

Biodegradowalne poliestry hydroksykwasów alkanowych (PHA) syntetyzowane przez drobnoustroje

Eligia M. Szewczyk

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Katedra Mikrobiologii
Akademia Medyczna
Łódź

1. Wprowadzenie

Materiały zapasowe bakterii budziły zwykle umiarkowane zainteresowanie mikrobiologów. Stanowiły cechę wykorzystywaną do klasyfikacji drobnoustrojów, wiązano ich obecność z przeżywaniem i rozprzestrzenianiem bakterii. W ostatnim dwudziestoleciu ogromnie wzrosło zainteresowanie gromadzonymi dość powszechnie przez mikroorganizmy polihydroksykwasami alkanowymi — PHA. Badania tych bakteryjnych materiałów zapasowych wpłynęły na rozwój wiedzy w bardzo wielu dziedzinach. Przyczyną tego postępu było odkrycie możliwości wykorzystania ich jako biodegradowalnego tworzywa o wszechstronnym zastosowaniu. Znaczący postęp nauki dotyczył nie tylko biotechnologii, ale i inżynierii genetycznej oraz badań z zakresu metabolizmu drobnoustrojów i problemów jego regulacji. Ich wyniki służyć będą z pewnością nie tylko do produkcji biodegradowalnych poliestrów. Badania nad PHA zjednoczyły we wspólnej pracy naukowców najróżniejszych specjalności: od mikrobiologów i chemików, po ekonomistów i socjologów. Obejmują one kompleksowo wiele różnorodnych zagadnień związanych z ochroną i oczyszczaniem zdegradowanego środowiska człowieka (1). Bardzo ważne jest i to, że tematyka ta zainteresowała także naukowców zajmujących się badaniami podstawowymi, że wspomnę o niezwykle znaczących pracach nad udziałem poli-3-hydroksymasłanu w transporcie membranowym czy właściwościami fizykochemicznymi biologicznych polimerów (2,3).

2. Zarys historii badań PHA

1926 r. — Lemoigne zidentyfikował ziarna kwasu poli-3-hydroksymasłowego (PHB) w komórkach *Bacillus megaterium* (4).

1961 r. — Schlegel i wsp. (5) opisali szczep *Hydrogenomonas* (obecnie *Alcaligenes*) *eutrophus* H16 kumulujący PHB w ilości do 80% suchej masy komórek.

1962 r. — Baptist scharakteryzował właściwości termoplastyczne PHB (6).

1974 r. — Wallen i Rohwedder wyizolowali ze środowiska (aktywowany szlam) pierwszy heteropolimer: poli(3HB-co-3HV) (7).

1987 r. — grupa naukowców z James Madison University w Wirginii pod kierownictwem Douglasa Dennisa dokonała pierwszego klonowania genów szlaku syntezy PHB i uzyskała ich ekspresję w komórkach *E. coli* (8).

1989 r. — Barnard i Sanders wykryli amorficzną strukturę PHA zlokalizowanego w komórkach (9).

1990 r. — pojawienie się na rynku pierwszych produktów z PHA — butelki do szamponu Sanara.

1993 r. — biodegradowalny lateks — pierwsze zastosowania amorficznego PHA.

1994 r. — zespół naukowców pod kierownictwem Chrisa Somervilla sklonował bakteryjne geny syntezy PHB do *Arabidopsis thaliana*, uzyskując aktywną produkcję polimeru przez transgeniczne rośliny (10).

3. Występowanie i lokalizacja polimeru w komórkach drobnoustrojów

Gromadzenie PHA w komórkach jest cechą rozpowszechnioną wśród drobnoustrojów wolno żyjących w środowisku. Te polimery zapasowe spotyka się zarówno u bakterii gramdodatnich, jak i gramujemnych, przy czym u tych ostatnich ich kumulacja jest cechą występującą częściej i intensywniej. Stąd też, zapewne, właśnie na nich skoncentrowane są najważniejsze badania w tej dziedzinie. Materiał zapasowy w postaci polihydroksykwasów alkanowych gromadzą głównie bakterie dysponujące dużymi możliwościami metabolicznymi, a co za tym idzie, wykazujące niewielkie wymagania wzrostowe. Przeważają w tej grupie gramujemne tlenowe pałeczki. PHA są kumulowane przez bakterie wiążące wolny azot z powietrza (11), bakterie dla których akceptorem wodoru są związki siarki (12), bakterie metanowe zdolne wykorzystywać metan jako jedyne źródło węgla i energii (13), fotosyntetyzujące tlenowe cyjanobakterie (14) oraz beztlenowe fotosyntetyzujące bakterie purpurowe (15). Liczba doniesień dotyczących tych właśnie, tanich w hodowli bakterii, znacząco wzrosła z chwilą przejścia od badań podstawowych do aplikacyjnych; zyskały one nowy, komercyjny wymiar. Zdecydowanie najwięcej doniesień dotyczy różnych gatunków rodzaju *Pseudomonas*, jednakże najdokładniej poznanym szczepem jest *Alcaligenes (Hydrogenomonas) eutrophus* H16.

Dość powszechne występowanie PHA w komórkach bakterii (wykazane niedawno) powoduje, że cecha ta nie może być wykorzystywana do ich klasyfikacji (16).

