

Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) P3HB as a biotechnological solution for the chemical and pharmaceutical industry

Biosynteza poli(3-hydroksymaślanu) P3HB jako rozwiązanie biotechnologiczne dla przemysłu chemicznego i farmaceutycznego



DOI: 10.15199/62.2026.5.8

A biotechnology-based production technol. for poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) was developed to address the issues of brittleness and the narrow processing window by obtaining a low-molecular-weight form (l-P3HB) capable of acting as an internal rheology modifier for the high-molecular-weight polymer (h-P3HB). The biosynthesis aimed at producing P3HB was carried out in bioreactors with a working volume of 5–10 L at 37°C, using glucose or molasses as the carbon source. The process employed a genetically modified strain of *Escherichia coli* capable of biopolymer prodn. due to the introduction of a plasmid contg. the *phaCAB* operon from *Cupriavidus necator* via electroporation. P3HB was extracted using Me_2CO and CHCl_3 , yielding material with a weight-average molecular weight (Mw) of 519–641 g/mol and a polydispersity index (PDI) of 2.0–2.6 for cultures utilising glucose as the carbon source. The biopolymer obtained from cultures grown in the presence of molasses exhibited higher heterogeneity, with Mw = 1385–1633 g/mol and PDI = 5.4–6.0. The l-P3HB fraction, generated by reducing the molecular weight from values above 200 kDa to below 10 kDa, was used as a plasticiser for h-P3HB, improving the elasticity and processing properties of the resulting material. Finally, the suitability of P3HB as a carrier for active substances in controlled-release systems employing poly(vinyl alcohol) (PVA) as an emulsifier was confirmed through the fabrication of microspheres via emulsion techniques.

Keywords: P3HB, biopolymer, biosynthesis, *Escherichia coli*, encapsulation

Opracowano technologię wytwarzania poli(3-hydroksymaślanu) (P3HB) na ścieżce biotechnologicznej, umożliwiającą rozwiązanie problemu jego kruchości oraz wąskiego „okna przetwórczego” poprzez uzyskanie formy małowcząsteczkowej (l-P3HB) mogącej pełnić funkcję wewnętrznego modyfikatora reologii polimeru wysokocząsteczkowego (h-P3HB). Biosyntezę mającą na celu wytworzenie P3HB prowadzono w bioreaktorach o pojemności roboczej 5–10 L, w temp. 37°C, w obecności glukozy albo melasy jako źródła węgla. W procesie wykorzystano genetycznie modyfikowany szczep *Escherichia coli* – zdolny do produkcji biopolimeru, dzięki wprowadzeniu poprzez elektrotransformację do komórek tej bakterii plazmidu zawierającego operon *phaCAB* z *Cupriavidus necator*. P3HB ekstrahowano za pomocą Me_2CO i CHCl_3 , uzyskując materiał o średniej masie cząsteczkowej (Mw) 519–641 g/mol oraz polidispersyjności (PDI) 2,0–2,6 dla hodowli wykorzystujących glukozę jako źródło węgla. Biopolimer otrzymany w procesie prowadzonym w obecności melasy wykazał wyższą heterogeniczność: Mw = 1385–1633 g/mol, PDI = 5,4–6,0. Uzyskany w wyniku redukcji masy cząsteczkowej z wartości powyżej 200 kDa do mniej niż 10 kDa l-P3HB wykorzystano jako plastyfiktor h-P3HB, co poprawiło elastyczność i właściwości przetwórcze wytworzonego materiału. Na koniec potwierdzono przydatność P3HB jako nośnika substancji czynnych w systemach kontrolowanego uwalniania wykorzystujących alkohol poliwinylowy (PVA) jako emulgator poprzez wytworzenie mikrosfer technikami emulsyjnymi.

Słowa kluczowe: P3HB, biopolimer, biosynteza, *Escherichia coli*, enkapsulacja



Dr inż. Katarzyna KOZAK (ORCID: 0000-0003-0706-3568) ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Stopień doktora nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne uzyskała na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego (Zakład Molekularnych Podstaw Homeostazy Metali u Roślin). Obecnie jest głównym specjalistą w Sekcji Inżynierii Genetycznej i Biosyntezy w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – biotechnologia, fizjologia roślin.



Mgr Joanna CHOJNIAK-GRONEK (ORCID: 0000-0002-9288-8953) w roku 2013 ukończyła studia na kierunku biotechnologia środowiskowa w Katedrze Biochemii na Uniwersytecie Śląskim. Obecnie pracuje w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie, gdzie zajmuje się wykorzystaniem mikroorganizmów w biosyntezie, inżynierii genetycznej oraz opracowywaniu rozwiązań dla przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego i biotechnologicznego. Specjalność – biotechnologia środowiskowa, mikrobiologia oraz ekotoksykologia.

*** Adres do korespondencji:**

Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Chemii Przemysłowej imienia Profesora Ignacego Mościckiego, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa, tel.: +48 507-332-748, e-mail: katarzyna.kozak@ichp.lukasiewicz.gov.pl

Obserwowany rozwój nauk przyrodniczych i technicznych sprzyja tworzeniu innowacyjnych rozwiązań znajdujących zastosowanie w wielu sektorach przemysłu. W ostatnich latach ma miejsce intensyfikacja badań w zakresie wytwarzania tworzyw biodegradowalnych, modyfikacji ich właściwości, a także projektowania nowych „szytych na miarę” materiałów polimerowych, która przyczyniła się do znaczącego wzrostu zainteresowania poliestrami z grupy poli(hydroksyalkanianów) (PHA). Jednym z nich jest poli(3-hydroksymaślan) (P3HB), który z uwagi na swoje cechy, takie jak biokompatybilność i biodegradowalność, stanowi doskonałą alternatywę dla konwencjonalnych polimerów^{1,2)}. P3HB pozyskiwany w procesach biotechnologicznych charakteryzuje się wysoką czystością, co ułatwia jego dalsze przetwarzanie i ogranicza konieczność stosowania wieloetapowego oczyszczania^{3,4)}. Co więcej, odpowiednie modyfikacje chemiczne i fizyczne, tworzenie kompozytów i/lub blend, a także wykorzystanie kopolimeryzacji na etapie biosyntezy pozwalają dostosować właściwości P3HB do konkretnych wymagań aplikacyjnych⁵⁻⁷⁾. Warto podkreślić, że substratami do syntezy P3HB na ścieżce biotechnologicznej mogą być nie tylko modelowe źródła węgla, ale również surowce odpadowe, co czyni jego produkcję szczególnie atrakcyjną pod względem ekonomicznym i środowiskowym⁸⁻¹¹⁾. Obecnie P3HB zaliczany

jest do grona najbardziej perspektywicznych polimerów biodegradowalnych, zarówno dzięki korzystnym właściwościom fizykochemicznym i biologicznym, jak i ze względu na potencjał aplikacyjny w szerokim spektrum sektorów o wysokich wymaganiach funkcjonalnych, takich jak branża opakowaniowa, rolnictwo czy biomedycyna, gdzie poszukuje się materiałów o ściśle określonej charakterystyce^{1, 12-14)}.

W Łukasiewiczu – Instytucie Chemii Przemysłowej (Łukasiewicz-IChP) prowadzono interdyscyplinarne prace mające na celu rozwiązanie problemu właściwości fizykochemicznych oraz wąskiego „okna przetwórczego” P3HB. Badania obejmowały m.in. przygotowanie szczepu produkcyjnego, optymalizację procesu biosyntezy, a także udoskonalenie metod wydzielenia biopolimeru z hodowli oraz wstępnego oczyszczania i krystalizacji uzyskanego produktu (rys. 1). W efekcie opracowano technologię wytwarzania P3HB, która osiągnęła 4. poziom gotowości technologicznej (TRL4), a kontrolowany sposób pozyskiwania kluczowego składnika, modyfikatora reologii biopolimeru P3HB, wskazano jako innowacyjny aspekt proponowanego rozwiązania¹⁵⁻¹⁷⁾.

W pracy przedstawiono wybrane wyniki badań prowadzonych w Łukasiewiczu-IChP, obejmujące najważniejsze etapy procesu wytwarzania P3HB. Ich celem było wska-

zanie i scharakteryzowanie kluczowych etapów biosyntezy P3HB oraz rozwiązanie problemu jego właściwości fizykochemicznych, ograniczających zastosowanie, oraz wąskiego „okna przetwórczego”, a także wskazanie kierunków dalszych badań nad wykorzystaniem tego biopolimeru jako innowacyjnego materiału m.in. w przemyśle chemicznym i biomedycynie.

