxybutyrate may be successfully used as a packaging material for many organic and inorganic liquids [28, 39].

Table I
Summary of the PHB polymer properties

Chemical resistance	Value	Unit
Acids	moderate	
Strong alkalis	poor	
Alcohols	moderate	
Oils and grease	good	
Physical properties		
Density	1.25	g/cm ³
Resistance to UV radiation	good	
Mechanical properties		
Tensile strength	40	MPa
Modulus of elasticity	3.5	GPa
Elongation at break	10	%
Impact strength (impact strength test according to Izod)	35–60	J/m ²
Thermal properties		
Melting point	170–180	°C
Glass transition temperature	0–5	°C
Electrical properties		
Electrical resistance (specific)	10 ¹⁶	Ohm/cm
Dielectric constant	3.0	MHz

Based on Vroman *et al.* [39].

Poly-3-hydroxybutyrate is also characterised by short biodegradation time. In terms of its physical properties, PHB is similar to polypropylene; therefore, it can successfully act as a substitute for this conventional polymer. However, while polypropylene floats on the surface of water, PHB sinks. This difference allows anaerobic breakdown of PHB in microbially active sediments. Poly-3-hydroxybutyrate is highly thermoplastic – its melting point is in the range of 170 to 180°C (thus it is relatively high), and its glass transition temperature (T_g) is in the range of 0 to 5°C. When PHB reaches a temperature slightly above its melting point, the thermal degradation begins, and at 200°C the degradation is already clearly visible. The structure of PHB shows high crystallinity of 50–70%, and thus it is an excellent gas permeability barrier. The polymer has a high tensile strength of 40 MPa, which results from an elasticity coefficient reaching up to 3 GPa. The high resistivity value of 10¹⁶ Ohm/cm makes PHB a good electrical insulator [39].

This polymer, in addition to many unquestionable benefits, also exhibits some shortcomings, which limit its use or become a challenge for the industry. PHB is sensitive to acids and bases (particularly concentrated ones), and dissolves in chloroform and other chlorinated hydrocarbons. The disadvantage of this biopolymer is also its brittleness at the level of 3–5%, which proves to be particularly problematic during the polymer stretching [5, 39].

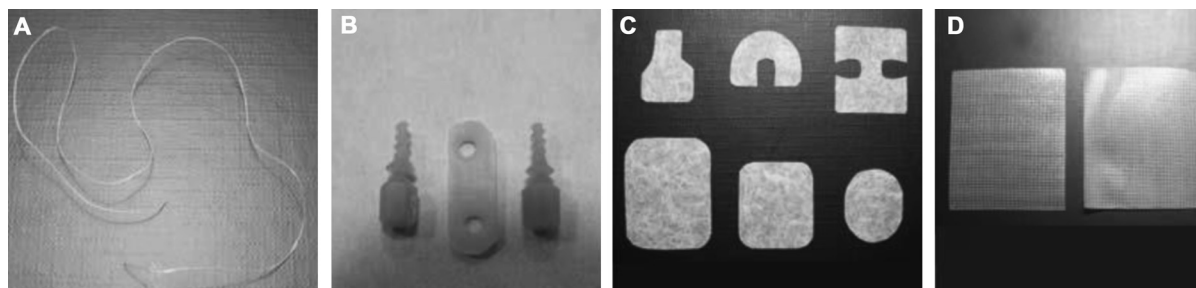


Fig. 3. Medical accessories made of PHB copolymers. Explanation of the presented elements: absorbable surgical threads (A), screws and plates stabilising the bones (B), membranes used in dentistry (C), dressing nets without admixtures – on the left and soaked with medicaments – on the right (D). Based on Bonartsev *et al.* [4].

In order to improve its properties, attempts have been made to incorporate admixtures of other polymers into PHB. As a result of the experiments, in which hydroxybutyrate monomers were introduced into the poly-3-hydroxybutyrate molecules, poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV) was obtained. PHBV produced in this process displays much lower brittleness and greater plasticity in comparison with PHB, and therefore it is more commonly used in the industry than PHB. However, it should be noted that PHB is necessary for the production of PHBV, as it is the main component of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate. It is worth mentioning that, similarly to PHB, PHBV undergoes decomposition under aerobic conditions to carbon dioxide and water, and therefore is a fully biodegradable polymer [12, 14]

5. Application of poly-3-hydroxybutyrate

This group of biopolymers have been known since the 1980s, when Zeneca Bio Products from Great Britain distributed the first PHBV products manufactured on an industrial scale. PHBV adopted the trade name *Biopol*. It is noteworthy that PHB can be obtained not only in the process of bacterial metabolism or chemical synthesis. Research is currently being conducted on obtaining PHB from specially selected yeast strains or genetically modified plants [3, 28, 39].

The main barrier limiting the widespread use of biopolymers in the industry is the high costs associated with the optimisation of the production. However, indisputable environmental benefits resulting from the properties of biodegradable polymers are the reasons why the PHB copolymers are frequently used as packaging material [9, 10].

PHB copolymers have been used for the production of bottles, food containers, and disposable tableware (such as water cups), as both PHB and PHBV are insoluble in water. PHBV has also been used in the production of toiletries such as toothbrushes, razors,

or cotton buds. The use of PHB copolymers as packaging for cosmetics and shampoos has contributed to the significant popularisation of biopolymers in the industry and trade [10].

PHB copolymers are fully biocompatible, and the products of their degradation are non-toxic to humans and animals. Therefore, PHB is also used in the fields of medicine, dentistry, and pharmacy. Moreover, medical accessories made of PHB copolymers have long since gone beyond the experimental medicine. Biopolymer sutures, screws, bolts, pins, bone-stabilising plates, and similar implants utilised during surgery have the advantage over the metal elements in that they degrade in the body of the patient, thus eliminating the necessity for another procedure in order to remove metal implants. Moreover, biopolymers are lighter and cheaper than metal replacements, which translates into postoperative comfort of the patient and the costs of the operation itself. In addition to products in the solid form, gels containing PHB, which successfully replace bandages and dressings after drying, are also used. Such “biopolymer dressings” may be used for both bruises and open wounds. Furthermore, anti-inflammatory drugs, analgesics, or antibiotics may be added, which are released to the bandaged body part during the biodegradation of the polymer, thus further supporting the treatment of injuries and wound healing [4, 14] (Fig. 3).

PHB gels are not the only drug carriers that are currently being considered. The modern pharmaceutical industry currently focuses on the so-called Drug Delivery System (DDS). It is a controlled drug dosing system, which aims to precisely deliver active substances, to obtain the most effective medication, and to eliminate side effects. The use of biocompatible polymers as drug carriers in the form of nanotubes, among others, is currently gaining increasing popularity, which brings new possibilities of controlled distribution of drugs, in which the dosing would be gradual with the biodegradation of PHB. DDS systems with poly-3-hydroxybutyrate as the drug carrier may be used both outside and inside of the patient’s body [8, 14, 19].

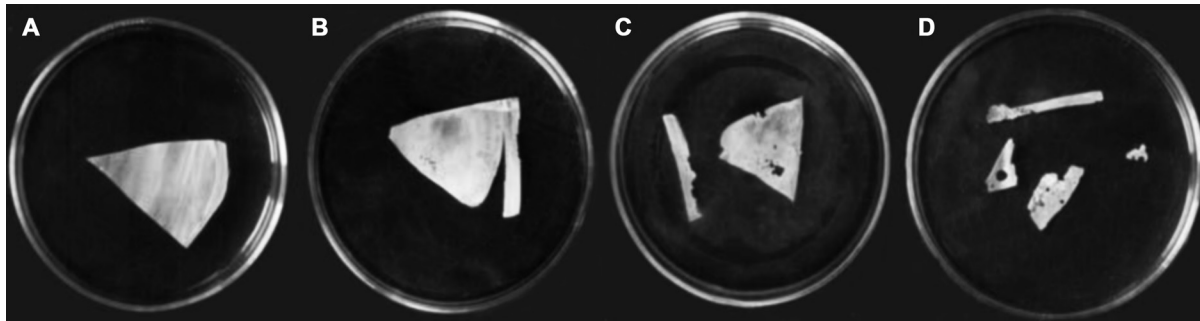


Fig. 4. Fragments of the PHB film after two months of incubation in soil suspension with different nitrate content. Explanation of the presented elements: Undecomposed film – comparative test (A), film decomposed in anaerobic conditions without addition of nitrates (B), degradation in aerobic conditions without addition of nitrates (C), aerobic degradation with addition of nitrates (D). Based on Bonartsev *et al.* [4].

PHB degradation inside the body occurs as a result of hydrolysis carried out by appropriate enzymes – non-specific esterases that break down ester bonds causing the formation of acids and alcohols, which are subjected to further oxidation [4].

6. Biodegradation of poly-3-hydroxybutyrate in the environment

Microorganisms capable of synthesising poly-3-hydroxybutyrate are equipped with enzymes to biodegrade it. PHB degrading enzymes are also found in fungi including: *Penicillium* and *Aspergillus*. Biodegradation of PHB is based on systematic depolymerisation of poly-3-hydroxybutyric acid, carried out by specific enzymes called PHB depolymerases and esterases, which break the bonds between consecutive terminal monomers from the end to the beginning of the polymer chain. PHB depolymerase occurs in the form of two isoenzymes, one of which carries out depolymerisation at the ends of the PHB chain, whilst the other catalyses the reaction inside the polymer chain. Both isoenzymes function simultaneously in the cell, complementing each other in dynamically catalysing the depolymerisation reaction [18, 36].

As a result of the activity of specific enzymes, the polymer chain is gradually shortened, losing its previous physical, chemical and mechanical properties. This is because the properties of the polymer are closely related to the structure and the molecular weight of the PHB. The first macroscopic symptoms of degradation of poly-3-hydroxybutyric acid are: increased fragility and brittleness, as well as decreased elasticity and extensibility. Depolymerisation of PHB leads to losses in its structure. Over time, the porosity of the material increases to an extent, which is visible to the naked eye [18].

The degradation of the polymer takes place both under aerobic and anaerobic conditions. It is carried out by bacteria living in soil, water or sewage sludge.

The gradual fragmentation of poly-3-hydroxybutyrate is accompanied by the process of monomer oxidation, which ultimately leads to the total decomposition of PHB into carbon dioxide (or methane in anaerobic processes), water and other biomass [20].