Nieliczne są dane dotyczące występowania polimeru w komórkach bakterii chorobotwórczych. Dotyczą one przede wszystkim tych, które zdolne są do długiego bytowania w środowisku, głównie w glebie. Wśród nich, stosunkowo dużo kwasu polihydroksymasłowego (PHB) zawierają komórki laseczek, zarówno tlenowych — *Bacillus anthracis* (17), *B. cereus* (18), jak i beztlenowych — *Clostridium botulinum*, *Cl. perfringens* (19) czy też *Nocardia asteroides* i *N. brasiliensis* (20). Znajdowano również wtręty PHB w komórkach *Vibrio parahaemolyticus* (21), *Pseudomonas aeruginosa* (22), *Pseudomonas pseudomallei* (23), oraz *Legionella pneumophila* (24). PHB nie formujący granul, najprawdopodobniej także o zapasowym charakterze, jest obecny w komórkach wielu gatunków gronkowców (25). Zupełnie odmienny rodzaj PHB znaleziono w drobnoustrojach m. in. takich jak *Escherichia coli* czy *Haemophilus influenzae*. Nie gromadzą go one jako materiału zapasowego, a wykryty w nich polimer ma stosunkowo małą cząsteczkę (130 – 170 jednostek monomeru) i jest zlokalizowany w membranie cytoplazmatycznej (26). Rola membranowego PHB nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona. Występowanie tego składnika wykazano także w komórkach eukariotycznych (27).

Niektóre gatunki drobnoustrojów mogą kumulować polimer w znacznych ilościach. Opisano szczep *Alcaligenes eutrophus*, który gromadzi go w ilości aż do 96% suchej masy komórek (28). W komórkach bakterii polihydroksykwasu karboksylowego są zlokalizowane wewnątrz granul o średnicy od 0,2 do 0,7 μm (29). W natywnych granulach, *in vivo*, polimer znajduje się w postaci amorficznej, natomiast postać krystaliczną nieodwracalnie przybiera pod wpływem rozmaitych czynników, zarówno fizycznych, jak i chemicznych. Prawie zawsze dochodzi do tego w trakcie preparatyki ziaren. Przeprowadzono badania, które miały na celu poznanie czynników odpowiedzialnych za ten proces. Na ich podstawie znaleziono sposoby na utrzymanie amorficznej postaci polimeru także w granulach wyizolowanych z komórek (9).

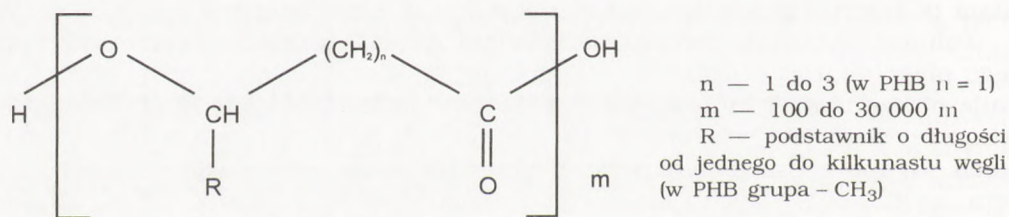
Polimer jest silnie uwodniony, zawiera do 40% wody (30), która stanowi jego plastyfikator, a jednocześnie środowisko dla aktywności enzymów. Granule otoczone są membraną, którą tworzą białka (2%) i lipidy (0,5%). Struktura tej błony jest przedmiotem badań prowadzonych obecnie w kilku ośrodkach. Grupa z Uniwersytetu Massachusetts, kierowana przez Clintona Fullera, wykazała w swych najnowszych pracach, że na jej strukturę składa się pięć łańcuchów polipeptydowych (o MW 59,55,43,32 i 18kD) i dwa fosfolipidy (31). Tworzą one dwuwarstwową sieć. Białko stanowiące zasadniczy element strukturalny tej sieci jest cząsteczką o masie 43kD, nie wykazującą funkcji enzymatycznej. Z otaczającą granule błoną związane są także najistotniejsze enzymy odpowiedzialne za metabolizm polimeru w komórkach: syntaza (polimeraza) i depolimeraza PHA (9). Fuller przypuszcza, że dwa znalezione w wewnętrznej warstwie membrany białka, o masie 59 i 55kD, są odpowiedzialne za polimeryzację PHA, zaś aktywność depolimerazy związana jest z warstwą zewnętrzną (31,32).

Szeroko zakrojone badania warstwy białek, otaczających granule występujące w komórkach różnych drobnoustrojów prowadzi zespół Alexandra Steinbüchela, pracujący przez lata na Uniwersytecie w Getyndze, a obecnie

— w Münster (Niemcy) (33). Autor ten wprowadził porządkujące nazewnictwo tych białek. W obrębie dotychczas wspólnej grupy białek związanych z granulami — GAPs (*Granule-Associated Proteins*), wydzielił cztery podklasy. Należące do pierwszych dwóch podklas: PHA-syntazy i PHA-depolimerazy są białkami enzymatycznymi zaangażowanymi w podstawowy metabolizm polimerów. Trzecia podklasa nazwana PHA-fazydami (PHAasins) to białka nie będące enzymami, ale kodowane przez geny ulokowane w bezpośrednim sąsiedztwie genów kodujących enzymy zaangażowane w syntezę PHA. Steinbüchel przypisuje fazydom funkcję analogiczną do tej, jaką pełnią białka zwane oleozynami w nasionach i pyłku roślin. Stanowią one warstwę oddzielającą względnie hydrofobowe wnętrze zapasowego wtrętu (w przypadku bakterii — granul PHA) od hydrofilowej cytoplazmy. Czwarta podklasa białek związanych z granulami to białka o nie znanej dotąd funkcji (33).