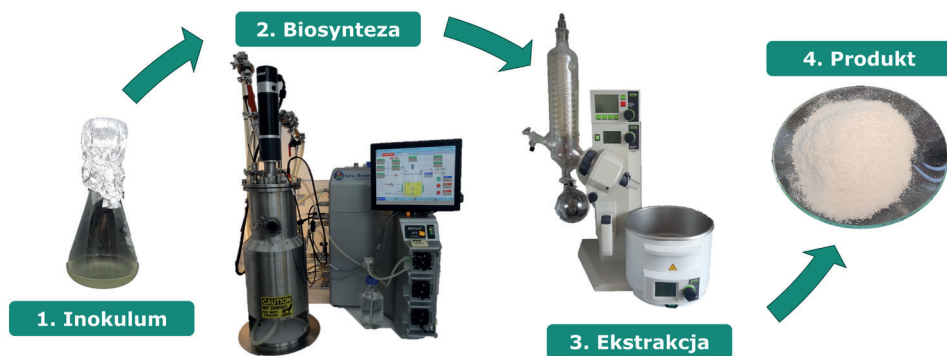


Fig. 1. Stages of P3HB production in a biotechnological process; the production of P3HB in a biotechnological process consists of 4 key stages: 1. preparation of the production strain, which cultures are an inoculum for the process; 2. biosynthesis carried out in bioreactors, aimed at producing P3HB by the host cells; 3. extraction enabling the isolation of the biopolymer from the bacterial biomass; 4. recovery of purified P3HB and manufacturing of the final product

Rys. 1. Etapy wytwarzania P3HB w procesie biotechnologicznym; proces wytwarzania P3HB w procesie biotechnologicznym obejmuje 4 kluczowe etapy: 1. przygotowanie szczepu produkcyjnego, którego hodowle stanowią inokulum w procesie biosyntezy; 2. biosyntezę prowadzoną w bioreaktorach mającą na celu wytworzenie P3HB przez komórki gospodarza; 3. ekstrakcję umożliwiającą wydzielenie biopolimeru z biomasy bakteryjnej; 4. pozyskanie czystego P3HB i wytworzenie docelowego produktu

Część doświadczalna

Materiały

W badaniach wykorzystano szczep *Escherichia coli* IChP-112 z plazmidem *pIBA-phaCAB* opracowany w Łukasiewiczu-IChP¹⁶⁾. Hodowle prowadzono na pożywce



Dr inż. Katarzyna KURZEPA (ORCID: 0000-0001-9822-0922) ukończyła studia z zakresu technologii chemicznej organicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Stopień doktora w dyscyplinie technologia chemiczna uzyskała na tym samym wydziale. Posiada certyfikat audytora wewnętrznego dobrych praktyk produkcyjnych w branży kosmetycznej oraz ukończyła studia podyplomowe z zakresu jakości i bezpieczeństwa produktów kosmetycznych na Uniwersytecie Łódzkim. Obecnie jest głównym specjalistą w Sekcji Materiałów Bioaktywnych i Kosmetyków w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – chemia peptydów, fitochemia, chemia kosmetyczna.



Mgr inż. Renata KUREK (ORCID: 0000-0002-0701-8102) w roku 2010 ukończyła studia inżynierskie na Międzywydziałowym Studium Biotechnologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. W 2022 r. uzyskała stopień magistra nauk biologicznych na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Jest starszym specjalistą Pionu Badawczego w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – biologia komórek eukariotycznych, biosynteza.

minimalnej GMS^{15, 16}), a jako jedyne źródło węgla stosowano glukozę albo melasę. Każdorazowo przed rozpoczęciem hodowli wszelkie podłoża i roztwory pomocnicze sterylizowano termicznie lub poprzez filtrację.

Aparatura

Proces biosyntezy prowadzono w bioreaktorach serii BioFlow (New Brunswick) o pojemności roboczej 5 albo 10 L (odpowiednio modele 310 albo 415) (rys. 2). Urządzenia były wyposażone w dwupoziomowe mieszadło typu Rushtona, zintegrowany układ napowietrzania oraz elektrody do monitorowania pH i rozpuszczonego tlenu DO (*dissolved oxygen*).

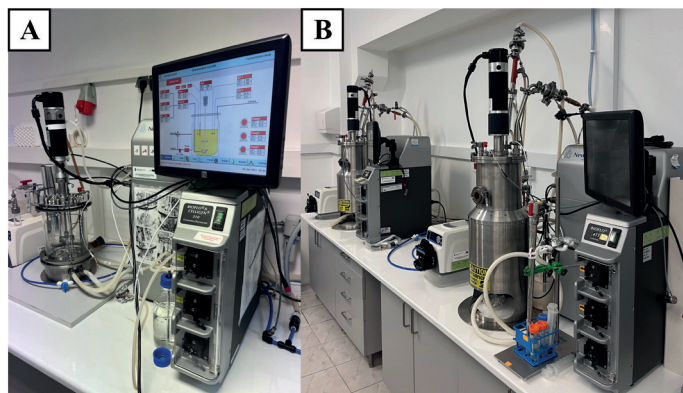


Fig. 2. Bioreactors BioFlow 310 (A) i BioFlow 415 (B) with their control units

Rys. 2. Aparatura procesowa: bioreaktory BioFlow 310 (A) i BioFlow 415 (B) wraz z jednostkami sterującymi

Metodyka badań

Szczep produkcyjny. Szczegółowy opis konstrukcji wektora *pIBA-phaCAB* przedstawiono w zgłoszeniu patentowym¹⁶. W skrócie, plazmid *pIBA-phaCAB* przygotowano poprzez insercję natywnej sekwencji nukleotydowej operonu *phaCAB* z *Cupriavidus necator* do wektora *pIBA* za pomocą klonowania restrykcyjnego. Następnie konstrukt *pIBA-phaCAB* wprowadzono do komórek *E. coli* IChP-112 poprzez elektrotransformację (Gene Pulser Xcell Electroporation System, Bio-Rad). Poprawność wstawki oraz transformacji zweryfikowano za pomocą sekwencjonowania (3130 Genetic Analyzer, Hitachi Applied Biosystems).

Biosynteza. Na początku hodowlę nocną szczepu *E. coli* IChP-112 z plazmidem *pIBA-phaCAB* prowadzono w temp. 37°C z wytrząsaniem aż do uzyskania gęstości optycznej 0,7–1,0 j.u. Następnie otrzymaną zawiesinę bakterii wpro-

wadzano sterylnie do bioreaktora zawierającego pożywkę GMS, przy czym inokulum stanowiło maksymalnie 10% początkowej objętości hodowli. Proces prowadzono w sposób okresowy do momentu wykorzystania części wyjściowej puli substratu węglowego (stężenie glukozy w zawiesinie ≤ 200 mg/dL). W dalszym etapie rozpoczęto podawanie roztworu do dokarmiania zawierającego glukozę albo melasę w stężeniu 40%, uzupełnionego niezbędnymi składnikami pomocniczymi. Przepływ regulowano poprzez zmianę nastaw pompy perystaltycznej tak, aby stężenie glukozy w zawiesinie pozostawało na poziomie ok. 200 mg/dL. Proces prowadzono w temp. 37°C, utrzymując pH w przedziale 7,0–7,2. Podczas biosyntezy stosowano kaskadę regulacji ilości rozpuszczonego tlenu w zawiesinie, w której wzrost prędkości mieszania w zakresie 250–980 rpm kompensował spadki DO (wartość zadana: 10 dm³/mL). Wybrane parametry procesu (OD₆₀₀, stężenie glukozy, temperatura, pH, DO, prędkość obrotowa mieszadła, przepływ powietrza) monitorowano minimum raz na godzinę. Biosyntezę uznawano za zakończoną, gdy upływał założony czas trwania hodowli lub gdy uzyskiwano odpowiednią ilość biomasy.

Dezintegracja. Po zakończeniu biosyntezy, całą objętość hodowli wirowano, a otrzymany osad zamrażano w temp. -20°C. Po upływie minimum 24 h rozmrożoną mokrą biomasę zawieszano w wodzie destylowanej (1:1), sterylizowano termicznie (121°C, 20 min) i dezintegrowano ultradźwiękowo (sonikator UP400st z sonotrodą H14, Hielscher Ultrasonics).