The polymer sinks in the water and can, therefore, be degraded by microorganisms inhabiting sewage sludge. However, studies based on soil incubations proved that anaerobic decomposition of PHB is less effective than degradation of the polymer under aerobic conditions. In the same experiment, it was also shown that the nitrogen content in the soil environment has a significant influence on the course of the PHB decomposition. The effectiveness of polymer degradation also depends on many other factors, such as temperature, humidity, pH of the environment, level of activity of microorganisms in the environment, or availability of nutrients. After two months of poly-3-hydroxybutyrate film residing in a soil suspension, the most intensive polymer degradation was observed under aerobic conditions in the presence of nitrates, while without addition of nitrates the degradation was much slower. The lowest level of degradation was observed in the

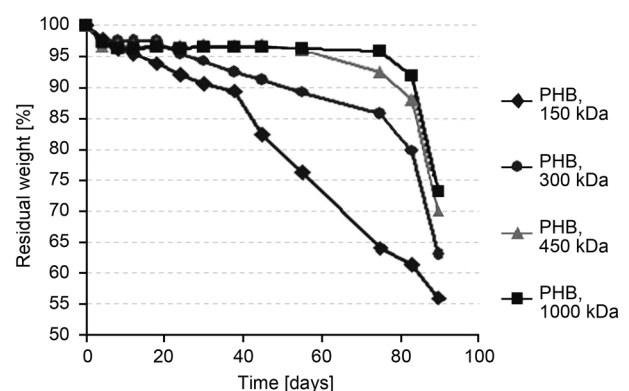


Fig. 5. The course of degradation of the PHB films of different molecular weights: 150, 300, 450, 1000 kDa. PHB degradation took place *in vivo*, the film was stored for 90 days immersed in phosphate buffer (pH = 7.4) at 70°C. Based on Bonartsev *et al.* [4].

fragments of polymer films stored under anaerobic and nitrate-free conditions [4, 20, 36] (Fig. 4).

The rate of polymer decomposition is also influenced by its physicochemical properties. The molecular weight of the polymer plays a key role, because the lower it is, the faster the degradation process. The structure of the polymer surface (its porosity), the melting point (the higher the melting point, the more durable the polymer), its spatial configuration, and the degree of crystallisation are also important [4, 20] (Fig. 5).

7. Summary

Poly-3-hydroxybutyrate belongs to a large group of biodegradable polymers called polyhydroxyalkanoates. PHB is a linear polyester of 3-hydroxybutyric acid, accumulated by microorganisms under physiological stress caused by e.g., deficiency of biogenic elements, with simultaneous excess of the carbon source. Methanotrophic bacteria belonging to type II show high efficiency in the production of PHB, which is a reserve material accumulated inside the cells. The use of methanotrophs for PHB production on a larger scale has a realistic basis and may be accomplished in the future. Moreover, such a solution has an additional benefit as it assumes the use of waste methane as the basic carbon substrate. Methane produced e.g., at landfills would be utilised, thus reducing its share in the greenhouse effect, while the use of waste methane as the carbon source for methanotrophs would significantly reduce the costs of PHB production. Poly-3-hydroxybutyrate shows similar physicochemical properties as conventional polymers. At the same time, it remains environmentally friendly due to the rapid course of biodegradation, during which non-toxic breakdown products are formed. Therefore, PHB is an interesting alternative to petrochemical polymers. PHB has already found a number of applications in the industry, areas of medicine and pharmacy, and studies on extending its applicability are still ongoing and produce measurable outcomes in the form of copolymers such as polyhydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV). Growing interest in the subject of biodegradable polymers creates real opportunities to reduce the consumption of minerals used in the production of plastics and to manage waste much faster, easier and cheaper, the spontaneous biodegradation of which will not pose a risk to the natural environment.

Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659/P-DUN/2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

References

- Anderson A., Dawes E.: Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**, 450–472 (1990)
- Ansari S., Fatma T.: Polyhydroxybutyrate – a biodegradable plastic and its various formulations. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* **3**, 9494–9499 (2014)
- Ansari S., Fatma T.: Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. *PLoS ONE*, **11**, 6 (2016)
- Bonartsev A., Myshkina V., Nikolaeva D., Furina E., Makhina T., Livshits V., Boskhomdzhiev A., Ivanov E., Iordanskiy A., Bonartseva G.: Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers – natural polyesters produced by diazotrophic bacteria (w): Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, red. Mendez-Vilas A. tom. 1, Formatex, Badajoz, 2007, s. 295–307
- Braunegg G., Lefebvre G., Genser K.: Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* **65**, 127–161 (1999)
- Bussman I., Pester M., Brune A., Schink B.: Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance). *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**, 179–189 (2004)
- Cantera S., Munõz R., Lebrero R., López J.C., Rodríguez Y., García-Encina P.A.: Technologies for the bioconversion of methane into more valuable products. *Curr. Opin. Biotech.* **50**, 128–135 (2018)
- Dinjaski N., Prieto M.A.: Smart polyhydroxyalkanoate nanobeads by protein based functionalization. *Nanomedicine*, **11**, 885–899 (2015)
- Gao X., Chen J.C., Wu Q., Chen G.Q.: Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 768–774 (2011)
- Gwynne J.: Chemistry in its element – polyhydroxybutyrate. *Chemistry World*, <https://www.chemistryworld.com/podcasts/polyhydroxybutyrate/3005910.article> (12.05.2019)
- Grage K., Jahns A.C., Parlange N., Palanisamy R., Rasiah I.A., Atwood J.A., Rehm B.H.A.: Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*, **10**, 660–669 (2009)
- Hankermeyer C., Tjeerdema R.: Polyhydroxybutyrate: plastic made and degraded by microorganisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **159**, 1–24 (1999)
- Hanson R., Hanson T.: Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**, 439–471 (1996)
- Jedliński Z., Juzwa M.: Kontrolowane uwalnianie leków: nowa strategia w chemoterapii. *Inżynieria Biomateriałów*, **22**, 12–16 (2002)
- Jiang H., Chen Y., Jiang P., Zhang C., Smith T., Murrell C., Xinga X.: Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochem. Eng. J.* **49**, 277–288 (2010)
- Knief C.: Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker. *Front. Microbiol.* **6**, 1346 (2015)
- Madison L., Huisman G.: Metabolic engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 21–53 (1999)
- Nowak B., Pająk J., Płociniczak T., Łabużek S.: Enzymy uczestniczące w biodegradacji polimerów. *Biotechnologia*, **80**, 45–52 (2008)

19. Ojeda T.: Polymers and the environment. (w): Polymer Science, red. Yilmaz F. In Tech. Janeza Trdine, 2013, s. 11–40
20. Ojumu T., Yu J., Solomon B.: Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *Afr. J. Biotechnol.* **3**, 18–24 (2004)
21. Pachekoski W., Agnelli J., Belem L.: Thermal, mechanical and morphological properties of poly (Hydroxybutyrate) and polypropylene blends after processing. *Mat. Res.* **12**, 159–164 (2009)
22. Pfeiffer D., Jendrossek D.: Localization of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granule-associated proteins during PHB granule formation and identification of two new phasins, PhaP6 and PhaP7, in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* **194**, 5909–5921 (2012)
23. Pieja A., Rostkowski K., Criddle C.: Distribution and selection of poly-3-hydroxybutyrate production capacity in methanotrophic proteobacteria. *Microb. Ecol.* **62**, 564–573 (2011)
24. Pieja A., Sundstrom E., Criddle C.: Poly-3-Hydroxybutyrate metabolism in the type II methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6012–6019 (2011)
25. Pötter M., Steinbüchel A.: Biogenesis and structure of polyhydroxyalkanoate granules. *Microbiol. Monogr.* **1**, 110–136 (2006)
26. Rehm B.H.A.: Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 578–592 (2010)
27. Rożej A., Stępniewski W., Małek W.: Bakterie metanotroficzne w ekosystemach. *Post. Mikrobiol.* **38**, 295–313 (1999)
28. Sabbir A., Tasneem F.: Polyhydroxybutyrate – a biodegradable plastic and its various formulations. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng.* **3**, 9494–9497 (2007)
29. Shah N., Hanna M., Jackson K., Taylor R.: Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3B: IV production of hydrogen-driven soluble or particulate methane monooxygenase activity. *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 229–238 (1996)
30. Sita L., Hema T., Divya T., Starin T.: Production and optimization of Polyhydroxybutyrate from *Rhizobium* sp. present in root nodules. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* **3**, 21–25 (2012)
31. Stępniewska Z., Szafranek-Nakonieczna A., Wołoszyn A., Ciepelski J.: Methanotrophs responsible for methane oxidation in natural peats from Polesie Lubelskie Region. *Acta Agroph.* **19**, 181–193 (2012)
32. Stępniewska Z., Pytlak A., Kuźniar A.: PmoA based detection of methanotrophic bacteria in coal-bed rocks of the Lublin coal basin. *Acta Agroph.* **19**, 403–413 (2012)
33. Stępniewska Z., Pytlak A., Kuźniar A.: Methanotrophic activity in Carboniferous coalbed rocks. *Int. J. Coal Geol.* **106**, 1–10 (2013)
34. Sundstrom E., Criddle C.: Optimization of Methanotrophic growth and production of Poly(3-Hydroxybutyrate) in a high-throughput microbioreactor system. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 4767–4773 (2015)
35. Szafranek-Nakonieczna A., Stępniewska Z.: Metanogeny – charakterystyka, funkcje i wymagania środowiskowe (w) Na pograniczu chemii i biologii red. Koroniak H., Barciszewski J., tom 26. Wydawnictwo Naukowe UAM. Poznań, 2011, s. 317–357
36. Tokiwa Y., Calabia B.: Degradation of microbial polyesters. *Biotechnol. Lett.* **26**, 1181–1189 (2004)
37. Trotsenko Y., Belova L.: Biosynthesis of poly(3-Hydroxybutyrate) and poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) and its regulation in bacteria. *Microbiology*, **69**, 635–645 (2000)
38. Verlinden R., Hill D., Kenward M., Williams C., Radecka I.: Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 437–441 (2007)
39. Vroman I., Tighzert L.: Biodegradable Polymers. *Materials*, **2**, 321–328 (2009)
40. Wahl A., Schuth N., Pfeiffer D., Nussberger S., Jendrossek D.: PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiol.* **12**, 262 (2012)
41. Wendlandt K., Jechorek M., Helm J., Stottmeister U.: Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *J. Biotechnol.* **86**, 127–133 (2001)
42. Zhang T., Wang X., Zhou J., Zhang Y.: Enrichments of methanotrophic-heterotrophic 562 cultures with high poly-β-hydroxybutyrate (PHB) accumulation capacities. *J. Environ. Sci.* **65**, 133–143 (2018)
43. Zhang Y., Xin J., Chen L., Song H., Xia C.: Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol. *J. Nat. Gas Chem.* **17**, 103–109 (2008)
44. Zhang Y., Xin J., Chen L., Wang Y.: The methane monooxygenase intrinsic activity of kinds of methanotrophs. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **157**, 431–441 (2009)
45. Zhang Y., Xin J., Chen L., Wang Y.: Biosynthesis of poly-β-Hydroxybutyrate as new material of food packing by various strains of methanotrophs from methane. *Adv. Mat. Res.* **183**, 924–928 (2011)
46. Zhang Y., Xin J., Dong J., Song H., Xia C.: An experimental study on molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) accumulated in *Methylosinus trichosporium* IMV 3011. *Afr. J. Biotechnol.* **36**, 7078–7087 (2011)