4. Struktura chemiczna polimerów

Polihydroksykwasы alkanowe (PHA) stanowią dużą rodzinę związków. Ich różnorodność zależy od rodzaju podstawowych cząsteczek tworzących polimer. Schematyczny wzór PHA przedstawiony jest na rys. 1. Dotąd wykryto już ponad 90 różnych merów wchodzących w ich skład i ciągle opisywane są nowe. Niektóre z nich przedstawione są w zestawieniu 1. Najczęściej spotykane w komórkach drobnoustrojów składniki PHA wymieniono na początku listy i opatrzone skrótem, którym są opisywane. Pierwszym jest kwas 3-hydroksymasłowy — składnik najpopularniejszego wśród bakterii poli-hydroksykwasu — PHB.



Rys. 1. Schemat struktury polihydroksykwasów alkanowych wytwarzanych przez drobnoustroje.

W roku 1974 Wallen i Rohwedder wyizolowali z aktywowanego osadu ścieków komunalnych polimer, który zawierał kwasy: 3-hydroksymasłowy i 3-hydroksywalerianowy, a także śladowe ilości kwasów 3-hydroksyheksanowego i 3-hydroksyheptanowego (7). Później stwierdzono, że w polimery może być włączany także kwas 4-hydroksymasłowy, 5-hydroksywalerianowy (34), oraz wiele innych. Długość łańcucha cząsteczki podstawowej zwykle nie przekracza dwunastu atomów węgla (35). Mogą w niej występować wiązania nienasycone (36), lub podstawniki, takie jak $-Cl$, $-Br$ czy $-F$. Mogą to być także

ZESTAWIENIE 1

LISTA WAŻNIEJSZYCH MERÓW ZNALEZIONYCH W PHA IZOLOWANYM Z DROBNOUSTROJÓW (16)

kwask 3-hydroksymasłowy	(3HB)
kwask 3-hydroksypropionowy	(3HP)
kwask 3-hydroksywalerianowy	(3HV)
kwask 3-hydroksyheksanowy	(3HHX)
kwask 3-hydroksyheptanowy	(3HH)
kwask 3-hydroksyoktanowy	(3HO)
kwask 3-hydroksynonanowy	(3HN)
kwask 3-hydroksydekanowy	(3HD)
kwask 3-hydroksyundekanyowy	(3HUN)
kwask 3-hydroksydodekanowy	(3HDD)
kwask 4-hydroksymasłowy	(4HB)
kwask 5-hydroksywalerianowy	(5HV)
kwask 3-hydroksy-2-butenowy	
kwask 3-hydroksy-4-pentenowy	
kwask 3-hydroksy-4-heksenowy	
kwask 3-hydroksy-5-heksenowy	
kwask 3-hydroksy-6-oktenowy	
kwask 3-hydroksy-7-oktenowy	
kwask 3-hydroksy-8-nonenowy	
kwask 3-hydroksy-9-dekenowy	
kwask 3-hydroksy-6-dodekenowy	
kwask 3-hydroksy-5-tetradekenowy	
kwask 3-hydroksy-5,8-tetradekenowy	
kwask 3-hydroksy-6-bromoheksanowy	
kwask 3-hydroksy-8-bromooktanowy	
kwask 3-hydroksy-11-bromoundekanyowy	
kwask 3-hydroksy-7-fluoroheptanowy	
kwask 3-hydroksy-6-chloroheksanowy	
kwask 3-hydroksy-4-metylowalerianowy	
kwask 3-hydroksy-4-metyloheksanowy	
kwask 3-hydroksy-5-metyloheksanowy	
kwask 3-hydroksy-5-metylooktanowy	
kwask 3-hydroksy-6-metylooktanowy	
kwask 3-hydroksy-7-metylooktanowy	
kwask 3-hydroksy-butanodiowy	

rozgałęzione hydroksykwasy z podstawnikami alifatycznymi, lub resztami alkilofenyłowymi (37). Czynnikiem determinującym rodzaj cząsteczki podstawowej jest źródło węgla dostępne w czasie wzrostu, a także możliwości metaboliczne bakterii oraz warunki wzrostu. Daje to możliwość kontrolowania zachodzących wewnątrz drobnoustrojów procesów i modelowania ich w zależności od potrzeb człowieka.

Ze względu na wielkość cząsteczki podstawowego meru, polimery hydroksykwasów alkanowych podzielono na trzy klasy: PHA_{SCL} (*short-chain-length*) czyli takie, których mer zawiera 3-5 atomów węgla, PHA_{MCL} (*medium-chain-length*) o długości łańcucha podjednostki 6-14 węgli i PHA_{LCL} (*long-chain-length*), których mer zawiera powyżej 14 węgli.