Ekstrakcja. P3HB izolowano ze zdezintegrowanej biomasy bateryjnej metodą dwuetapowej ekstrakcji rozpuszczalnikowej z wykorzystaniem acetonu oraz chloroformu.

Enkapsulacja substancji czynnej. Mikrosfery wytwarzano techniką emulsyjną z odparowaniem rozpuszczalnika. Fazę rozproszoną przygotowano poprzez rozpuszczenie substancji czynnej i P3HB w rozpuszczalniku organicznym. Następnie roztwór ten wprowadzano do wodnego roztworu PVA. Układ mieszano przez 10–24 h, a następnie rozpuszczalnik usuwano poprzez kontrolowane odparowanie prowadzące do wytrącenia mikrosfer polimerowych zawierających API. Po zakończeniu procesu mikrosfery oddzielano, oczyszczano i osuszano w kontrolowanych warunkach.

Metody analityczne

Gęstość optyczną hodowli (OD₆₀₀) oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 600 nm z wykorzystaniem



Mgr Piotr KIERYŁ (ORCID: 0000-0003-2905-9586) ukończył studia na Wydziale Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (Zakład Wirusologii). Obecnie jest starszym specjalistą Pionu Wsparcia w Sekcji Inżynierii Genetycznej i Biosyntezy w Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – techniki sekwencjonowania.



Mgr inż. Dorota SZCZĘSNA (ORCID: 0000-0002-8991-4815) ukończyła studia na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej (specjalizacja bioproceny). Obecnie jest głównym specjalistą Pionu Wsparcia w Sekcji Materiałów Bioaktywnych i Kosmetyków w Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – chemia kosmetyczna, technologie formułacyjne, opracowywanie i wdrażanie nowych produktów.

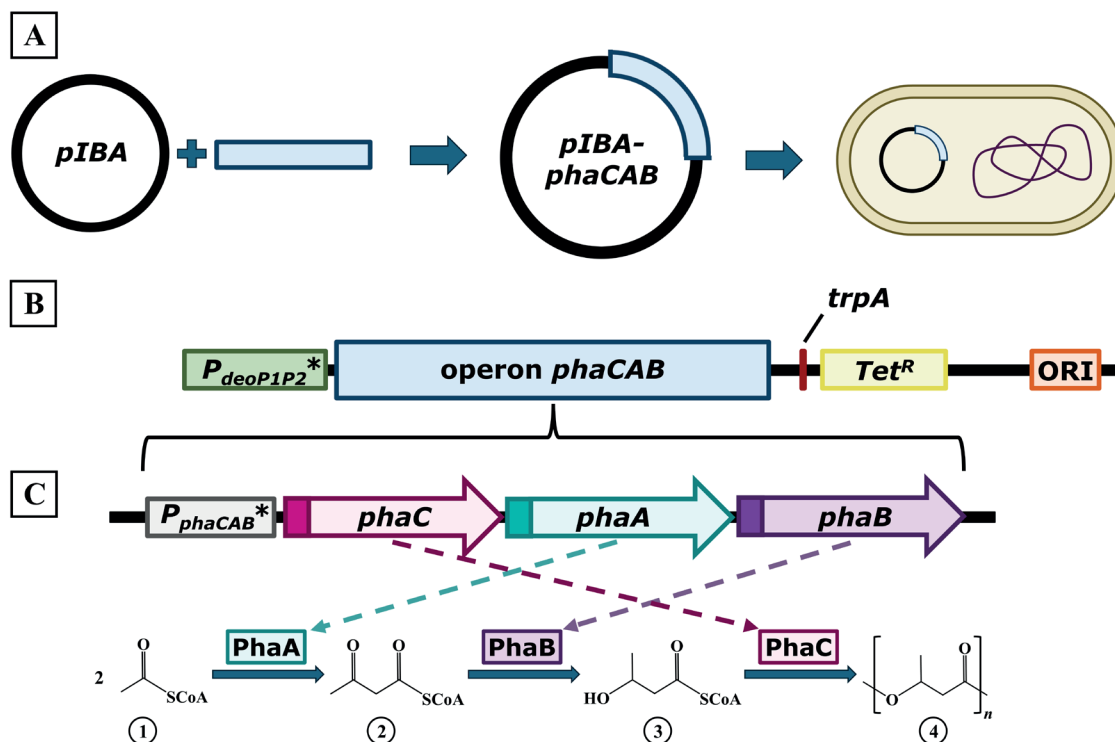


Fig. 3. Workflow illustrating recombinant *pIBA-phaCAB* plasmid assembly, host strain engineering, and the metabolic pathway leading to P3HB synthesis in *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB* cells; panel A: generation of the production strain *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB*; firstly, the *phaCAB* operon was cloned into the *pIBA* vector to obtain the recombinant construct *pIBA-phaCAB*; the plasmid was then introduced into the host cells, resulting in a genetically modified *E. coli* IChP-112 strain capable of synthesising P3HB; panel B: linear map of the *pIBA-phaCAB* plasmid; the *pIBA-phaCAB* plasmid contains the following elements: the *deoP1P2* promoter (green rectangle), the *phaCAB* operon (blue rectangle), the *trpA* transcription terminator (red rectangle), the tetracycline resistance marker *Tet^R* (yellow rectangle), and the origin of replication *ORI* (orange rectangle); panel C: schematic diagram of the *phaCAB* operon; the upper panel shows the sequence of the *phaCAB* operon from *Cupriavidus necator* introduced into the *pIBA* plasmid, which was used to transform the *E. coli* IChP-112 strain, enabling the bacteria to synthesise P3HB; the *phaCAB* operon contains a promoter (shown as a grey rectangle), the *phaC*, *phaA*, and *phaB* genes (shown as arrows, pink, mint green, and purple, respectively), and their promoters (shown as rectangles, pink, mint green, and purple, respectively); the *phaA*, *phaB*, and *phaC* genes encode enzymes – β -ketothiolase (*PhaA*), NADPH-dependent acetyl-CoA reductase (*PhaB*), and PHA synthase (*PhaC*), respectively; 1 – acetyl-coenzyme A; 2 – acetoacetyl-coenzyme A; 3 – (R)-3-hydroxybutyryl-coenzyme A; 4 – poly(3-hydroxybutyrate); *n* – number of mer units; the elements forming the hybrid promoter system are marked with an asterisk

Rys. 3. Konstrukcja plazmidu *pIBA-phaCAB*, otrzymanie szczepu produkcyjnego oraz szlak metaboliczny prowadzący do syntezy P3HB w komórkach *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB*; panel A: uzyskanie szczepu produkcyjnego *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB*; na początku operon *phaCAB* wklonowano do wektora *pIBA*, otrzymując konstrukt *pIBA-phaCAB*; następnie plazmid wprowadzano do komórek gospodarza, uzyskując genetycznie modyfikowany szczep *E. coli* IChP-112 zdolny do syntezy P3HB; panel B: liniowa mapa plazmidu *pIBA-phaCAB*; plazmid *pIBA-phaCAB* zawiera następujące elementy: promotor *deoP1P2* (zielony prostokąt), operon *phaCAB* (niebieski prostokąt), terminator transkrypcji *trpA* (czerwony prostokąt), marker selekcyjny warunkujący oporność na tetracyklinę *Tet^R* (żółty prostokąt) oraz miejsce inicjacji replikacji *ORI* (pomarańczowy prostokąt); panel C: schemat operonu *phaCAB*; górny panel przedstawia sekwencję operonu *phaCAB* pochodzącego z *Cupriavidus necator* wprowadzonego do plazmidu *pIBA*, który następnie wykorzystano do transformacji szczepu *E. coli* IChP-112, dzięki czemu bakterie były zdolne do syntezy P3HB; operon *phaCAB* zawiera promotor (przedstawiony jako szary prostokąt), geny *phaC*, *phaA* i *phaB* (przedstawione jako strzałki, odpowiednio różowa, miętowa i fioletowa) oraz ich promotory (przedstawione jako prostokąty, odpowiednio różowy, miętowy i fioletowy); geny *phaA*, *phaB* i *phaC* kodują enzymy – odpowiednio β -ketotiolazę (*PhaA*), zależną od NADPH reduktazę acetylo-CoA (*PhaB*) oraz syntazę PHA (*PhaC*); 1 – acetylokoenzym A; 2 – acetoacetylokoenzym A; 3 – (R)-3-hydroksybutyrylokoenzym A; 4 – poli(3-hydroksymaślan); *n* – liczba merów; gwiazdką zaznaczono elementy tworzące hybrydowy układ promotorów

spektrofotometru Ultrospec 3100 Pro (Amersham Biosciences). Stężenie glukozy monitorowano za pomocą glukometru Accu-Check Active (Roche) i dedykowanych testów paskowych. Średnie masy cząsteczkowe P3HB (*M_n* i *M_w*) wyznaczano za pomocą chromatografii żelowej GPC (Agilent 1200 + RID, Agilent Technologies).