POLI-3-HYDROKSYMAŚLAN JAKO PRZYKŁAD BIOPOLIMERU PRODUKOWANEGO PRZEZ BAKTERIE METANOTROFICZNE

Adam Kubaczyński*, Anna Pytlak, Zofia Stępniewska

Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, Katedra Biochemii i Chemii Środowiska,
ul. Konstantynów II, 20-708 Lublin

Wpłynęło w lipcu 2018 r., zaakceptowano w lipcu 2019 r.

Streszczenie: Poli-3-hydroksymaślan jest jednym z najbardziej użytecznych naturalnych biopolimerów produkowanych przez bakterie metanotroficzne. Metanotrofy stanowią liczną grupę mikroorganizmów występujących w różnorodnych środowiskach, jednak szczególnie chętnie zasiedlają miejsca charakteryzujące się wzmoczoną produkcją metanu, takie jak bagna, torfowiska, pola ryżowe, czy szeroko pojęte złoża geologiczne. W próbach środowiskowych coraz częściej identyfikowane są bakterie metanotroficzne, będące ważnym obiektem badań dla specjalistów z dziedziny biotechnologii środowiskowej. Metanotrofy to Gram-ujemne mikroorganizmy, należące do typu *Proteobacteria* i zaliczane do metylotrofów. W swoim cyklu życiowym wykorzystują metan jako główne źródło węgla i energii. PHB (Poly-3-hydroxybutyrate) jest liniowym poliestrem kwasu 3-hydroksymasłowego, akumulowanym przez mikroorganizmy w warunkach stresu fizjologicznego, spowodowanego np. niedoborem pierwiastków biogennych, takich jak azot czy fosfor oraz przy jednoczesnym nadmiarze źródła węgla. Poli-3-hydroksymaślan należy do dużej grupy biodegradowalnych polimerów, określanej jako polihydroksyalkanolany. PHB wykazuje właściwości fizyczno-chemiczne podobne do konwencjonalnych polimerów. Jednocześnie pozostaje przyjazny środowisku ze względu na szybki przebieg biodegradacji, podczas której powstają nietoksyczne produkty rozpadu. Wobec tego poli-3-hydroksymaślan jest ciekawą alternatywą dla polimerów pochodzenia petrochemicznego. PHB znalazł już szereg zastosowań w przemyśle, medycynie i farmacji.

1. Wprowadzenie. 2. Ogólna charakterystyka metanotrofów. 3. Biosynteza poli-3-hydroksymaślanu prowadzona przez metanotrofy. 4. Charakterystyka polihydroksyalkanolanów i poli-3-hydroksymaślanu. 5. Zastosowanie poli-3-hydroksymaślanu. 6. Biodegradacja poli-3-hydroksymaślanu w środowisku. 7. Podsumowanie

POLY-3-HYDROXYBUTYRATE AS AN EXAMPLE OF A BIOPOLYMER PRODUCED BY METHANOTROPHIC BACTERIA

Abstract: The objective of this review paper is to present the current state of knowledge about poly-3-hydroxybutyrate produced by methanotrophic bacteria. Methanotrophs are a large group of microorganisms, which live in different kinds of environment, but they preferably occupy places with high methane production, such as swamps, peat bogs, rice fields, or widely understood geological deposits. Methanotrophic bacteria are an important object of research for specialists of environmental biotechnology, are increasingly identified in environmental samples. Methanotrophs are Gram-negative microorganisms, they belonging to the group of *Proteobacteria* and classified as methylotrophs. In their metabolic cycle, they use methane as the main source of coal and energy. PHB is a linear polyester of 3-hydroxybutyric acid, PHB is accumulated in microorganisms during physiological stress, triggered by the deficit of biogenic elements, such as nitrogen or phosphorus and when the concentration of carbon source is high. Poly-3-hydroxybutyrate belongs to a large group of biodegradable polymers known as polyhydroxyalkanoates. PHB has a similar physico-chemical properties as conventional polymers. PHB is environmentally friendly due to the fast biodegradation and production non-toxic waste during degradation. For this reason poly-3-hydroxybutyrate is an interesting alternative to petrochemical polymers. PHB found a lot of applications in industry, medicine and pharmacy.

1. Introduction. 2. General characteristic of methanotrophic bacteria. 3. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate by methanotrophic bacteria. 4. Polyhydroxyalkanoates and poly-3-hydroxybutyrate characteristic. 5. Application of poly-3-hydroxybutyrate. 6. Biodegradation of poly-3-hydroxybutyrate in the environment. 7. Summary

Słowa kluczowe: bakterie metanotroficzne, biopolimery, poli-3-hydroksymaślan, polihydroksyalkanolany
Key words: methanotrophic bacteria, biopolymers, poly-3-hydroxybutyrate, polyhydroxyalkanoates

1. Wprowadzenie

Postępujący rozwój cywilizacyjny niesie za sobą wzrost produkcji i konsumpcji, a co za tym idzie wzmoczone nagromadzenie odpadów. Znaczną ich część stanowią materiały opakowaniowe wytworzone z polimerów pochodzenia petrochemicznego. Są one trudne do usunięcia ze środowiska, ze względu na długi

czas degradacji oraz szkodliwe produkty rozkładu. Czas rozkładu konwencjonalnych polimerów jest szacowany w dziesiątkach, setkach, a nawet tysiącach lat. Ponadto do ich produkcji wykorzystuje się surowce nieodnawialne (głównie ropę naftową), a energia zastosowana w procesie produkcyjnym jest trudna do odzyskania. W odpowiedzi na te wyzwania zaczęto poszukiwać alternatywy dla konwencjonalnych polimerów. Przemysł

* Autor korespondencyjny: mgr Adam Kubaczyński, Katedra Biochemii i Chemii Środowiska, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, ul. Konstantynów II, 20-708 Lublin; tel.: 665 721 615; e-mail: adamkubaczynski@interia.pl

ukierunkowany na produkcję tworzyw sztucznych, zwraca obecnie coraz większą uwagę na biopolimery pochodzenia naturalnego, które w odróżnieniu od syntetycznych, łatwo ulegają rozpadowi z udziałem mikroorganizmów glebowych, a ponadto rozkładane są do nieszkodliwych związków takich jak ditlenek węgla i woda. Z drugiej strony biopolimery wykazują podobieństwo do polimerów syntetycznych pod względem właściwości fizyczno-chemicznych [2, 12, 19, 39]. Ciekawym przykładem takiego biopolimeru jest poli-3-hydroksymaślan (PHB, poly-3-hydroxybutyrate), który znalazł już szerokie zastosowanie w przemyśle, medycynie i farmacji. PHB jest syntezowany i akumulowany jako materiał zapasowy w komórkach wielu rodzajów mikroorganizmów [2, 21]. Na całym świecie, od przeszło 20 lat prowadzone są badania, ukierunkowane na poszukiwanie mikroorganizmów szczególnie efektywnych w biosyntezie poli-3-hydroksymaślanu.

2. Ogólna charakterystyka metanotrofów

W bogatej i niezidentyfikowanej w pełni florze bakteryjnej, zasiedlającej otoczenie złóż geologicznych można natrafić na przedstawicieli różnorodnych grup mikroorganizmów. W próbach pochodzących z pokładów węgla kamiennego i soli coraz częściej identyfikowane są bakterie metanotroficzne, będące szczególnie cennym obiektem badań dla specjalistów z dziedziny biotechnologii środowiskowej. Metanotrofy to Gram-ujemne, bakterie wykorzystujące w swoim cyklu życiowym metan jako główne źródło węgla i energii. Należą m.in. do typu *Proteobacteria* i są zaliczane do metylo-
trofów [27, 32, 33].