Polimeryzacja podstawowych cząsteczek może prowadzić do powstawania homo- lub heteropolimerów. Ich teoretycznie możliwa różnorodność nie znajduje jednak potwierdzenia w naturze. Najczęściej gromadzone są takie homopoliestry jak: kwas poli-3-hydroksymasłowy [poli(3HB)], kwas poli-3-hydroksywalerianowy [poli(3HV)], kwas poli-4-hydroksymasłowy [poli(4HB)].

Wśród heteropolimerów najczęściej spotykane są kopoliestry złożone z dwóch rodzajów cząsteczek (bikopoliestry), takie jak: złożony z kwasów 3-hydroksymasłowego i 3-hydroksywalerianowego [poli(3HB-co-3HV)], czy złożony z kwasów 3-hydroksyheksanowego i 3-hydroksyoktanowego [poli(HHx-co-3HO)].

Pierwszym otrzymanym w warunkach laboratoryjnych terkopoliestrem jest heteropolimer złożony z trzech rodzajów cegiełek: kwasów 3-hydroksymasłowego, 3-hydroksywalerianowego i 4-hydroksymasłowego [poli(3HB-co-3HV-co-4HB)].

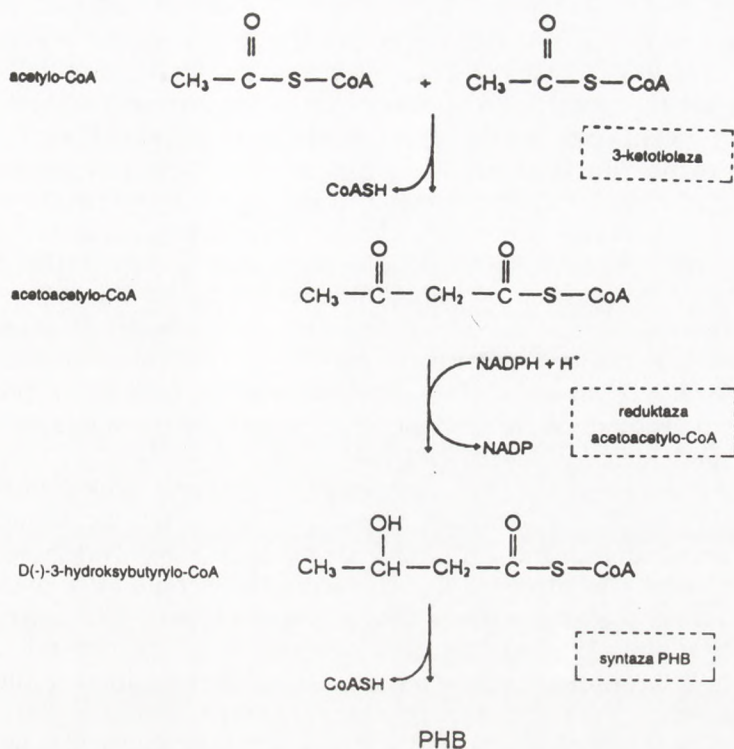
Niektóre drobnoustroje syntetyzują równocześnie więcej niż jeden homopolimer. Gromadzą je wtedy w osobnych granulach (38).

5. Biosynteza PHA

PHA są materiałami zapasowymi kumulowanymi najintensywniej w szczególnych warunkach hodowli, tj. w sytuacji pełnego zaopatrzenia lub wręcz nadmiaru związku będącego źródłem węgla, przy jednoczesnym zahamowaniu wzrostu i mnożenia się komórek przez niedobory innego rodzaju. Opisano stymulujący wpływ na syntezę PHA niedoborów azotu, siarczanów i fosforu (39). Do wzmożonej kumulacji zachęca bakterie także niedostatek niektórych kationów, np. magnezu, żelaza i potasu. Znaczny wpływ na syntezę PHA przez niektóre bakterie może mieć także niedobór tlenu (40).

Polimer kwasu 3-hydroksymasłowego jest syntetyzowany przez większość kumulujących go drobnoustrojów w kolejnych reakcjach enzymatycznych przedstawionych na rys. 2. Pierwszym substratem jest acetylo-Co A. Szlak ten jest najdokładniej zbadany u *Alcaligenes eutrophus* H16 (41). Enzym — 3-ketotiolaza (acetyltransferaza acetylo-CoA EC 2.3.1.9) dokonuje kondensacji Claisena, łącząc dwie cząsteczki acetylo-CoA. Powstały acetoacetylo-CoA jest następnie zredukowany do D(-)-3-hydroksybutyrylo-CoA z udziałem stereospecyficznej NADPH-zależnej reduktazy acetoacetylo-CoA (EC 1.1.1.36). Wreszcie w trzeciej reakcji, w wyniku działania syntazy PHB, łączą się reszty D(-)-3-hydroksymasłanu w poliester poprzez ich grupy karboksylowe i hydroksylowe.