Wyniki badań i ich omówienie Szczep produkcyjny

Wprowadzenie konstrukt *pIBA-phaCAB* do *E. coli* IChP-112 (rys. 3A) pozwoliło uzyskać szczep produkcyjny zdolny do wytwarzania P3HB, który jest naturalnie syntezowany tylko przez nieliczne bakterie i archeony, m.in. *C. necator*,



Dr inż. Otton ROUBINEK (ORCID: 0000-0002-6492-7118) w 2000 roku ukończył studia na kierunku biotechnologia przemysłowa na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej. W 2006 r. uzyskał stopień doktora z zakresu inżynierii chemicznej na tym samym wydziale. Obecnie jest zatrudniony w Sekcji Inżynierii Genetycznej i Biosyntezy w Grupie Badawczej Farmacji, Chemii Kosmetycznej i Biotechnologii w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie. Specjalność – inżynieria bioprosesowa.



Dr inż. Jolanta JANISZEWSKA (ORCID: 0000-0003-0958-8018) ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej. Stopień doktora nauk technicznych uzyskała w Sieci Badawcza Łukasiewicz – Instytucie Chemii Przemysłowej im. Profesora Ignacego Mościckiego w Warszawie, a następnie odbyła 3-letni staż naukowy w Instytucie Chemii Organicznej PAN. Jest Liderem Grupy Badawczej Farmacji, Chemii Kosmetycznej i Biotechnologii w Łukasiewicz – IChP. Specjalność – synteza związków peptydowych, otrzymywanie substancji biologicznie czynnych z produktów pochodzenia naturalnego, rozwój produktów dla przemysłu kosmetycznego i ochrony zdrowia.

B. megaterium i *Alcaligenes latus*¹⁸). Ich zdolność do wytwarzania tego biopolimeru wynika z posiadania unikalnego metabolizmu determinowanego obecnością 3 kluczowych genów (*phaA*, *phaB* i *phaC*), kodujących odpowiednio β -ketotiolazę (PhaA), zależną od NADPH reduktazę acetylo-CoA (PhaB) oraz syntazę PHA (PhaC), czyli enzymy katalizujące kolejne etapy konwersji acetylo-CoA do poli(3-hydroksymaślanu) (rys. 3C). Cecha ta nie jest powszechna wśród mikroorganizmów, dlatego w przemyśle zwykle wykorzystuje się szczepy modyfikowane genetycznie. Takie podejście pozwala nie tylko skrócić czas prowadzenia procesu i zwiększyć jego wydajność, ale również zagospodarować inne niż modelowe źródła węgla, takie jak np. odpady przemysłu petrochemicznego lub rolnospożywczego^{9, 10, 19, 20}). Jednym z najczęściej wybieranych gospodarzy, stosowanym zarówno w produkcji biopolimerów, jak i innych związków chemicznych, jest Gram-ujemna bakteria *E. coli*^{21–23}). Z uwagi na dobrze poznany metabolizm, łatwość transformacji, a także wysoką szybkość wzrostu w relatywnie niewymagających warunkach, stanowi ona uniwersalny model sprawdzający się zarówno w badaniach laboratoryjnych, jak i w aplikacjach przemysłowych^{24, 25}). Właśnie te cechy okazały się decydujące przy wyborze *E. coli* IChP-112 jako gospodarza w technologii wytwarzania poli(3-hydroksymaślanu) opracowanej w Łukasiewicz-IChP.

Kluczowym etapem pozyskania szczepu produkcyjnego zdolnego do syntezy P3HB było przygotowanie plazmidu *pIBA-phaCAB* (rys. 3B). Konstrukcja ten, oparty na wektorze *pIBA*²⁶), posiadał kasetę ekspresyjną obejmującą promotor konstytutywny *deoPIP2*, operon *phaCAB* oraz terminator transkrypcji *trpA*¹⁶). Jej obecność umożliwiła produkcję P3HB w komórkach *E. coli* IChP-112, bakterii, która naturalnie nie wytwarza tego biopolimeru. Warto zaznaczyć, że plazmid *pIBA-phaCAB* zawierał natywną sekwencję operonu *phaCAB*, pochodzącą z *C. necator*, gatunku modelowego w badaniach nad biosyntezą polihydroksyalkanianów²⁷). Występuje on w tzw. modelu zwartym, co oznacza, że geny w jego obrębie ułożone są sekwencyjnie i kontrolowane przez wspólny promotor *P_{phaCAB}* (rys. 3C). Taka architektura sprzyja efektywnej i stabilnej ekspresji całego szlaku. Dodatkowo zastosowanie układu hybrydowego promotorów obejmującego konstytutywny *P_{deoPIP2}* umieszczony przed natywnym *P_{phaCAB}* (rys. 3B–C) miało na celu zapewnienie wysokiego, stabilnego poziomu transkrypcji w warunkach heterologicznych, niezależnie od mechanizmów regulacyjnych charakterystycznych dla *C. necator*. Warto podkreślić, że oprócz elementów funkcjonalnych ścieżki syntezy P3HB konstrukcja *pIBA-phaCAB* zawierała sekwencje ORI i *Tet^R* (rys. 3B) odpowiedzialne za jego stabilne utrzymanie w komórkach gospodarza. W rezultacie otrzymany plazmid tworzył kompletny układ ekspresyjny niezbędny do uruchomienia u *E. coli* IChP-112 szlaku metabolicznego umożliwiającego wytwarzanie P3HB.

Synteza P3HB na ścieżce biotechnologicznej była oparta na trój etapowej sekwencji reakcji katalizowanych przez

enzymy kodowane w operonie *phaCAB* (rys. 3C). Na początku PhaA przekształcał 2 cząsteczki acetylokoenzymu A do acetoacetylokoenzymu A, tworząc szkielet węglowy dla przyszłego monomeru. Następnie PhaB redukował powstały związek do (R)-3-hydroksymaślanokoenzymu A przy wykorzystaniu NADPH jako donora elektronów. Ostatni kluczowy dla powstawania P3HB etap był katalizowany przez PhaC. To enzym, który rozpoznawał stereospecyficzne monomery o konfiguracji R i łączył je wiązaniami estrowymi, tworząc długołańcuchowy polimer. Syntezowany w ten sposób P3HB stanowił u bakterii materiał zapasowy i z uwagi na hydrofobowy charakter i nierozpuszczalność w wodzie był magazynowany w ciałkach inkluzyjnych²⁸). Warto podkreślić, że w konstrukcji *pIBA-phaCAB* każdy z 3 genów operonu objęty był kontrolą swojego natywnego promotora (rys. 3B), co odzwierciedlało hierarchię transkrypcji obserwowaną w *C. necator* i umożliwiało utrzymanie właściwego stosunku ilościowego enzymów w komórce.