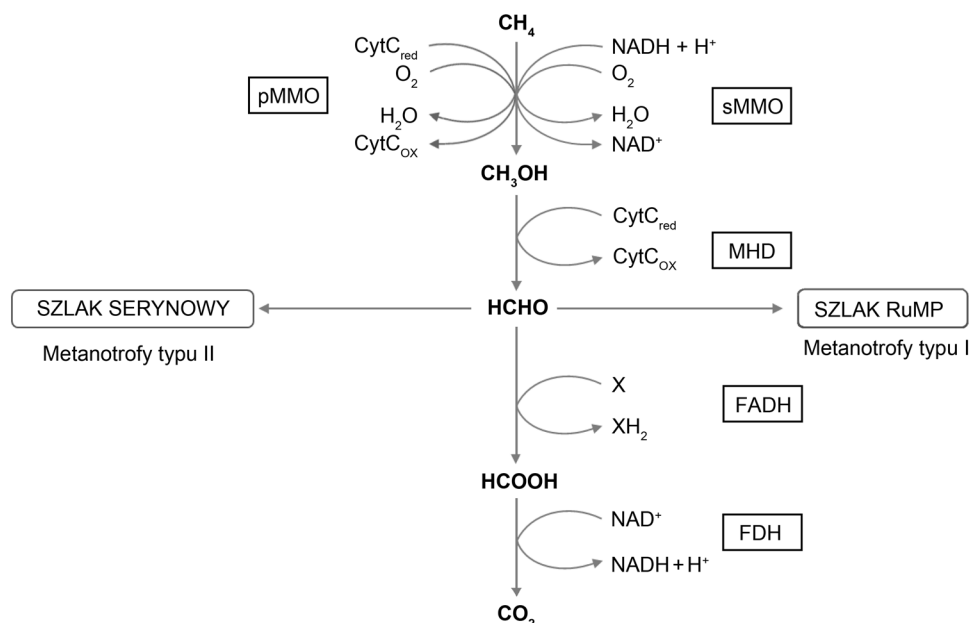
Główną cechą charakteryzującą metanotrofy jest zdolność utleniania metanu do metanolu. Reakcja ta jest katalizowana przez specyficzny enzym – monooksygenazę metanu (MMO). Monooksygenaza przeprowadza utlenianie metanu do metanolu, a rola MMO w tej reakcji sprowadza się do rozerwania podwójnego wiązania w cząsteczce O_2 . Jeden z powstałych w ten sposób atomów tlenu dołączany jest do cząsteczki metanu w wyniku czego powstaje metanol, natomiast drugi atom tlenu zostaje zredukowany do H_2O . Następnie metanol jest dalej utleniany przez dehydrogenazę metanolu do formaldehydu, a formaldehyd zostaje przeprowadzony do mrówczanu przy udziale dehydrogenazy formaldehydowej. Ostatnim etapem jest utlenienie mrówczanu przez dehydrogenazę mrówczanową do ditlenku węgla i wody, stanowiących produkty końcowe reakcji. Wyróżnia się dwa warianty MMO, inicjującej utlenianie metanu: cytoplazmatyczną rozpuszczalną monooksygenazę metanu (sMMO) oraz monooksygenazę błonową (pMMO). Rolę funkcjonalnego markera metanotrofów pełni pMMO, ponieważ występuje w komórkach tych bakterii znacznie powszechniej niż

sMMO. Ponadto pMMO jest bardziej specyficzna substratowo i charakteryzuje się większą aktywnością przy utlenianiu węglowodorów niskocząsteczkowych takich jak metan. Na podstawie wybranych metanotrofów (*Methylococcus cupsulurus* i *Methylosinus trichosporium* OB3b) wykazano, że produkcja danego wariantu MMO jest uzależniona od dostępności jonów miedzi. Forma pMMO powstaje, gdy w środowisku dostępna jest optymalna ilość jonów Cu^{2+} , natomiast sMMO jest syntetyzowana w warunkach niedoboru Cu^{2+} . Do prawidłowego funkcjonowania obydwu typów MMO wymagana jest również obecność O_2 i NADH [29, 31, 42, 44].

Bakterie metanotroficzne stanowią liczną grupę mikroorganizmów występujących w różnorodnych środowiskach (zarówno lądowych jak i wodnych), jednak szczególnie chętnie zasiedlają miejsca charakteryzujące się wzmożoną produkcją metanu takie jak bagna, torfowiska, pola ryżowe, czy szeroko pojęte złoża geologiczne. Posiadają zdolność utleniania metanu do ditlenku węgla z udziałem tlenu atmosferycznego. Metan jest gazem obecnym w atmosferze w stężeniu ok. 1000 razy mniejszym niż ditlenek węgla, ma jednak znacznie silniejszy wpływ cieplarniany niż CO_2 . Biologiczne utlenianie metanu jest uznawane za jeden z najwydajniejszych procesów eliminacji nadmiaru tego gazu cieplarnianego z atmosfery. Szacuje się, że metanotrofy pobierają około 10% metanu zawartego w atmosferze. Prowadzą również intensywne utlenianie metanu zawartego w glebach i wodach, przyczyniając się do minimalizacji efektu cieplarnianego. Z tego względu metanotrofy mają istotny udział w przebiegu globalnego cyklu metanu [13, 15].

W ostatnim dwudziestopięcioleciu poznano wiele ekstremofilnych grup bakterii metanotroficznych, a wśród nich: halofilne, termofilne, acidofilne, alkalofilne i wiele innych. Z racji swoich przystosowań mogą z powodzeniem bytować bez dostępu światła np. w kopalniach węgla, w środowiskach silnie zasolonych takich jak kopalnie soli, w niskich lub wysokich temperaturach (w przedziale od $4^{\circ}C$ do ponad $70^{\circ}C$), tym samym można je znaleźć w miejscach o różnorodnym klimacie. Są spotykane w środowiskach zarówno zasadowych, alkalicznych jak i kwasowych [16, 35].

Potencjał przystosowawczy metanotrofów jest ogromny, a uwarunkowania strukturalne i funkcjonalne, z których ten potencjał wynika, nie są jeszcze do końca poznane. Wiadomo obecnie o dwóch głównych mechanizmach adaptacyjnych prowadzonych przez te bakterie. Pierwszy z nich polega na wewnątrzkomórkowej syntezie i akumulacji organicznych osmoprotektantów takich jak: sacharoza, glutaminian, ektoina oraz jonów potasowych. Drugim rodzajem przystosowań są modyfikacje w strukturze i funkcji błon komórkowych, obejmujące najczęściej: zmiany w ułożeniu fosfolipidowych błon oraz zwiększoną koncentrację powierzchniowych glikoprotein po stronie warstwy S [15].



Ryc. 1. Utlenianie metanu i szlaki asymilacji węgla prowadzone przez metanotrofy typu I i II. Objaśnienia: pMMO – monoooksygenaza metanu związana z błoną; sMMO – cytoplazmatyczna monoooksygenaza metanu; CytC – cytochrom c; MDH – dehydrogenaza metanolu; FADH – dehydrogenaza formaldehydu; FDH – dehydrogenaza mrówczanu. Na podstawie Zhang i wsp. [45].

Ze względu na preferowane stężenie metanu w środowisku metanotrofy zostały podzielone na dwie grupy. Do pierwszej należą metanotrofy, które z powodzeniem bytują w atmosferycznym stężeniu metanu, dzięki wysokiemu powinowactwu do CH_4 . Drugą grupę stanowią metanotrofy preferujące znacznie wyższe niż atmosferyczne stężenia metanu, gdyż charakteryzują się niskim powinowactwem do CH_4 [31].

3. Biosynteza poli-3-hydroksymaślanu prowadzona przez metanotrofy

Metanotrofy biosyntetyzujące PHB

Bakterie metanotroficzne stanowią zróżnicowaną grupę mikroorganizmów. Mają odmienne preferencje co do zasiedlanych ekosystemów, stężeń metanu w atmosferze, temperatury czy pH środowiska. Wykorzystują różne typy monoooksygenazy metanu (MMO) podczas utleniania substratu. Wiadomo również, że niektóre rodzaje metanotrofów są w stanie syntetyzować poli-3-hydroksymaślan (PHB) jako materiał zapasowy. Przyczyn tych różnic należy się doszukiwać w metabolizmie metanotrofów, a konkretnie w sposobach asymilacji węgla [15, 16, 27].

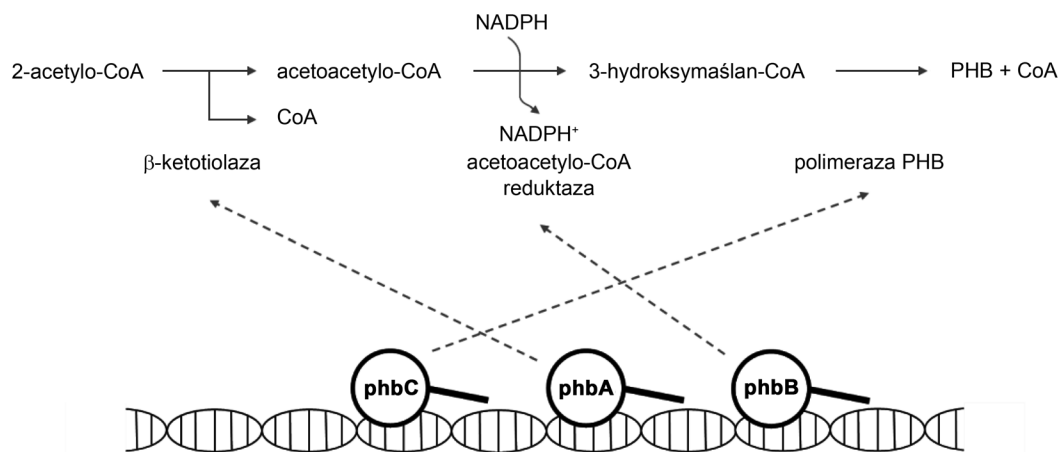
W toku reakcji enzymatycznych metan ulega stopniowemu utlenieniu z wytworzeniem licznych półproduktów. Wyróżnia się dwie główne drogi asymilacji węgla: szlak rybulozo-monofosforanowy (RuMP) oraz szlak serynowy. Początkowo metan zostaje utleniony przez MMO do metanolu. Dalsze utlenianie formaldehydu może mieć różny przebieg, w zależności od szlaku

prowadzenia asymilacji węgla. Na podstawie rodzaju przeprowadzanego szlaku asymilacji węgla oraz analizy struktury błony, metanotrofy dzieli się na typ I lub typ II. Dodatkowo w obrębie typu I wyróżnia się dwie podgrupy: typ 1a i typ 1b. Typ 1a metanotrofów utlenia formaldehyd wykorzystując szlak rybulozo-monofosforanowy, natomiast typ 1b używa do tego celu szlaku rybulozo-serynowego. Metanotrofy typu 1a akumulują znaczne większe ilości PHB niż te należące do typu 1b. Przedstawicielami metanotrofów typu 1a są m.in. bakterie z rodzaju: *Methylobacter*, *Methylo-microbium*, *Methylomonas*, *Methylosarcina*, *Methylo-sphaera*. Rodzaje należące do typu 1b to *Methylococcus* i *Methylocaldum*. Bakterie metanotroficzne sklasyfikowane jako typ II przeprowadzają asymilację węgla według szlaku serynowego, co przekłada się na ich zdecydowanie najwyższą wydajność w akumulacji PHB. Typ II jest reprezentowany przez bakterie metanotroficzne z rodzaju: *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocapsa* i *Methylocella* [6, 24, 34, 45] (Ryc. 1.).