Oprócz tej klasycznej drogi opisywane są jeszcze trzy inne, jedna charakterystyczna tylko dla *Rhodospirillum rubrum* (42) oraz dwie występujące



Rys. 2. Schemat najczęściej występującego u bakterii szlaku syntezy PHB.

u bakterii z rodzaju *Pseudomonas* (22,43). W przypadku *Rhodospirillum rubrum* droga syntezy ma podobny przebieg jak u *Alcaligenes*. Wydłuża ją jedynie reakcja przekształcenia powstałego pod wpływem działania innej pod względem specyficzności reduktazy acetoacetyloCoA — L(+) hydroksybutyryloCoA w formę D(-), która następnie polimeryzowana jest przez syntazę PHB.

Przebieg syntez innych niż PHB polihydroksyalkanów, o dłuższych cząsteczkach merów, które prowadzone są przez bakterie rodzaju *Pseudomonas* jest zupełnie odmienny. Uważa się, że w szlaku *Pseudomonas oleovorans* z substratów w postaci alkanów, alkoholi lub kwasów tłuszczowych powstają, przez połączenie z CoA, odpowiednie, aktywowane związki włączane są następnie w przemiany zbliżone do β -oksydacji. Produkty pośrednie tych przemian łączone są przez odpowiednią syntazę PHA (22). Druga znaleziona u *Pseudomonas* droga — szlak *Pseudomonas aeruginosa*, biegnie podobnie

jak u *Alcaligenes eutrophus* z acetylo-CoA, ale jego etapy nie są jeszcze poznane (43). Wiadomo jednakże, że produktami tej syntezy są kopolimery PHA_{MCL}.

Zdolność tworzenia przez drobnoustroje różnych poli-hydroksykwasów, w zależności od rodzaju źródła węgla zawartego w podłożu, wynika z bardzo niskiej specyficzności pierwszego z enzymów szlaku - 3-ketotiolazy. Enzym ten zdolny jest mianowicie do spowodowania kondensacji różnych acylowych pochodnych koenzymu A, dając początek syntezie składowych elementów polimeru o różnej długości łańcucha. Dla przykładu, gdy w podłożu znajduje się propionian, to jego cząsteczki mogą ulegać dekarboksylacji. Powstałe w ten sposób reszty octanowe tworzą, na drodze kondensacji, cząsteczki D(-)-3-hydroksymaślanu, charakterystyczne dla początku syntezy PHB. Z kolei, połączenie reszty octanowej z propionianową prowadzi do syntezy 3-hydroksywalerianianu. Proces ten, w wyniku którego dochodzi do kumulacji mieszaniny poli-3-hydroksymaślanu i poli-3-hydroksywalerianianu w komórkach *Alcaligenes eutrophus* H16, hodowanych w podłożu z propionianem jako jedynym źródłem węgla, prześledzili i opisali naukowcy japońscy z grupy pracującej pod kierownictwem Doi (44).

Zdolność włączania do PHA zawartych w podłożu prekursorów (kwasów organicznych, alkoholi i alkanów) bez konieczności ich wcześniejszej degradacji była przedmiotem innych badań tej grupy (45,46). Należy jednak wspomnieć, że przeszło dwadzieścia lat wcześniej Gottschalk (47), w eksperymentach z kwasami organicznymi znakowanymi izotopem ¹⁴C stwierdził, że *Alcaligenes eutrophus* H16 włącza bezpośrednio do polimerów takie substraty, jak octan lub krotonian, zaś mleczan i bursztynian muszą ulec najpierw dekarboksylacji.

Odkrycie charakterystycznego dla *Pseudomonas oleovorans* szlaku syntezy PHA w cyklu β-oksydacji odpowiednich acylowych pochodnych koenzymu A pozwoliło na wytłumaczenie zdolności tych bakterii do kumulacji polimerów bezpośrednio z alkanów lub kwasów karboksylowych o długości łańcucha większej o dwa węgle niż podstawowy mer budujący PHA (43,48).

Tworzenie PHA z substratów o zasadniczo odmiennej budowie stwierdzono u innych niż *Pseudomonas oleovorans* bakterii z rodzaju *Pseudomonas* należących do I grupy homologii rRNA. Opisana dla nich droga syntezy PHA (szlak *Pseudomonas aeruginosa*) pozwala na budowanie polimeru złożonego z reszt 3-hydroksydekanowych z tak prostych substratów, jak glukonian czy glukoza (22,49). Stwierdzono także, że bakterie *Rhodococcus* sp. są zdolne z takich substratów syntezować kopoliestry (50).

6. Rola PHA w komórkach gromadzących je drobnoustrojów

W środowiskach naturalnych bakterie znacznie częściej syntetyzują PHB niż inne PHA. Przyczyną jest niewątpliwie niedostępność źródeł węgla potrzebnych do syntezy tych ostatnich. Sytuacja diametralnie się zmienia w środowiskach zanieczyszczonych działalnością człowieka, czego dowodzą prze-