Wytwarzanie P3HB w procesie biosyntezy

Biosyntezę P3HB z wykorzystaniem szczepu *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB* prowadzono w obecności 2 wybranych źródeł węgla: glukozy i melasy (rys. 4, tabela 1). Wydajność procesu była ściśle zależna od stosowanego substratu. Wykorzystanie glukozy (tabela 1, hodowla I) umożliwiło otrzymanie ponad 2-krotnie większej mokrej biomasy (763,46 g) oraz ponad 3-krotnie większej ilości biopolimeru (106,00 g) w porównaniu z hodowlą prowadzoną w obecności melasy. Wydajność procesu biosyntezy P3HB osiągnęła w tym przypadku poziom 60%. Glukoza pełniła w badaniach funkcję substratu referencyjnego, gdyż stanowi ona najlepiej przyswajalne przez *E. coli* źródło węgla, co podczas produkcji P3HB umożliwiło uzyskanie wysokiej wydajności biomasy, a także sprzyjało akumulacji P3HB w komórkach gospodarza²⁹). W przypadku hodowli prowadzonych w obecności melasy wydajność biosyntezy wyniosła 37% (tabela 1, hodowla II), co okazało się wartością o ponad 1/3 mniejszą niż w procesie kontrolnym. Mogło to być wynikiem złożonego składu tego źródła węgla. Melasa to jeden z łatwo dostępnych i tanich surowców odpadowych stanowiących produkt uboczny rafinacji cukru³⁰). Oprócz mieszaniny mono- i disacharydów (glukoza, fruktoza, sacharoza) zawiera także mikroelementy i azot organiczny, które wpływają korzystnie na przyrost biomasy i akumulację biopolimeru. Z drugiej strony, z uwagi na wysoką zmienność składu chemicznego i możliwą obecność inhibitorów, wykorzystanie melasy w procesach wytwarzania P3HB zachodzących z udziałem mikroorganizmów może być ograniczone^{31, 32}). Czynniki te mogą wpływać zarówno na efektywność wykorzystania dostępnych cukrów, jak i na aktywność enzymatyczną szlaku biosyntezy poli(3-hydroksymaślanu), czego konsekwencją jest zazwyczaj mniejsza akumulacja biopolimeru w komórkach gospodarza. Niemniej jednak wydajność

Table 1. Yield of P3HB biosynthesis in fed-batch cultures of *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB* using glucose (I) or molasses (II) as the sole carbon source

Tabela 1. Wydajność biosyntezy P3HB w hodowlach półokresowych z wykorzystaniem szczepu *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB* w obecności glukozy (I) albo melasy (II) jako jedyne źródła węgla*

Hodowla	Mokra biomasa, g	Masa biopolimeru, g	Wydajność, %
I	763,46	106,00	60
II	373,45	32,00	37

* Wydajność obliczono przy założeniu, że sucha masa stanowi 0,23 wartości mokrej biomasy. Założenie oparto na ustaleniach opisanych przez Glazyrina i współpracowników.³³

procesu prowadzonego w obecności melasy na poziomie ok. 40% (tabela 1, hodowla II) stanowiła dobry rezultat. Przedstawione wyniki pokazują, że pozostaje ona obiecującą alternatywą dla konwencjonalnych źródeł węgla nie tylko ze względu na możliwość otrzymania zadowalającej ilości biopolimeru, ale również z uwagi na dużą zawartość związków korzystnie wpływających na proces biosyntezy, niski koszt i powszechną dostępność.

Uzyskane wyniki (tabela 1) znalazły odzwierciedlenie w przebiegach hodowli *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB* w obecności badanych substratów (rys. 4). W obu wariantach procesu wyróżniono 3 typowe dla bakterii fazy wzrostu: fazę adaptacji (FA), fazę eksplotacyjną (FE) oraz fazę stacjonarną (FS). Czas trwania pierwszej z nich był podobny do czasu dla hodowli prowadzonych z wykorzystaniem glukozy oraz melasy i wynosił 5–6 h. Tempo wzrostu bakterii było w tym przypadku umiarkowane, a gęstość optyczna zawiesiny nie przekraczała poziomu 4 j.u., niezależnie od stosowanego źródła węgla. W trwającej 12–14 h FE zaobserwowano dynamiczny przyrost biomasy i wysoką aktywność metaboliczną komórek, co potwierdziło wyraźne zwiększenie wartości OD₆₀₀ do ok. 50

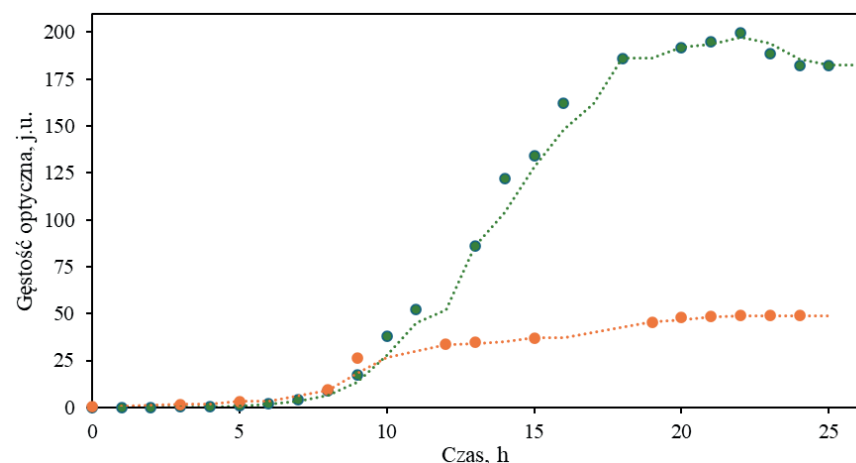


Fig. 4. Growth of *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB* in a fed-batch process in the presence of glucose or molasses as the sole carbon source; the curves illustrate changes in optical density (OD₆₀₀) of the *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB* culture during the fed-batch process, in which glucose (green line) or molasses (orange line) served as the substrate

Rys. 4. Wzrost *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB* w procesie półokresowym w obecności glukozy albo melasy jako jedyne źródła węgla; krzywe przedstawiają zmiany gęstości optycznej (OD₆₀₀) zawiesiny bakterii *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB* w czasie trwania procesu półokresowego, w którym substratem była glukoza (kolor zielony) albo melasa (kolor pomarańczowy)

albo niemal 200 j.u. w przypadku hodowli prowadzonych w obecności odpowiednio melasy i glukozy. Warto zaznaczyć, że łagodniejszy przebieg krzywej zarejestrowanej dla procesu przebiegającego z wykorzystaniem badanego surowca odpadowego wskazywał na wolniejszy metabolizm szczepu *E. coli* IChP-112 *pIBA-phaCAB* w obecności tego substratu. Hodowle osiągnęły FS po 18 i 20 h, odpowiednio dla glukozy i melasy. Na tym etapie gęstość optyczna zawiesiny nie zmieniała się znacząco, co świadczyło o ustabilizowaniu liczebności komórek wynikającym z równowagi między tempem podziałów a obumieraniem oraz ograniczeniem dostępności składników odżywczych niezbędnych do dalszego wzrostu, pomimo dokarmiania. Wartości OD₆₀₀ odnotowane w FE i FS dla hodowli prowadzonych w obecności melasy były ok. 4-krotnie niższe w porównaniu z procesem referencyjnym. Zarejestrowane różnice wynikały prawdopodobnie z obecności trudniej przyswajalnych niż glukoza źródeł węgla (fruktoza i sacharoza) w badanym materiale i konieczności uruchomienia alternatywnych ścieżek metabolicznych umożliwiających wykorzystanie przez komórki gospodarza tych sacharydów.

Podsumowując, biosynteza prowadzona z wykorzystaniem melasy charakteryzowała się wolniejszym przyrostem biomasy oraz niższym poziomem akumulacji P3HB w porównaniu z procesem referencyjnym (tabela 1, rys. 4). Różnice w dynamice wzrostu i intensywności produkcji biopolimeru wskazują na ograniczoną dostępność frakcji łatwo przyswajalnych cukrów i/lub możliwy wpływ związków hamujących w przypadku hodowli prowadzonych w obecności wybranego surowca odpadowego. Warto podkreślić, że w procesach biotechnologicznych zachodzących przy udziale mikroorganizmów rodzaj stosowanego surowca jest wskazywany jako kluczowa determinanta wydajności i opłacalności procesu wytwarzania danego bioproduktu. Drobnoustroje syntetyzujące P3HB mogą metabolizować szerokie spektrum substratów: od łatwo przyswajalnych węglowodanów, poprzez złożone hydrolizaty biomasy lignocelulozowej, aż po tanie odpady poprodukcyjne pochodzące głównie z przemysłu rolno-spożywczego³⁴. Z uwagi na fakt, że udział surowca w całkowitych nakładach na wytwarzanie P3HB metodą biosyntezy może sięgać nawet 50%, intensywnie poszukuje się niedrogich, łatwo dostępnych materiałów, które mogłyby zostać wykorzystane w tego rodzaju procesach³⁵. Zastosowanie substratów, takich jak np. glicerol techniczny, pozostałości skrobiowe czy hydrolizaty hemicelulozowe, stanowiących produkty uboczne przemysłu m.in. rolno-spożywczego i biopaliwowego, umożliwi znacząco obniżyć koszty operacyjne przy jednoczesnym zachowaniu wysokiej wydajności

ści syntezy P3HB, co czyni je szczególnie atrakcyjnymi z perspektywy przemysłowej. W tym ujęciu, zgodnie z zamieszczonymi w niniejszej pracy wynikami, również melasa może być postrzegana jako wartościowy substrat alternatywny, z punktu widzenia zarówno biotechnicznego, jak i ekonomicznego.