Mechanizm biosyntezy PHB

Poli-3-hydroksymaślan jest materiałem zapasowym komórek bakteryjnych, a jego synteza zachodzi w warunkach stresu fizjologicznego. Produkcja i magazynowanie PHB zachodzi szczególnie intensywnie przy niedoborze pierwiastków biogennych takich jak: azot, fosfor, magnez oraz przy jednoczesnym nadmiarze źródła węgla w środowisku [7, 22, 23].

Poszczególne etapy syntezy PHB są katalizowane specyficznymi enzymami (Ryc. 2). Ich obecność warunkuje



Ryc. 2. Przebieg biosyntezy PHB wraz z uwzględnieniem enzymów katalizujących kolejne etapy reakcji i kodujących je genów operonu *phbCAB*. Na podstawie Madison i wsp. [17].

prawidłowy przebieg poszczególnych reakcji. Biosynteza kwasu poli-3-hydroksymasłowego rozpoczyna się od kondensacji dwóch cząsteczek acetylo-CoA, katalizowanej przez enzym β -ketotiolazę. Następnie powstały acetoacetylo-CoA zostaje zredukowany do 3-hydroksymasłanu-CoA pod wpływem acetoacetylo-CoA reduktazy. Syntaza PHB katalizuje reakcję polimeryzacji cząsteczek 3-hydroksymasłanu-CoA (będącymi jednostkami monomerowymi) do poli-3-hydroksymasłanu. Podczas wydłużania się polimeru, syntaza PHB pozostaje kowalencyjnie związana z łańcuchem cząsteczki [17, 46].

Kolejne enzymy szlaku syntezy PHB są kodowane przez geny z grupy *phbCAB* i tak: gen *phbA* koduje β -ketotiolazę, *phbB* odpowiada za powstawanie acetoacetylo-CoA reduktazy, a *phbC* jest genem kodującym syntazę PHB. Obecność genów *phbCAB* w genomie bakterii metanotroficznych jest wyznacznikiem wydajnie przebiegającej syntezy PHB. Wspomniane geny zostały zidentyfikowane w większości metanotrofów typu II, natomiast nie wykryto ich u metanotrofów typu I. Potwierdza to tezę o metanotrofach typu II jako najwydajniejszych producentach kwasu poli-3-hydroksymasłowego [4, 17, 24].

Badania prowadzone nad szlakiem syntezy PHB wykazały, że kluczowe enzymy katalizujące poszczególne reakcje występują w postaci izoform. Występowanie odmiennych form strukturalnych tego samego enzymu powoduje różnice w przebiegu reakcji enzymatycznej oraz rzutuje na strukturę produktów tej reakcji. Z drugiej strony, duże podobieństwo w strukturze izoenzymów powoduje, że różne warianty tego samego enzymu posiadają identyczny skład pierwiastkowy oraz zbliżoną masę cząsteczkową. Charakteryzują się też zbliżonymi właściwościami fizyczno-chemicznymi [37].

Enzym β -ketotiolaza występuje w trzech postaciach, które prowadzą acetylowanie substratów, różniących się

długością łańcuchów węglowych. Izoenzym charakterystyczny dla krótkołańcuchowych substratów (zawierających 2 lub 4 atomy węgla) katalizuje odwracalne przeniesienie grupy acetylowej na cząsteczkę acetylo-CoA, odgrywając tym samym kluczową rolę w biosyntezie PHB. Działanie drugiego izoenzymu β -ketotiolazy jest związane z substratami o średniej długości łańcucha węglowego (od 4 do 16 atomów węgla), a jego rola sprowadza się do β -utleniania kwasów tłuszczowych. Trzecia forma tego enzymu jest zarezerwowana dla komórek eukariotycznych, w których β -ketotiolaza prowadzi kondensację cząsteczek acetylo-CoA do acetoacetylo-CoA. Acetoacetylo-CoA u eukariotów pełni funkcję prekursora w syntezie sterydów [1, 34].

Kolejnym enzymem biorącym udział w syntezie PHB jest reduktaza acetoacetylo-CoA, która przeprowadza enzymatyczną redukcję acetoacetylo-CoA do 3-hydroksymasłanu-CoA. Występuje w komórce w postaci dwóch izoenzymów z których jeden jest specyficzny względem NADH, a drugi wobec NADPH. W wyniku reakcji prowadzonej odpowiednio przez pierwszą lub drugą formę acetoacetylo-CoA reduktazy powstają cząsteczki 3-hydroksymasłanu-CoA o różnej konfiguracji przestrzennej. Forma D(-)-3-hydroksymasłanu-CoA powstaje, gdy redukcja jest katalizowana przez izoenzym specyficzny wobec NADPH. Natomiast izoenzym zależny od NADH warunkuje powstanie L(+)-3-hydroksymasłanu-CoA. Z racji tego, że dalsza synteza PHB przebiega tylko przy udziale formy D(-)-3-hydroksymasłanu-CoA, to powstający równolegle w komórce L(+)-3-hydroksymasłanu-CoA wymaga enzymatycznej konwersji do konfiguracji D(-) [4].

Syntaza PHB jest trzecim ważnym enzymem szlaku syntezy kwasu poli-3-hydroksymasłowego. Katalizuje polimeryzację cząsteczek D(-)-3-hydroksymasłanu-CoA prowadząc do elongacji łańcucha polimerowego, a tym samym do powstania poli-3-hydroksymasłanu. Obecnie zidentyfikowano trzy warianty syntazy PHB,

a funkcje dwóch z nich zostały dokładnie poznane. Pierwszy z izoenzymów wykazuje specyficzność wobec pochodnych CoA, kwasów karboksylowych o krótkim łańcuchu (posiadających od 3 do 5 atomów węgla). Druga postać syntazy PHB jest specyficzna dla pochodnych CoA, posiadających łańcuchy średniej długości (od 6 do 14 atomów węgla). Izoenzymy występują w formie rozpuszczonej (nierwałej) lub pozostają związane z syntetyzowanymi granulkami PHB (tworząc trwałe struktury) [37, 41].

Poli-3-hydroksymaślan stanowi materiał zapasowy komórki, która w warunkach niedoboru źródła węgla uruchamia proces rozkładu PHB. Enzymatyczna degradacja kwasu poli-3-hydroksymaślowego jest przeprowadzana przez właściwe depolimerazy, dehydrogenazy 3-hydroksymaślanu i acetoacetylo transferazy. Ostatnim etapem jest odwracalne przekształcenie acetoacetylo-CoA do dwóch cząsteczek acetylo-CoA, przebiegające pod kontrolą β -ketotiolazy. Degradacja PHB służy pozyskaniu źródła węgla i energii, a tym samym zachowaniu ciągłości metabolicznej. Synteza i degradacja PHB w komórce zachodzi cyklicznie, łagodząc tym samym skutki stresu fizjologicznego [37, 46].

4. Charakterystyka polihydroksyalkanolanów i poli-3-hydroksymaślanu

Ogólna charakterystyka PHA

PHB należy do dużej grupy biodegradowalnych polimerów określanych jako polihydroksyalkaniany (PHA, polyhydroxyalkanoates). Wnikliwa charakterystyka PHB wymaga również przywołania podstawowych informacji o strukturze samych polihydroksyalkanianów. Zbudowane są z reszt kwasów hydroksykarboksylowych, których w cząsteczce może być od kilkuset do kilkudziesięciu tysięcy, co przekłada się bezpośrednio na dużą masę cząsteczkową polimerów. Ogólny wzór monomeru można przedstawić w następujący sposób: $-[\text{HO}-\text{CH}(\text{R})-\text{CH}_2-\text{COOH}]_n-$, w którym R oznacza podstawnik alkilowy. Monomery PHA będące w istocie liniowymi cząsteczkami kwasu tłuszczowego mogą być różnej długości, a co za tym idzie mogą różnić się ilością atomów węgla w swojej strukturze. Długość podstawnika alkilowego decyduje o właściwościach fizycznych polimeru. Dzięki temu powstają polihydroksyalkaniany o różnej elastyczności. Każdy monomer posiada na jednym końcu łańcuch grupę hydroksylową, a na drugim końcu grupę karboksylową. Takie rozmieszczenie grup funkcyjnych w cząsteczce kwasu tłuszczowego pozwala na wytworzenie się wiązania estrowego między grupą hydroksylową jednego monomeru, a grupą karboksylową kolejnego. Ze względu na mnogość wiązań estrowych łączących liczne monomery PHA są zaliczane do poliesterów [11, 38, 39].

Polihydroksyalkaniany są coraz częściej brane pod uwagę jako alternatywa w stosunku do syntetycznych tworzyw sztucznych. PHA są gromadzone przez wiele grup bakterii wewnątrz swoich komórek w warunkach niedoboru azotu i nadmiaru źródła węgla, ich zawartość w suchej masie komórkowej sięga nawet 80%. Możliwość pozyskiwania polihydroksyalkanianów z hodowli mikroorganizmów stawia je w opozycji do syntetycznych polimerów, pochłaniających w procesie produkcyjnym ogromne ilości zasobów nieodnawialnych, głównie ropy naftowej. Odpowiednia długość rodnika alkilowego w kwasach tłuszczowych pozwala na uzyskanie PHA o oczekiwanych właściwościach mechanicznych (od twardych elastomerów przez kruche i łamliwe tworzywa, aż po elastyczne folie). Oprócz tego PHA są w pełni biodegradowalne, a odpowiedzialny za ten proces jest enzym esteraza. Tym samym nie zalegają w środowisku zaśmiecając je i tworząc poważne zagrożenie w środowisku tak jak polimery syntetyczne. Wszystkie te aspekty sprawiają, że PHA są uważane za główny surowiec do produkcji opakowań w przyszłości. Jak wiadomo produkcja opakowań jest to ogromna gałąź przemysłu o szerokim zastosowaniu, a wykorzystanie biodegradowalnych polimerów na szeroką skalę będzie z pożytkiem wobec środowiska. To ważne, lecz nie jedyne zastosowanie PHA. Dzięki swoim różnicom waniu pod względem właściwości podejmuje się próby użycia PHA w medycynie i stomatologii jako implanty oraz farmacji przy projektowaniu leków eksperymentalnych [9, 14, 25, 28].