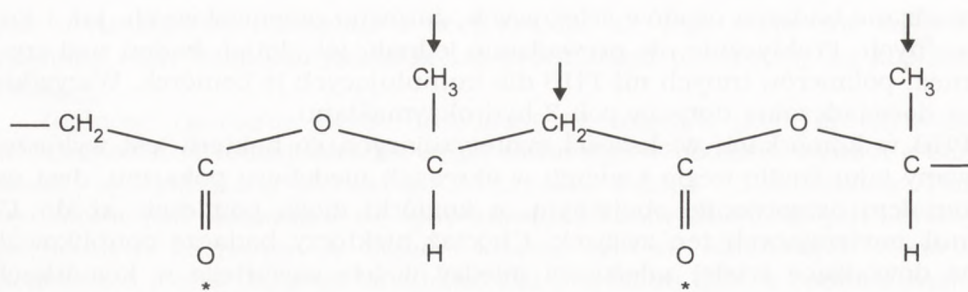
prowadzane badania osadów ściekowych, zarówno przemysłowych, jak i komunalnych. Praktycznie nie prowadzono jednak, jak dotąd, badań nad znaczeniem polimerów innych niż PHB dla kumulujących je komórek. Wszystkie dane doświadczalne dotyczą poli-3-hydroksymaślanu.

PHB w komórkach większości syntetyzujących go bakterii jest wykorzystywany jako źródło węgla i energii w okresach niedoboru pokarmu. Jest on materiałem osmotycznie obojętnym, a komórki mogą pomieścić aż do 12 granул zawierających ten związek. Chociaż niektórzy badacze opublikowali dane dowodzące ścisłej zależności między ilością zawartego w komórkach PHB, a żywotnością poddanych głodzeniu komórek (51,52), coraz częściej można spotkać się z opinią, że ilość kumulowanego substratu nie idzie w parze z większą przeżywalnością w środowisku (53), natomiast znaczenie ma sama zdolność do gromadzenia tego materiału zapasowego. Opinię taką, jak się wydaje, może potwierdzać przykład gronkowców kumulujących bardzo niewielkie, śladowe niemal ilości PHB. Ta znikoma zawartość polimeru ma jednak dla nich duże znaczenie zmieniając kolejność wykorzystywania endogennych zasobów, takich jak wolne aminokwasy, białka i kwasy nukleinowe (54,55).

PHB ma niezaprzeczalny udział w przemianach związanych ze sporulacją tlenowych laseczek (56), a także stanowi główny energetyczny i węglowy substrat przemian zachodzących w cystach tworzonych przez bakterie z rodzaju *Azotobacter* (57). Uważa się, że polimer ma znaczenie jako swoista pompa związków redukujących powodując, w ścisłym związku z ciśnieniem parcjalnym tlenu, ich wiązanie (w procesie syntezy) lub uwalnianie (w czasie rozkładu) (58).

Wiele prac poświęcono znaczeniu PHB dla bakterii wiążących azot z powietrza. Synteza tego polimeru jest inicjowana w warunkach mikroaerofilowych w tym samym czasie, gdy nitrogenaza wykazuje wzrost swej aktywności. Utlenianie PHB chroni nitrogenazę przed szkodliwym wpływem tlenu w brodawkach korzeniowych. Polimer jest zatem czynnikiem regulującym aktywność tego enzymu, a jednocześnie stanowi materiał zapasowy dla komórek *Rhizobium* i innych bakterii korzeniowych w okresach, gdy wolno bytują w glebie (59,60,61).

Zlokalizowany w membranie cytoplazmatycznej bakterii, roślin i zwierząt, tzw. membranowy PHB jest ściśle powiązany z innymi makrocząsteczkami. Wynika to z budowy tej giętkiej, liniowej cząsteczki zawierającej dogodnie umieszczone, łatwo oddające elektrony, estrowe atomy tlenu (rys. 3). Z badań przeprowadzonych przez Reusch wynika, że PHB tworzy kompleksy z solami związków o spolimeryzowanych anionach oraz z lipidami i białkami. Zmienia w ten sposób ich właściwości, umożliwiając, np. przemieszczanie poprzez hydrofobowe przegrody w komórkach, czy zabezpieczając przed endogennym rozkładem enzymatycznym (62).



- * miejsce wiązania soli polimerów anionowych poprzez ich kationy oraz białek poprzez wiązania wodorowe
 \downarrow regiony hydrofobowe, poprzez które dokonywana jest kompleksacja z lipidami

Rys. 3. Membranowe PHB jako cząsteczka amfifilowa (62).

7. Metody analizy i wyodrębniania PHA

Pierwsze obserwacje ziaren polimerów w komórkach bakterii prowadzone były w zwykłym mikroskopie świetlnym. W mikroskopie kontrastowo-fazowym granule silnie załamują światło, co sprawia, że jeżeli są wystarczająco duże lub liczne, można je z łatwością zaobserwować. Obecność polimeru w komórkach bakterii kumulujących go w mniejszej ilości można wykazać stosując specjalne techniki barwienia. W jednej z najdawniej stosowanych metod barwienia, opisaną już w 1946 r. przez Burdona, wykorzystywane jest wybiórcze łączenie się PHB z barwnikiem tłuszczu — Sudanem Czarnym (63). Bezpośrednie barwienie nim kolonii wyrosłych na podłożu pozwala na szybkie wyodrębnienie tych, które gromadzą polimer (39). Znacznie większe niż Sudan Czarny powinowactwo i specyficzność wiązania z PHB ma jednak fluoryzujący oksazonowy barwnik — Błękit Nilu A. Dla obserwacji jasnopomarańczowej fluorescencji używa się mikroskopu z lampą emitującą światło o długości fali 460 nm (64,65). Barwienie Błękitem Nilu może być także wykorzystywane dla oznaczeń ilościowych (66).