Właściwości makrocząsteczkowe P3HB z hodowli własnej

Uzyskany P3HB scharakteryzowano poprzez oznaczenie wybranych parametrów opisujących jego strukturę makrocząsteczkową (tabela 2). P3HB otrzymany w procesie przebiegającym w obecności glukozy jako jedyne źródła węgla (tabela 2, P3HB_I) cechowała średnia masa cząsteczkowa liczbowa (M_n) i wagowa (M_w) na poziomie odpowiednio 214–326 g/mol oraz 519–641 g/mol, a także polidispersyjność (PDI) 2,0–2,6, wskazująca na dość wąski rozkład długości łańcuchów. W porównaniu z komercyjnie dostępnym produktem firmy Biomer®, P3HB wytworzony w Łukasiewicz-ICHp charakteryzowała większa jednorodność cząsteczek, o czym świadczyła niższa wartość PDI. Uzyskane wyniki wskazują, że otrzymany w procesie prowadzonym w obecności glukozy materiał dorównuje jakością polimerowi handlowemu i może stanowić dla niego atrakcyjną alternatywę. Z drugiej strony, wykorzystanie melasy jako jedyne źródła węgla w procesie (tabela 2, P3HB_{II}) pozwoliło wytworzyć P3HB o ponad 2-krotnie większej średniej masie cząsteczkowej M_w (1385–1633 g/mol), podczas gdy wartość M_n pozostała na poziomie podobnym do referencyjnego (hodowla w obecności glukozy). Wartości te znalazły odzwierciedlenie w wysokiej polidispersyjności otrzymanego materiału (PDI = 5,4–6,0) wskazującej na obecność łańcuchów o różnej długości. W porównaniu z produktem firmy Biomer®, charakteryzującym się mniejszą średnią masą cząsteczkową wagową (554–596 g/mol) oraz niemal 2-krotnie niższym poziomem PDI (PDI = 2,9–3,6), P3HB uzyskany z hodowli prowadzonej z wykorzystaniem melasy wyróżniała znacznie większa heterogeniczność. Taka struktura makrocząsteczkowa przekładała się na odmienne właściwości mechaniczne i przetwórcze badanego biopolimeru, co mogło z kolei prowadzić do możliwości jego zastosowania w obszarach innych niż typowe dla produktu komercyjnego. Warto podkreślić, że M_n , M_w i PDI to podstawowe wskaźniki, które pozwalają ocenić jednorodność materiału i jego właściwości mechaniczne, termiczne i reologiczne, a także kontrolować przebieg procesu wytwarzania wyrobów na nim bazujących^{36–38}. Wartości tych parametrów w sposób bezpośredni determinują potencjalne obszary wykorzystania P3HB, bowiem to właśnie od długości łańcuchów i zakresu rozkładu mas cząsteczkowych zależy, czy materiał będzie odpowiedni do danego zastosowania.

Wpływ kontrolowanej degradacji P3HB na jego właściwości reologiczne i aplikacyjne

Table 2. Average molecular weights (M_n , M_w) and polydispersity (PDI) of P3HB obtained in fed-batch cultures of *E. coli* IChP-112 pIBA-phaCAB grown with glucose (I) or molasses (II) as the sole carbon source, compared with the corresponding parameters of the reference polymer (Biomer®)

Tabela 2. Średnia masa cząsteczkowa (M_n , M_w) i dyspersyjność (PDI) P3HB otrzymanego w hodowli półkresowej szczepu *E. coli* IChP-112 pIBA-phaCAB prowadzonej z wykorzystaniem glukozy (I) albo melasy (II) jako jedyne źródła węgla, zestawione z parametrami polimeru referencyjnego (Biomer®)

Biopolimer	Średnia masa cząsteczkowa, g/mol		PDI
	liczbowo	wagowo	
P3HB _I	214–326	519–641	2,0–2,6
P3HB _{II}	232–302	1385–1633	5,4–6,0
Biomer®	154–202	554–596	2,9–3,6

PDI – współczynnik polidispersyjności; P3HB_I oraz P3HB_{II} – P3HB uzyskany z hodowli prowadzonej w obecności odpowiednio glukozy albo melasy

Table 3. Molecular mass of P3HB biopolymer obtained from in-house cultivation

Tabela 3. Masa cząsteczkowa biopolimeru P3HB z hodowli własnej

Biopolimer	Masa cząsteczkowa, kDa
Wielkocząsteczkowy P3HB, h-P3HB	> 200
Małocząsteczkowy P3HB, l-P3HB	< 10

Istotnym elementem opracowanej technologii wytwarzania P3HB^{15–17} był etap kontrolowanej degradacji biopolimeru wielkocząsteczkowego (h-P3HB) do jego małocząsteczkowej formy (l-P3HB) (tabela 3). Drastyczna redukcja masy cząsteczkowej z wartości powyżej 200 kDa do mniej niż 10 kDa umożliwiła uzyskanie materiału, który może pełnić funkcję modyfikatora reologii nie tylko h-P3HB, ale i innych (bio)tworzyw. Warto zaznaczyć, że właściwościami utrudniającymi szersze wykorzystanie P3HB były do tej pory kruchość oraz temperatura topnienia bliska temperaturze degradacji (tzw. małe „okno przetwórcze”) wynikające bezpośrednio z jego struktury krystalicznej^{39,40}. Wprowadzenie l-P3HB do matrycy polimeru wielkocząsteczkowego znacząco poprawiło elastyczność materiału i poszerzyło niewielkie okno przetwórcze poprzez obniżenie stopnia krystaliczności kompozycji^{15–17}. Ponadto, zakłócenie uporządkowanej struktury krystalicznej doprowadziło do obniżenia temperatur przemian fazowych oraz zmniejszenia podatności układu na wtórną krystalizację, co przełożyło się na stabilniejszy i łatwiejszy do kontrolowania proces przetwórstwa. W efekcie wykorzystanie l-P3HB jako plastyfikatora h-P3HB pozwoliło znacząco zwiększyć możliwości aplikacyjne tego biopolimeru¹⁷. Warto podkreślić, że dotychczas problem kruchości i wąskiego okna przetwórczego próbowano kompensować poprzez m.in. stosowanie modyfikatorów zewnętrznych lub kopolimerów. Takie rozwiązania nie zapewniały jednak homogeniczności chemicznej materiału, co zaburzało kontrolę nad przebiegiem procesu biodegradacji, pogarszało stabilność właściwości użytkowych i ograniczało możliwość wykorzystania w aplikacjach wymagających wysokiej czystości. Zastosowanie l-P3HB jako wewnętrznego modyfikatora reologii h-P3HB pozwala zachować jednorodność chemiczną polimeru, co jest szczególnie istotne m.in. w implantologii, inżynierii

tkankowej oraz systemach kontrolowanego uwalniania leków^{41–43}).

Enkapsulacja substancji czynnej w P3HB jako strategia uzyskania modyfikowanego uwalniania

W pracy zastosowano 2 warianty technik emulsyjnych, emulsje pojedyncze typu olej/woda (o/w) oraz emulsje podwójne typu woda/olej/woda (w/o/w). Metody te należą do najczęściej stosowanych strategii wytwarzania mikrosfer¹ polimerowych przeznaczonych do kontrolowanego dostarczania substancji czynnych. Wybór odpowiedniej techniki mikrokapsułkowania zależy od właściwości fizykochemicznych substancji czynnej, charakterystyki polimeru oraz pożądanego profilu uwalniania. Do najczęściej stosowanych metod należą: koacercwacja, polimeryzacja międzyfazowa, suszenie rozpyłowe, powlekanie w złożu fluidalnym oraz techniki emulsyjne⁴⁴.

W metodzie o/w faza organiczna, zawierająca rozpuszczony polimer i substancję czynną, była dyspergowana w fazie wodnej w obecności emulgatora. Intensywne mieszanie lub homogenizacja prowadziło do powstania drobnych kropli fazy organicznej, które po odparowaniu rozpuszczalnika przekształcały się w mikrosfery polimerowe. Technika ta jest szczególnie często stosowana w przypadku substancji słabo rozpuszczalnych w wodzie⁴⁵.