Budowa chemiczna PHB

Historia odkrycia poli-3-hydroksymaślanu (PHB) sięga roku 1925, kiedy to francuski badacz Maurice Lemoigne zauważył, że bakterie pod wpływem stresu fizjologicznego spowodowanego niedoborem składników odżywczych i przy dostępnym w nadmiarze źródle węgla mają możliwość syntetyzowania PHB. Późniejsze badania dowiodły, że poli-3-hydroksymaślan jest odkładany w komórkach mikroorganizmów należących do rodzaju: *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Oscillatoria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Spirillum*. PHB stanowi materiał zapasowy i jest wykorzystywany, gdy inne substraty stanowiące źródło energii i węgla nie są aktualnie dostępne. Występuje w komórkach formie ziaren, których średnica waha się od 100 do 800 nm. Zróżnicowanie w wielkości i ilości ziaren PHB występujących w komórce bakteryjnej wynika głównie z różnorodności wśród mikroorganizmów oraz warunków w jakich bakterie się rozwijają [3, 10, 22, 40].

Cząsteczki kwasu 3-hydroksymaślowego tworzą naturalny poliester jakim jest poli-3-hydroksymaślan. Masa cząsteczkowa polimeru nie jest stała, gdyż zależy od ilości połączonych ze sobą monomerów, a tych może

Tabela I
Zestawienie właściwości polimeru PHB

Odporność chemiczna	Wartość	Jednostka
Kwasy	umiarkowana	
Silne zasady	słaba	
Alkohole	umiarkowana	
Oleje i smary	dobra	
Właściwości fizyczne		
Gęstość	1,25	g/cm ³
Odporność na promieniowanie UV	dobra	
Właściwości mechaniczne		
Wytrzymałość na rozciąganie	40	MPa
Moduł sprężystości	3,5	GPa
Wydłużanie przy zerwaniu	10	%
Wytrzymałość na uderzenia (próba udarności według Izoda)	35–60	J/m ²
Właściwości termiczne		
Temperatura topnienia	170–180	°C
Temperatura zeszklenia	0–5	°C
Właściwości elektryczne		
Opór elektryczny (właściwy)	10 ¹⁶	Ohm/cm
Stała dielektryczna	3,0	MHz

Na podstawie Vroman i wsp. [39].

być nawet 20 000 w pojedynczym łańcuchu PHB. Mimo tak dużej złożoności, cząsteczka PHB charakteryzuje się regularną i uporządkowaną strukturą. Łańcuchy polimeru przyjmują formę helisy, a dołączone do niego grupy boczne są skierowane od środka spirali. Ułożenie niemal wszystkich grup bocznych w jednym kierunku sprawia, że PHB jest zaliczany do polimerów izotaktycznych. Struktura polimeru sprzyja ściśnieniu upakowaniu łańcuchów, a tym samym tworzeniu kryształów. Krystaliczna postać polimeru rzutuje na jego właściwości mechaniczne, takie jak sztywność i kruchość. Ponadto poli-3-hydroksymaślan jest związkami optycznie czynnym, jednak centrum chiralności każdego powtarzalnego monomeru występuje w R konfiguracji absolutnej [2, 30].

Właściwości fizyczno-chemiczne

Większość odpadów pochodzących z gospodarstw domowych stanowią zużyte opakowania z tworzyw sztucznych, które codziennie trafiają na wysypiska, powiększając tym samym zalegające sterty odpadów. Równocześnie zatruwają powietrze, wodę i glebę podczas ich spalania lub długotrwałego rozkładu w środowisku [28].

Biopolimery nie przysparzają takich problemów. Przewaga polimerów biodegradowalnych nad polimerami syntetycznymi wynika z ich niewielkiej trwałości w środowisku oraz nieszkodliwych produktów powstających podczas rozkładu. Ma to kluczowe znaczenie

wobec narastających trudności związanych gospodarką odpadami. Polimery biodegradowalne takie jak PHB są coraz częściej brane pod uwagę, jako materiał do produkcji opakowań nowej generacji. Jednak aby biopolimery mogły z powodzeniem konkurować z konwencjonalnymi tworzywami powinny cechować się szeregiem określonych właściwości fizyczno-chemicznych. Wymagania stawiane biopolimerom wykorzystywanym w przemyśle wynikają przede wszystkim z oczekiwanych właściwości wyrobu oraz stosowanych technologii produkcji. Poli-3-hydroksymaślan (PHB) odznacza się wieloma cennymi właściwościami, poszukiwanymi przez różnorodne branże przemysłowe i medycynę (Tab. I). Zastosowaniem PHB w medycynie sprzyja dodatkowo jego pełna biokompatybilność i nietoksyczność [26, 39].

Główną właściwością poli-3-hydroksymaślanu, wyróżniającą go z szeregu biodegradowalnych polimerów jest jego nierozpuszczalność w wodzie. Większość dostępnych obecnie biodegradowalnych polimerów ulega rozpuszczeniu i degradacji pod wpływem wody (np. polikaprolakton). Wysoka odporność PHB na degradację hydrolityczną znacznie rozszerza możliwości zastosowania tego biopolimeru. Dodatkowo PHB jest dość odporny na promieniowanie nadfioletowe. Nie reaguje również z substancjami olejowymi. Dzięki tym właściwościom z powodzeniem można użyć poli-3-hydroksymaślan jako materiał opakowaniowy wielu organicznych oraz nieorganicznych cieczy [28, 39].

Poli-3-hydroksymaślan odznacza się krótkim czasem biodegradacji. Pod względem właściwości fizycznych PHB przypomina polipropylen, wobec tego może z powodzeniem pełnić rolę substytutu tego konwencjonalnego polimeru. Jednak PHB tonie w wodzie, podczas gdy polipropylen unosi się na jej powierzchni. Różnica ta pozwala na beztlenowy rozkład PHB w osadach aktywnych mikrobiologicznie. Poli-3-hydroksymaślan jest wysoce termoplastyczny, jednocześnie jego temperatura topnienia mieści się w zakresie od 170 do 180°C (jest zatem stosunkowo wysoka), a temperatura zeszklenia (T_g) w przedziale od 0 do 5°C. Gdy PHB osiąga temperaturę nieco wyższą niż temperatura topnienia rozpoczyna się jego termiczna degradacja, a w 200°C degradacja jest już wyraźnie widoczna. Struktura PHB odznacza się wysoką krystalicznością sięgającą 50–70%, stanowi doskonałą barierę przepuszczalności gazów. Polimer cechuje się wysoką wytrzymałością na rozzerwanie wynoszącą 40 MPa, która wynika ze współczynnika sprężystości sięgającego 3 GPa. Wysoka wartość oporu właściwego wynosząca 10^{16} Ohm/cm sprawia, że PHB jest dobrym izolatorem energii elektrycznej [39].

Polimer, oprócz wielu bezsprzecznych zalet, posiada również pewne mankamenty, które ograniczają możliwości zastosowania biopolimeru lub stają się wyzwaniem dla przemysłowców. PHB jest wrażliwy na działanie kwasów i zasad (zwłaszcza tych stężonych) oraz rozpuszcza się w chloroformie i pozostałych węglowodorach chlorowanych. Wadą tego biopolimeru jest również duża kruchość na poziomie 3–5%, szczególnie uciążliwa podczas rozciągania polimeru [5, 39].

W celu poprawy właściwości tego biopolimeru podjęto próby wprowadzania domieszek innych polimerów do PHB. W toku doświadczeń powstał poli-3-hydroksymaślan-ko-3-hydroksywalerianian (PHBV, poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), w którym do cząsteczek poli-3-hydroksymaślanu wprowadzono monomery hydroksywalerianianu. Uzyskany PHBV odznacza się znacznie mniejszą kruchością i większą plastycznością w porównaniu z PHB, tym samym jest częściej wykorzystywany w przemyśle niż PHB. Jednak trzeba pamiętać, że do produkcji PHVB niezbędny jest PHB, ponieważ jest głównym składnikiem poli-3-hydroksymaślan-ko-3-hydroksywalerianianu. Warto zaznaczyć, że PHVB podobnie jak PHB ulega rozkładowi w warunkach tlenowych do ditlenku węgla i wody będąc tym samym w pełni biodegradowalnym polimerem [12, 14].

5. Zastosowanie poli-3-hydroksymaślanu

Biopolimery tej grupy znane są już od lat 80. XX wieku, kiedy to koncern Zeneca Bio Products pochodzący z Wielkiej Brytanii rozpowszechnił pierwsze wyroby z PHVB wytwarzane na skalę przemysłową.

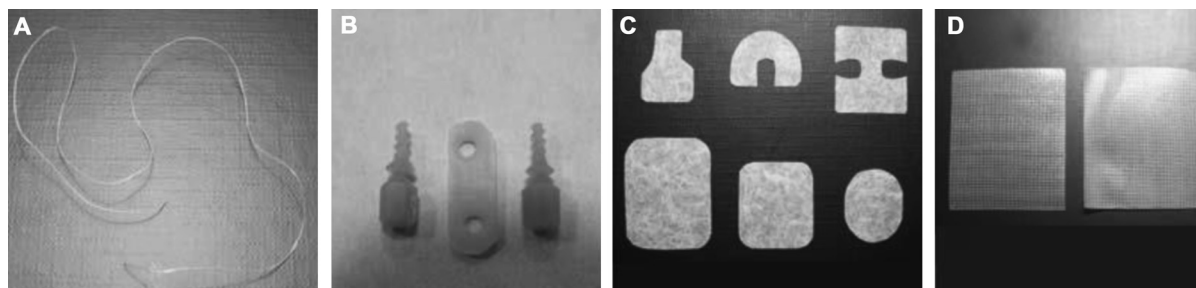
PHVB przyjęło nazwę handlową *Biopol*. Warto wspomnieć, że PHB można pozyskiwać nie tylko jako produkt metabolizmu bakterii czy drogą syntezy chemicznej. Prowadzone są obecnie badania mające na celu uzyskanie PHB ze specjalnie wyselekcjonowanych szczepów drożdży lub genetycznie zmodyfikowanych pod tym kątem roślin [3, 28, 39].

Główną barierą ograniczającą powszechne zastosowanie biopolimerów w przemyśle są wysokie koszty związane z optymalizacją produkcji. Jednak bezdyskusyjne korzyści w środowisku wynikające z właściwości biodegradowalnych polimerów sprawiły, że kopolimery PHB znalazły wiele zastosowań jako materiał opakowaniowy [9, 10].