Ilość PHA w hodowli można oznaczać poprzez pomiar wzrostu objętości i wyporności wypełniających się ziarnami polimeru komórek (28,30). Duże usługi dla celów biotechnologicznych oddaje cytometria przepływowa (67); stosowany też jest pomiar fluorescencji hodowli (68).

Isolacja natywnych granul z komórek bakterii dokonywana jest poprzez stosowanie łagodnych metod poprzedzonych enzymatycznym trawieniem ścian lub ich rozbijaniem ultradźwiękami. Następnie, stosowane jest preparatywne wirowanie, najczęściej w gradiencie glicerolu, sacharozy (69) lub też

bromku sodu (70). Metody te pozwalają uzyskać względnie nienaruszoną strukturę granul. Jest to szczególnie ważne w badaniach budowy ich powierzchni i związanych z nią enzymów (71).

Można także wmywać PHA z wysuszonych komórek, stosując ciągłą ekstrakcję, najczęściej chloroformem lub węglanem propylenu czy też innymi (58) w podwyższonej temperaturze, a następnie strącać polimer acetonem, eterem lub etanolem (72). W metodzie opisanej przez Williamsona i Wilkinsona (18) do komórek bakteryjnych (mokrej masy) dodaje się podchlorynu sodu, który rozpuszczając bakterie pozostawia względnie nienaruszone ziarna polimeru. Można je dzięki temu oddzielić od innych elementów komórek, przeszkadzających w oznaczeniach ilościowych. Ma to szczególne znaczenie, wówczas gdy w badanym materiale znajduje się mało polimeru. Dla badań skrininowych szczególnie warta polecenia jest mikrometoda opracowana przez Warda i Dawesa (73). Badane próbki, np. zawiesinę komórek, umieszcza się na filtrach z włókna szklanego. Na tym nośniku opracowuje się je, usuwając zanieczyszczenia i dopiero w ostatnim etapie ekstrahuje próbki do roztworu i oznacza.

PHB zawarte w próbkach może być ilościowo oznaczane przy użyciu szeroko rozpowszechnionej metody Lawa i Slepckiego (74), w której polimer jest przekształcany pod wpływem stężonego kwasu siarkowego w kwas krotonowy. Jego ilość określana jest spektrofotometrycznie przy 235 nm. Klasyyczna już metoda Lawa i Slepckiego została praktycznie wyparta przez liczne jej modyfikacje. Jedną z nich Brandl (75) proponuje jako metodę oznaczania z dużą czułością polimerów różnych hydroksykwasów o krótkim łańcuchu podstawowej jednostki (PHA_{SCD}). Inną modyfikację metody opisała Reusch (76). Wykorzystuje się w nich do analiz wysokociśnieniową chromatografię cieczową (HPLC).

PHB można oznaczać stosując spektroskopię w podczerwieni, poszukując w widmach roztworów chloroformowych tego związku charakterystycznego pasma przy długości fali 5,75 μm (77). Dużą popularność zyskały te metody, w których wykorzystuje się chromatografię gazową (GC). W metodzie opracowanej przez Braunegg i wsp. (78) próbki poddawane są kwaśnej lub zasadowej metanolizie, w wyniku której w chloroformowych ekstraktach można poszukiwać metylowych estrów hydroksykwasów budujących PHA. Metody, w których angażuje się chromatografię gazową połączoną ze spektroskopią masową (79) umożliwiają analizę składu polimerów rozmaitych hydroksykwasów (PHA) bezpośrednio poddanych pirolizie w wysokich temperaturach. PHB może też być wykrywane za pomocą technik immunologicznych, np. z użyciem testu ELISA i *dot-blott* na membranach nitrocelulozowych (76). Przy określaniu struktury PHA jest wyznaczana lepkość, skręcalność optyczna, a także jest wykonywana analiza ^1H NMR i ^{13}C NMR oraz pomiary z wykorzystaniem spektrometrii w podczerwieni z transformacją Fouriera (72).

8. Właściwości PHA

PHB wyizolowany z komórek ma strukturę krystaliczną. Do niedawna uważano, że taka sama jest jego natura *in vivo*. Obecnie jednak nie ulega już wątpliwości, że wewnątrz granul polimer jest ruchliwym, amorficznym elastomerem. Pierwsze badania fizykochemiczne takiego natywnego PHB przeprowadzili Barnard i Sanders w 1988 r. (9). Uzyskane z tych badań wyniki, miały, zdaniem autorów, służyć rozwiązywaniu problemów metabolizmu tego materiału zapasowego. Tymczasem, podjęte w ślad za odkryciem amorficznego PHB, uwieńczone sukcesem próby rekonstrukcji takich granul *in vitro*, znalazły ciekawe zastosowania (80).