W przypadku podwójnej emulsji w/o/w proces przebiegał dwuetapowo. W 1. etapie tworzona była emulsja pierwotna, w której faza wodna zawierająca substancję czynną była zdyspergowana w roztworze polimeru w rozpuszczalniku organicznym. Następnie emulsję tę wprowadzano do 2. fazy wodnej zawierającej emulgator, tworząc emulsję wtórną. Usunięcie rozpuszczalnika prowadziło do utworzenia mikrosfer o bardziej złożonej strukturze wewnętrznej. Technika ta umożliwia ograniczenie utraty substancji czynnej podczas procesu enkapsulacji⁴⁵. Warto podkreślić, że na właściwości mikrosfer otrzymanych zarówno metodą o/w, jak i w/o/w wpływa wiele parametrów technologicznych, w tym rodzaj i stężenie polimeru, dobór rozpuszczalnika, stężenie emulgatora, stosunek objętości faz oraz warunki homogenizacji.

W Łukasiewicz-IChP otrzymano układy emulsyjne z wykorzystaniem alkoholu poliwinylowego (PVA) pełniącego funkcję emulgatora. PVA jest syntetycznym polimerem rozpuszczalnym w wodzie, którego szkielet węglowy ulega biodegradacji w środowisku biologicznym, dzięki czemu znajduje zastosowanie w aplikacjach medycznych⁴⁶. W systemach mikrosfer polimerowych PVA stabilizował fazę emulsyjną i wspomagał formowanie jednorodnych cząstek, co było kluczowe dla uzyskania spójnego profilu uwalniania API. Substancja lecznicza była zawieszona w matrycy polimerowej⁴⁷.

Porównanie mikrosfer otrzymanych 2 technikami emulsyjnymi o/w oraz w/o/w wskazuje, że zastosowana metoda

kapsulacji wyraźnie wpływała zarówno na wielkość cząstek, jak i na zawartość enkapsulowanej substancji czynnej. W przypadku metody o/w uzyskano mikrosfery o stosunkowo węższym i bardziej jednorodnym rozkładzie wielkości (0,38–0,81 μm), przy zawartości API wynoszącej 4,18%. Natomiast zastosowanie podwójnej emulsji w/o/w doprowadziło do powstania cząstek o szerszym zakresie wielkości (0,15–0,91 μm), co jest typowe dla układów wieloetapowych, w których stabilność zarówno emulsji pierwotnej, jak i wtórnej wpływa na końcową morfologię mikrosfer. W tym przypadku uzyskano większą zawartość substancji czynnej (5,59%). Taki wynik sugeruje, że struktura podwójnej emulsji sprzyjała skuteczniejszemu zatrzymaniu API szczególnie o charakterze hydrofilowym w matrycy polimerowej i ograniczała jego dyfuzję do fazy zewnętrznej w trakcie formowania cząstek⁴⁸. Uzyskane wyniki wskazują, że metoda o/w pozwoliła uzyskać bardziej jednorodny układ cząstek, jednak z nieco mniejszą zawartością substancji czynnej. Metoda w/o/w była korzystniejsza pod względem efektywności enkapsulacji, choć odbywało się to kosztem większej heterogeniczności wielkości mikrosfer. Różnice te mogą mieć istotne znaczenie dla późniejszego profilu uwalniania API oraz właściwości farmakokinetycznych opracowywanego systemu dostarczania leku.

Podsumowanie

P3HB ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne, biodegradowalność i biokompatybilność jest uznawany za materiał, który może trwale zastąpić konwencjonalne tworzywa sztuczne w takich obszarach, jak medycyna, rolnictwo czy opakowalnictwo^{49–52}. Powszechne wykorzystanie tego biopolimeru nie tylko wpisuje się w założenia gospodarki o obiegu zamkniętym, ale jest również dobrą odpowiedzią na rosnące wymagania regulacyjne i środowiskowe w zakresie redukcji odpadów plastikowych. Pełne wykorzystanie potencjału aplikacyjnego P3HB wymaga jednak dopasowania właściwości materiału do wymagań konkretnych produktów. Taką możliwość daje zastosowanie małowielkościowego l-P3HB jako wewnętrznego modyfikatora reologii h-P3HB (lub innych biotworzyw), który zmienia właściwości mechaniczne i przetwórcze biopolimeru, jednocześnie pozwalając zachować jednorodność chemiczną układu. Co więcej, pewne cechy poli(3-hydroksymaślanu) mogą być kształtowane już na etapie biosyntezy. Dobór źródła węgla i warunków prowadzenia procesu pozwala modulować strukturę i parametry makrocząsteczkowe otrzymywanego polimeru. Dzięki takim strategiom możliwe jest precyzyjne dostosowanie właściwości P3HB do potrzeb aplikacyjnych, co otwiera drogę do jego szerokiego wykorzystania w nowoczesnych, zrównoważonych technologiach.

Badania zostały sfinansowane ze środków przyznanych przez Ministerstwo Edukacji Narodowej i Nauki w ramach

¹ Mikrosfery to monolityczne, porowate struktury kuliste o średnicy 1–500 μm .

projektu statutowego Instytutu Chemii Przemysłowej im. prof. I. Mościckiego w roku 2020 oraz dotacji celowej Prezesa Centrum Łukasiewicz w ramach projektu pt. „Biopolimery bakteryjne w circular economy” (BioBakCir), realizowanego w latach 2021–2022.