Kopolimery PHB były używane do produkcji butelek, pojemników na żywność i jednorazowych naczyń (takich jak kubki na wodę), gdyż zarówno PHB jak i PHVB nie rozpuszczają się w wodzie. PHVB znalazł zastosowanie również w produkcji przyborów toaletowych takich jak szczoteczki do zębów, maszynki do golenia czy patyczki higieniczne. Zastosowanie kopolimerów PHB jako opakowań kosmetyków i szamponów do włosów przyczyniło się do znacznego spopularyzowania biopolimerów w przemyśle i handlu [10].

Kopolimery PHB są w pełni biokompatybilne, a produkty ich rozkładu są nietoksyczne dla ludzi i zwierząt. Z tego powodu PHB znajduje zastosowanie również w medycynie, stomatologii i farmacji, a akcesoria medyczne wykonane z kopolimerów PHB już dawno wyszły poza sferę medycyny doświadczalnej. Biopolimerowe nici chirurgiczne, wkrety, śruby, szpilki, płytki stabilizujące kości itp. implanty stosowane podczas operacji mają tę przewagę nad metalowymi elementami, że ulegają samoczynnej degradacji w ciele pacjenta, nie narażając go tym samym na ponowny zabieg usunięcia metalowych implantów. Oprócz tego biopolimery są lżejsze i tańsze od metalowych zamienników, co przekłada się na pooperacyjny komfort pacjenta oraz koszty samej operacji. Oprócz wyrobów w postaci stałej stosuje się również żele zawierające PHB, które po zaschnięciu z powodzeniem zastępują bandaże i opatrunki. Takie „biopolimerowe opatrunki” można stosować zarówno na stłuczenia jak i otwarte rany. Dodatkowo można wprowadzać do nich domieszki leków przeciwzapalnych, przeciwbólowych czy antybiotyków, które są uwalniane do opatrzonego miejsca wraz z biodegradacją polimeru, a tym samym wspomagają leczenie urazów i gojenie się ran [4, 14] (Ryc. 3.).

Żele z PHB to nie jedyne nośniki leków jakie są obecnie rozpatrywane. Współczesny przemysł farmaceutyczny wiele uwagi poświęca obecnie tzw. Systemowi Podawania Leków (DDS, Drug Delivery System). Jest to system kontrolowanego dozowania leków, którego celem jest precyzyjne dawkowanie substancji czynnych, uzyskanie jak największej skuteczności medykamentów



Ryc. 3. Akcesoria medyczne wykonane z kopolimerów PHB. Objaśnienie przedstawionych elementów: wchłanialne nici chirurgiczne (A), śruby i płytki stabilizujące kości (B), membrany stosowane w stomatologii (C), siatki opatrunkowe bez domieszek – po lewej i nasączone lekami – po prawej (D). Na podstawie Bonartsev i wsp. [4].

i niwelowanie efektów ubocznych. Zastosowanie biokompatybilnych polimerów jako nośników leków w postaci m.in. nanorurek, zyskujących obecnie coraz większą popularność niesie za sobą nowe możliwości kontrolowanej dystrybucji leków, którego dozowanie zachodziłoby stopniowo wraz z biodegradacją PHB. Systemy DDS z poli-3-hydroksymaślanem jako nośnikiem leków można stosować zarówno na zewnątrz jak i wewnątrz organizmu pacjenta [8, 14, 19].

Degradacja PHB wewnątrz organizmu zachodzi w wyniku hydrolizy prowadzonej przez właściwe enzymy – niespecyficzne esterazy, które rozkładają wiązania estrowe powodując tym samym powstawanie kwasów i alkoholi podlegających dalszemu utlenianiu [4].

6. Biodegradacja poli-3-hydroksymaślanu w środowisku

Mikroorganizmy zdolne do syntetyzowania poli-3-hydroksymaślanu dysponują enzymami, umożliwiającymi jego biodegradację. Enzymy degradujące PHB występują także u grzybów należących do rodzajów: *Penicillium* i *Aspergillus*. Biodegradacja PHB polega na systematycznej depolimeryzacji kwasu poli-3-hydroksymaślanowego, prowadzonej przez specyficzne enzymy tzw. depolimerazy PHB i esterazy, które przecinają wiązania pomiędzy kolejnymi monomerami terminalnymi w kierunku od końca do początku łańcucha polimeru. Depolimeraza PHB występuje w postaci dwóch izoenzymów, z których jeden prowadzi depolimeryzację na końcach łańcucha PHB, a drugi katalizuje reakcję wewnątrz łańcucha polimeru. Oba izoenzymy funkcjonują w komórce jednocześnie, wzajemnie się uzupełniając w dynamicznym prowadzeniu depolimeryzacji [18, 36].

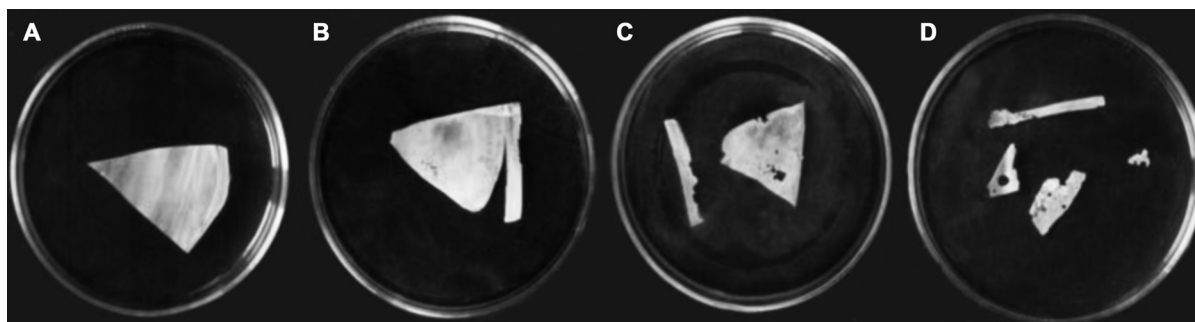
W wyniku działania specyficznych enzymów łańcuch polimeru jest stopniowo skracany, tracąc przy tym uprzednie właściwości fizyczno-chemiczne i mechaniczne. Dzieje się tak dlatego, że właściwości polimeru są ściśle związane ze strukturą i masą cząsteczkową PHB. Pierwszymi makroskopowymi objawami degradacji kwasu poli-3-hydroksymaślanowego są: zwiększona kruchość i łamliwość, a także obniżona sprężystość

i rozciągliwość. Depolimeryzacja PHB prowadzi do ubytków w jego strukturze. Z biegiem czasu porowatość materiału wzrasta do tego stopnia, że jest dostrzegalna gołym okiem [18].

Degradacja polimeru zachodzi zarówno w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Jest prowadzona przez bakterie bytujące w glebie, wodzie lub osadach ściekowych. Stopniowej fragmentacji poli-3-hydroksymaślanu towarzyszy proces utleniania monomerów, który w ostateczności prowadzi do całkowitego rozkładu PHB na ditlenek węgla (lub metan w procesach beztlenowych), wodę i pozostałą biomasę [20].

Polimer tonie w wodzie, dzięki temu może być degradowany przez mikroorganizmy zasiedlające osady ściekowe. Badania oparte na inkubacjach glebowych dowiodły jednak, że anaerobowy rozkład PHB przebiega mniej efektywnie, niż degradacja polimeru w warunkach tlenowych. W tym samym doświadczeniu wykazano również, że zawartość azotu w środowisku glebowym ma znaczący wpływ na przebieg rozkładu PHB. Efektywność degradacji polimeru zależy także od wielu innych czynników, takich jak: temperatura, wilgotność, pH środowiska, poziom aktywności mikroorganizmów w środowisku, czy dostępność substancji odżywczych. Po dwumiesięcznym bytowaniu folii z poli-3-hydroksymaślanu w zawieszynie glebowej, najintensywniejszy rozkład polimeru odnotowano w warunkach tlenowych, przy jednoczesnej obecności azotanów, podczas gdy bez dodatku azotanów degradacja przebiegała znacznie wolniej. Najmniejszym poziomem zdegradowania cechowały się fragmenty folii polimerowej przechowywane w warunkach beztlenowych i bez dodatku azotanów [4, 20, 36] (Ryc. 4).

Na tempo rozkładu polimeru mają wpływ również jego właściwości fizyczno-chemiczne. Kluczową rolę pełni tutaj masa cząsteczkowa polimeru, gdyż im jest ona niższa to degradacja przebiega szybciej. Znaczenie ma również struktura powierzchni polimeru (jego porowatość), temperatura topnienia (im wyższa temperatura topnienia, tym polimer jest trwalszy), jego konfiguracja przestrzenna oraz stopień krystalizacji [4, 20] (Ryc. 5).



Ryc. 4. Fragmenty folii z PHB po dwumiesięcznej inkubacji w zawieszynie glebowej o różnej zawartości azotanów. Objaśnienie przedstawionych elementów: Folia nierozłożona – próba porównawcza (A), folia rozkładana w warunkach beztlenowych bez dodatku azotanów (B), degradacja w warunkach tlenowych bez dodatku azotanów (C), degradacja tlenowa z dodatkiem azotanów (D). Na podstawie Bonartsev i wsp. [4].