Otrzymano: 09-03-2026

Zrecenzowano: 22-03-2026

Zaakceptowano: 29-04-2026

Opublikowano: 25-05-2026

LITERATURA

- [1] J.E. Sosa-Hernández, A.M. Villalba-Rodríguez, K.D. Romero-Castillo, R. Zavala-Yoe, M. Bilal, R.A. Ramirez-Mendoza, R.P. Saldivar, H. Iqbal, *Polymer Eng. Sci.* 2020, **60**, nr 8, 1760, DOI: 10.1002/pen.25470.
- [2] S. García-Cerna, U. Sánchez-Pacheco, A. Meneses-Acosta, J. Rojas-García, B. Campillo-Illanes, D. Segura-González, C. Peña-Malacara, *Polymers* 2022, **14**, nr 19, 4021, DOI: 10.3390/polym14194021.
- [3] A.F. Ramos, A. Espinosa-Hernández, D.A. Mendez, I.O. Cabeza, N. Moreno-Sarmiento, *Chem. Eng. Trans.* 2018, **67**, 667, DOI: 10.3303/CET1867112.
- [4] B. Mongili, A. Abdel Azim, S. Fraterrigo Garofalo, E. Batuecas, A. Re, S. Bocchini, D. Fino, *Biotechnol. Biofuels Bioprod.* 2021, **14**, nr 1, 13, DOI: 10.1186/s13068-020-01849-y.
- [5] M.P. Fernández-Ronco, B. Gradzik, A. Gooneie, R. Hufenus, M. El Fray, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2017, **5**, nr 11, 11060, DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b03023.
- [6] R. Turco, G. Santagata, I. Corrado, C. Pezzella, M. Di Serio, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021, **8**, 619266, DOI: 10.3389/fbioe.2020.619266.
- [7] D. Li, Y. Yang, R. Liu, Y. Wu, F. Guo, *Polymers* 2025, **17**, nr 22, 3083, DOI: 10.3390/polym17223083.
- [8] K. Priyanka, M. Umesh, K. Preethi, *Biomass Convers. Biorefin.* 2025, **15**, nr 17, 23689, DOI: 10.1007/s13399-022-03333-z.
- [9] H.R. Ingram, R.J. Martin, J.B. Winterburn, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022, **106**, nr 18, 6033, DOI: 10.1007/s00253-022-12093-9.
- [10] Y.-C. Chang, M.V. Reddy, Y. Tsukiori, Y. Mawatari, D.B. Choi, *Heliyon* 2023, **9**, nr 12, e23130, DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e23130.
- [11] S. Brojanigo, E. Parro, T. Cazzorla, L. Favaro, M. Basaglia, S. Casella, *Polymers* 2020, **12**, nr 7, 1496, DOI: 10.3390/polym12071496.
- [12] M. Brtnicky, V. Pecina, J. Holátko, T. Hammerschmiedt, A. Mustafa, A. Kintl, J. Fojt, T. Baltazar, J. Kucerik, *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2022, **9**, nr 1, 75, DOI: 10.1186/s40538-022-00345-9.
- [13] R.P. Mahato, S. Kumar, P. Singh, *Arch. Microbiol.* 2023, **205**, nr 5, 172, DOI: 10.1007/s00203-023-03499-8.
- [14] K. Saravanan, M. Umesh, P. Kathirvel, *J. Polym. Environ.* 2022, **30**, nr 12, 4903, DOI: 10.1007/s10924-022-02562-7.
- [15] *Pat. EP WO2024136685.*
- [16] *Zgl. pat. pol. P.443240 (2022).*
- [17] *Pat. pol. PL443241.*
- [18] A. Anjum, M. Zuber, K.M. Zia, A. Noreen, M.N. Anjum, S. Tabasum, *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, **89**, 161, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069.
- [19] H.S. Ng, C.Y. Chang, C.A. Chiu, J.C.W. Lan, *Bioresour. Technol.* 2025, 133531, DOI: 10.1016/j.biortech.2025.133531.
- [20] S.Y. Choi, M.N. Rhie, H.T. Kim, J.C. Joo, I.J. Cho, J. Son, S.Y. Jo, Y.J. Sohn, K.A. Baritugo, J. Pyo, Y. Lee, S.Y. Lee, S.J. Park, *Metab. Eng.* 2020, **58**, 47, DOI: 10.1016/j.ymben.2019.05.009.
- [21] A. de Marco, *Microb. Cell Fact.* 2025, **24**, nr 1, 21, DOI: 10.1186/s12934-025-02646-8.
- [22] B.S. Saharan, N. Kamal, P. Badoni, R. Kumar, M. Saini, D. Kumar, D. Sharma, S. Tyagi, P. Ranga, J. Parshad, Ch. Goyal, R. Kumar, M. Nehra, Ch.S. Seth, J.S. Duhan, N.K. Mandal, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2024, **99**, nr 1, 17, DOI: 10.1002/jctb.7524.
- [23] D. Yang, S.Y. Park, Y.S. Park, H. Eun, S.Y. Lee, *Trends Biotechnol.* 2020, **38**, nr 7, 745, DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.11.007.
- [24] P.A. Adamczyk, J.L. Reed, *Curr. Opin. Syst. Biol.* 2017, **6**, 80, DOI: 10.1016/j.coisb.2017.11.001.
- [25] H. Mori, M. Kataoka, X. Yang, *Microorganisms* 2022, **10**, nr 9, 1835, DOI: 10.3390/microorganisms10091835.
- [26] D. Mikiwicz, A. Bierzynska-Krzysik, A. Sobolewska, D. Stadnik, M. Bogiel, M. Pawłowska, A. Wójtowicz-Krawiec, P.A. Baran, N. Łukasiewicz, A. Romanik-Chruścielewska, I. Sokołowska, J. Stadnik, P. Borowicz, G. Płucienniczak, A. Płucienniczak, *PLoS One* 2017, **12**, nr 3, e0172600, DOI: 10.1371/journal.pone.0172600.
- [27] L. Santolin, S.L. Riedel, C.J. Brigham, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2024, **108**, nr 1, 450, DOI: 10.1007/s00253-024-13284-2.
- [28] M. Koller, *Molecules* 2018, **23**, nr 2, 362, DOI: 10.3390/molecules23020362.
- [29] Y. Zheng, Q. Yuan, H. Luo, X. Yang, H. Ma, *Bioengineered* 2018, **9**, nr 1, 209, DOI: 10.1080/21655979.2018.1467652.
- [30] A. Naseem, I. Rasul, Z.A. Raza, F. Muneer, A. ur Rehman, H. Nadeem, *PeerJ* 2024, **12**, e17936, DOI: 10.7717/peerj.17936.
- [31] M.T. Schmid, E. Sykacek, K. O'Connor, M. Omann, N. Mundigler, M. Neureiter, *J. Appl. Polym. Sci.* 2022, **139**, nr 3, 51503, DOI: 10.1002/app.51503.
- [32] R. Kanzariya, A. Gautam, S. Parikh, S. Gautam, *Waste Biomass Valor.* 2024, **15**, nr 6, 3535, DOI: 10.1007/s12649-023-02396-x.
- [33] J. Glazyrina, E.M. Materne, T. Dreher, D. Storm, S. Junne, T. Adams, A. Greiner, P. Neubauer, *Microb. Cell Fact.* 2010, **9**, nr 1, 42, DOI: 10.1186/1475-2859-9-42.
- [34] L. Getino, J.L. Martín, A. Chamizo-Ampudia, *Microorganisms* 2024, **12**, nr 10, 2028, DOI: 10.3390/microorganisms12102028.
- [35] G. Jiang, D.J. Hill, M. Kowalczyk, B. Johnston, G. Adamus, V. Irorere, I. Radecka, *Int. J. Mol. Sci.* 2016, **17**, nr 7, 1157, DOI: 10.3390/ijms17071157.
- [36] D.T. Gentekos, R.J. Sifri, B.P. Fors, *Nat. Rev. Mater.* 2019, **4**, nr 12, 761, DOI: 10.1038/s41578-019-0138-8.
- [37] M.R.M.M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, M. Khosravi, Y.M. Mozafari, *Pharmaceutics* 2018, **10**, nr 2, 57, DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.
- [38] C. Auch, M. Harms, K. Mäder, *Int. J. Pharm.* 2019, **556**, 372, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.012.
- [39] W. Alm Mustafa, S. Grishchuk, M. Redel, D.W. Schubert, G. Grun, *Polymers* 2025, **17**, nr 16, 2231, DOI: 10.3390/polym17162231.
- [40] R. Hufenus, F.A. Reifler, M.P. Fernández-Ronco, M. Heuberger, *Eur. Polym. J.* 2015, **71**, 12, DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.07.039.
- [41] S. Ray, V.C. Kalia, *Indian J. Microbiol.* 2017, **57**, nr 3, 261, DOI: 10.1007/s12088-017-0651-7.
- [42] J. Vodicka, M. Wikarska, M. Trudicova, Z. Juglova, A. Pospisilova, M. Kalina, M. Koller, P. Sedlacek, *Polymers* 2022, **14**, nr 10, 1990, DOI: 10.3390/polym14101990.
- [43] C. Kuenneth, J. Lalonde, B.L. Marrone, C.N. Iverson, R. Ramprasad, G. Pilania, *Commun. Mater.* 2022, **3**, nr 1, 96, DOI: 10.1038/s43246-022-00319-2.
- [44] S. Chowdhury, K. Kar, R. Mazumder, *Future J. Pharm. Sci.* 2024, **10**, nr 1, 72, DOI: 10.1186/s43094-024-00644-y.
- [45] S.P. Rupali, G.G. Anuja, R.J. Vrunda, U.A. Subodh, S.C. Atram, *Asian J. Pharm. Res. Dev.* 2024, **12**, nr 1, 65, DOI: 10.22270/ajprd.v12i1.1350.
- [46] J. Gamboa, S. Paulo-Mirasol, A. Espona-Noguera, H. Enshaei, S. Ortiz, F. Estrany, M.-P. Ginebra, J. Torras, *J. Polym. Environ.* 2024, **32**, nr 8, 3609, DOI: 10.1007/s10924-023-03179-0.
- [47] M.V. Loureiro, A. Mariquito, M. Vale, J.C. Bordado, I. Pinho, A.C. Marques, *Polymers* 2023, **15**, nr 2, 403, DOI: 10.3390/polym15020403.
- [48] K.V. Gavali, M.D. Kengar, K.V. Chavan, V.P. Anekar, N.I. Khan, *Asian J. Pharm. Res.* 2019, **9**, nr 2, 123, DOI: 10.5958/2231-5691.2019.00020.0.
- [49] J. Liu, Z. Zhou, H. Li, X. Yang, Z. Wang, J. Xiao, D.X. Wei, *Particulology* 2024, **87**, 286, DOI: 10.1016/j.partic.2023.08.011.
- [50] S. Wang, W. Chen, H. Xiang, J. Yang, Z. Zhou, M. Zhu, *Polymers* 2016, **8**, nr 8, 273, DOI: 10.3390/polym8080273.
- [51] T.S.M. Amelia, S. Govindasamy, A.M. Tamothran, S. Vigneswari, K. Bhubalan, [w]: *Biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates*, Springer, Singapore 2019, 347, DOI: 10.1007/978-981-13-3759-8_13.
- [52] J. Zhang, E.I. Shishatskaya, T.G. Volova, L.F. da Silva, G.Q. Chen, *Mater. Sci. Eng. C* 2018, **86**, 144, DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.035.