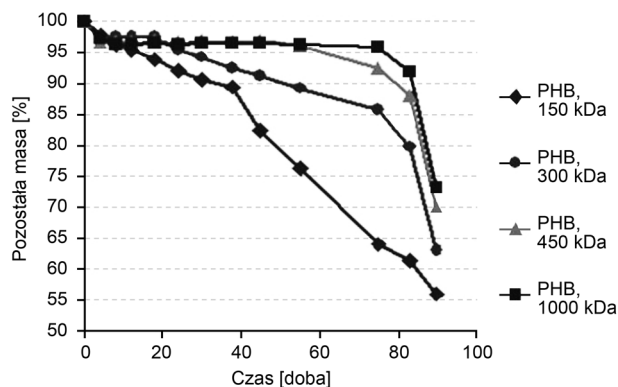
7. Podsumowanie

Poli-3-hydroksymaślan należy do dużej grupy biodegradowalnych polimerów określanych jako poli-hydroksyalkaniany. PHB jest liniowym poliesterem kwasu 3-hydroksymasłowego, akumulowanym przez mikroorganizmy w warunkach stresu fizjologicznego, spowodowanego np. niedoborem pierwiastków biogennych, przy jednoczesnym nadmiarze źródła węgla. Bakterie metanotroficzne należące do typu II wykazują wysoką wydajność w produkcji PHB, stanowiącego materiał zapasowy akumulowany wewnątrz komórek. Użycie metanotrofów do produkcji PHB na szerszą skalę ma realne podstawy i w przyszłości może zostać zrealizowane. Ponadto takie rozwiązanie niesie za sobą dodatkową zaletę, gdyż zakłada wykorzystanie odpadowego metanu jako podstawowego substratu węglowego. Metan powstający np. na składowiskach odpadów podlegałby utylizacji zmniejszając tym samym swój udział w przebiegu efektu cieplarnianego, jednocześnie wykorzystanie odpadowego metanu jako źródła węgla dla metanotrofów obniżyłoby znacznie koszty produkcji PHB. Poli-3-hydroksymaślan wyka-

zuje podobne właściwości fizyczno-chemiczne, jakimi cechują się konwencjonalne polimery. Jednocześnie pozostaje przyjazny środowisku ze względu na szybki przebieg biodegradacji, podczas której powstają nietoksyczne produkty rozpadu. Wobec tego PHB jest ciekawą alternatywą względem polimerów pochodzenia petrochemicznego. PHB znalazł już szereg zastosowań w przemyśle, medycynie i farmacji, a prace nad rozszerzeniem jego aplikacyjności nadal trwają i przynoszą wymierne efekty w postaci kopolimerów takich jak poli-hydroksymaślan-ko-3-hydroksywalearianian (PHBV). Rosnące zainteresowanie tematyką biodegradowalnych polimerów stwarza realne szanse na ograniczenie zużycia kopalin stosowanych w produkcji tworzyw sztucznych oraz na znacznie szybsze, prostsze i tańsze zagospodarowywanie odpadów, których samoistna biodegradacja nie będzie stanowiła ryzyka dla środowiska naturalnego.

Piśmiennictwo

- Anderson A., Dawes E.: Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**, 450–472 (1990)
- Ansari S., Fatma T.: Polyhydroxybutyrate – a biodegradable plastic and its various formulations. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* **3**, 9494–9499 (2014)
- Ansari S., Fatma T.: Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. *PLoS ONE*, **11**, 6 (2016)
- Bonartsev A., Myshkina V., Nikolaeva D., Furina E., Makhina T., Livshits V., Boskhomdzhev A., Ivanov E., Iordanskii A., Bonartseva G.: Biosynthesis, biodegradation, and application of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers – natural polyesters produced by diazotrophic bacteria (w): Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, red. Mendez-Vilas A. tom. 1, Formatex, Badajoz, 2007, s. 295–307
- Braunegg G., Lefebvre G., Genser K.: Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* **65**, 127–161 (1999)
- Bussman I., Pester M., Brune A., Schink B.: Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance). *FEMS Microbiol. Ecol.* **47**, 179–189 (2004)



Ryc. 5. Przebieg degradacji folii z PHB o różnych masach cząsteczkowych: 150, 300, 450, 1000 kDa. Rozkład PHB przebiegał w warunkach *in vivo*, folie przechowywano przez 90 dni zanurzoną w buforze fosforanowym (pH=7,4) w temperaturze 70°C. Na podstawie Bonartsev i wsp. [4].

7. Cantera S., Munóz R., Lebrero R., López J.C., Rodriguez Y., García-Encina P.A.: Technologies for the bioconversion of methane into more valuable products. *Curr. Opin. Biotech.* **50**, 128–135 (2018)
8. Dinjaski N., Prieto M.A.: Smart polyhydroxyalkanoate nano-beads by protein based functionalization. *Nanomedicine*, **11**, 885–899 (2015)
9. Gao X., Chen J.C., Wu Q., Chen G.Q.: Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 768–774 (2011)
10. Gwynne J.: Chemistry in its element – polyhydroxybutyrate. *Chemistry World*, <https://www.chemistryworld.com/podcasts/polyhydroxybutyrate/3005910.article> (12.05.2019)
11. Grage K., Jahns A.C., Parlange N., Palanisamy R., Rasiah I.A., Atwood J.A., Rehm B.H.A.: Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*, **10**, 660–669 (2009)
12. Hankermeyer C., Tjeerdema R.: Polyhydroxybutyrate: plastic made and degraded by microorganisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **159**, 1–24 (1999)
13. Hanson R., Hanson T.: Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**, 439–471 (1996)
14. Jedliński Z., Juzwa M.: Kontrolowane uwalnianie leków: nowa strategia w chemoterapii. *Inżynieria Biomateriałów*, **22**, 12–16 (2002)
15. Jiang H., Chen Y., Jiang P., Zhang C., Smith T., Murrell C., Xinga X.: Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochem. Eng. J.* **49**, 277–288 (2010)
16. Knief C.: Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker. *Front. Microbiol.* **6**, 1346 (2015)
17. Madison L., Huisman G.: Metabolic engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 21–53 (1999)
18. Nowak B., Pająk J., Płociniczak T., Łabużek S.: Enzymy uczestniczące w biodegradacji polimerów. *Biotechnologia*, **80**, 45–52 (2008)
19. Ojeda T.: Polymers and the environment. (w): Polymer Science, red. Yilmaz F. In Tech. Janeza Trdine, 2013, s. 11–40
20. Ojumu T., Yu J., Solomon B.: Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *Afr. J. Biotechnol.* **3**, 18–24 (2004)
21. Pachekoski W., Agnelli J., Belem L.: Thermal, mechanical and morphological properties of poly (Hydroxybutyrate) and polypropylene blends after processing. *Mat. Res.* **12**, 159–164 (2009)
22. Pfeiffer D., Jendrossek D.: Localization of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granule-associated proteins during PHB granule formation and identification of two new phasins, PhaP6 and PhaP7, in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Bacteriol.* **194**, 5909–5921 (2012)
23. Pieja A., Rostkowski K., Criddle C.: Distribution and selection of poly-3-hydroxybutyrate production capacity in methanotrophic proteobacteria. *Microb. Ecol.* **62**, 564–573 (2011)
24. Pieja A., Sundstrom E., Criddle C.: Poly-3-Hydroxybutyrate metabolism in the type II methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6012–6019 (2011)
25. Pötter M., Steinbüchel A.: Biogenesis and structure of polyhydroxyalkanoate granules. *Microbiol. Monogr.* **1**, 110–136 (2006)
26. Rehm B.H.A.: Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 578–592 (2010)
27. Rożej A., Stępniewski W., Małek W.: Bakterie metanotroficzne w ekosystemach. *Post. Mikrobiol.* **38**, 295–313 (1999)
28. Sabbir A., Tasneem F.: Polyhydroxybutyrate – a biodegradable plastic and its various formulations. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng.* **3**, 9494–9497 (2007)
29. Shah N., Hanna M., Jackson K., Taylor R.: Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3B: IV production of hydrogen-driven soluble or particulate methane monooxygenase activity. *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 229–238 (1996)
30. Sita L., Hema T., Divya T., Starin T.: Production and optimization of Polyhydroxybutyrate from *Rhizobium sp.* present in root nodules. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* **3**, 21–25 (2012)
31. Stępniewska Z., Szafranek-Nakonieczna A., Wołoszyn A., Ciepelski J.: Methanotrophs responsible for methane oxidation in natural peats from Polesie Lubelskie Region. *Acta Agroph.* **19**, 181–193 (2012)
32. Stępniewska Z., Pytlak A., Kuźniar A.: PmoA based detection of methanotrophic bacteria in coal-bed rocks of the Lublin coal basin. *Acta Agroph.* **19**, 403–413 (2012)
33. Stępniewska Z., Pytlak A., Kuźniar A.: Methanotrophic activity in Carboniferous coalbed rocks. *Int. J. Coal Geol.* **106**, 1–10 (2013)
34. Sundstrom E., Criddle C.: Optimization of Methanotrophic growth and production of Poly(3-Hydroxybutyrate) in a high-throughput microbioreactor system. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 4767–4773 (2015)
35. Szafranek-Nakonieczna A., Stępniewska Z.: Metanogeny – charakterystyka, funkcje i wymagania środowiskowe (w) Na pograniczu chemii i biologii red. Koroniak H., Barciszewski J., tom 26. Wydawnictwo Naukowe UAM. Poznań, 2011, s. 317–357
36. Tokiwa Y., Calabia B.: Degradation of microbial polyesters. *Biotechnol. Lett.* **26**, 1181–1189 (2004)
37. Trotsenko Y., Belova L.: Biosynthesis of poly(3-Hydroxybutyrate) and poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) and its regulation in bacteria. *Microbiology*, **69**, 635–645 (2000)
38. Verlinden R., Hill D., Kenward M., Williams C., Radecka I.: Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 437–441 (2007)
39. Vroman I., Tighzert L.: Biodegradable Polymers. *Materials*, **2**, 321–328 (2009)
40. Wahl A., Schuth N., Pfeiffer D., Nussberger S., Jendrossek D.: PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiol.* **12**, 262 (2012)
41. Wendlandt K., Jechorek M., Helm J., Stottmeister U.: Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *J. Biotechnol.* **86**, 127–133 (2001)
42. Zhang T., Wang X., Zhou J., Zhang Y.: Enrichments of methanotrophic-heterotrophic 562 cultures with high poly-β-hydroxybutyrate (PHB) accumulation capacities. *J. Environ. Sci.* **65**, 133–143 (2018)
43. Zhang Y., Xin J., Chen L., Song H., Xia C.: Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol. *J. Nat. Gas Chem.* **17**, 103–109 (2008)
44. Zhang Y., Xin J., Chen L., Wang Y.: The methane monooxygenase intrinsic activity of kinds of methanotrophs. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **157**, 431–441 (2009)
45. Zhang Y., Xin J., Chen L., Wang Y.: Biosynthesis of poly-β-Hydroxybutyrate as new material of food packing by various strains of methanotrophs from methane. *Adv. Mat. Res.* **183**, 924–928 (2011)
46. Zhang Y., Xin J., Dong J., Song H., Xia C.: An experimental study on molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) accumulated in *Methylosinus trichosporium* IMV 3011. *Afr. J. Biotechnol.* **36**, 7078–7087 (2011)