Właściwości izolowanych z komórek polimerów hydroksykwasów były badane od co najmniej dwudziestu lat i to ze wzrastającą intensywnością. Kwas poli-3-hydroksymasłowy jest tworzywem o właściwościach zbliżonych do polipropylenu. Oba tworzywa mają podobną temperaturę topnienia (ok. 180°C), gęstość (1,250 i 0,905 g/cm³) i masę cząsteczkową (w przypadku PHB jest ona ściśle zależna od sposobu izolacji polimeru z komórek — przeciętnie nie przekracza 3x10⁵). PHB jest mniej niż polipropylen wrażliwy na działanie światła i promieniowania UV, jednak znacznie łatwiej poddaje się działaniu rozpuszczalników i jest prawie siedemdziesięciokrotnie bardziej kruchy i łamliwy. Mechaniczne właściwości polihydroksykwasów są ściśle zależne od składu polimeru, w szczególności zaś od długości łańcucha hydroksykwasu, a także ulegają znacznym zmianom w przypadku polimerów złożonych. Kopolimer 3HB-co-3HV ma, np. niższą niż PHB temperaturę topnienia (143°C) i charakteryzuje się sprężystością porównywalną z polipropylem. Kopolimer 3HB-co-4HV ma, z kolei, sprężystość gumy (81,82).

Właściwości polihydroksykwasów sprawiają, że tworzywa z nich zbudowane mają wiele zalet. Z punktu widzenia ekologii niewątpliwie najważniejsza jest ich nietoksyczność i biodegradowalność. Korzystnymi cechami tych polimerów są również: duża termoplastyczność, hydrofobowość, aktywność optyczna, biokompatybilność i właściwości piezoelektryczne.

9. Produkcja i zastosowania PHA

Przemysłowe wytwarzanie polimerów hydroksykwasów musi uwzględniać szereg aspektów. Na czoło wysuwa się oczywiście opłacalność takiej produkcji. Wytwarzanie na dużą skalę niebiodegradowalnych polimerów, takich jak polistyren czy polipropylen, jest znacznie tańsze i to decyduje, że właśnie one ciągle jeszcze dominują na rynku. Produkcja, na drodze chemicznej, opisanych tworzyw biodegradowalnych jest możliwa i wiele laboratoriów pracuje nad tym problemem (83). Obiecujące są próby syntezy tych związków poprzez chemiczną polimeryzację beta-butyrolaktonów, ale otrzymywane w ten sposób związki nie zawsze mają właściwości polimerów uzyskanych na drodze biosyntezy, a ponadto koszty produkcji chemicznej są wyższe (84,85).

Grupa Grossa z Uniwersytetu w Massachusetts pracuje nad możliwościami modelowania struktury PHA poprzez połączenie procesów chemicznych i biologicznych (86).

Wytwarzanie PHA na drodze biotechnologicznej wymaga rozwiązania kilku problemów. Najistotniejszym z nich, jest wybór najlepszego drobnoustroju-producenta, tak, aby koszty jego hodowli były jak najniższe, a otrzymany produkt czysty i o właściwych cechach fizycznych. Odpowiedni skład produktu zależy też w dużym stopniu od rodzaju substratu węglowego. Spośród wielu badanych bakterii najbardziej obiecujące dla celów przemysłowych były szczepy z rodzajów: *Alcaligenes*, *Azotobacter* oraz metylotrofy, a w dalszej kolejności *Pseudomonas*. Obecnie coraz częściej próbuje się wykorzystywać szczepy zmienione genetycznie (87). Kolejnym, niebagatelnym problemem technicznym jest sposób uwalniania z komórek i oczyszczania polimeru.

Pierwszym, i jak dotąd jedynym liczącym się producentem PHA na skalę przemysłową, jest koncern Zeneca Bio Products z Wielkiej Brytanii, dawny Imperial Chemical Industries — ICI (88). W koncernie tym wykorzystuje się do pracy szczep zdolnego do metabolizowania glukozy mutantu *Alcaligenes eutrophus* H16. Drobnoustroje te są hodowane na podłożu z glukozą i kwasem propionowym i przy ograniczonej ilości związków stanowiących źródło fosforu. W ponad 100-godzinny cykl fermentacyjny wytwarzają one kopolimer złożony z 3-hydroksymaślanu i 3-hydroksywalerianu — polimer o właściwościach mechanicznych bardzo zbliżonych do polipropylenu. Wydajność procesu biotechnologicznego przekracza 100 gramów suchej masy komórek na litr hodowli. 70-80% tej masy stanowi tworzywo uwalniane z komórek poprzez kombinację szoku termicznego oraz działania enzymów i detergentów. Docelowa wydajność produkcji poliestru ma osiągnąć 10 000 ton rocznie, a systematycznie obniżany koszt nie będzie przekraczać 5 USD za kilogram. Kopolimer ten jest sprzedawany pod handlową nazwą Biopol. Znalazł on zastosowanie do produkcji butelek i folii plastikowych o różnym przeznaczeniu. Inne zespoły badawcze, które odniosły sukcesy w produkcji PHA na skalę półprzemysłową przedstawiono w zestawieniu 2.

ZESTAWIENIE 2

NAJWAŻNIEJSZE OŚRODKI ZAJMUJĄCE SIĘ, OBOK ZENECA BIO PRODUCTS, ROZWOJEM PRZEMYSŁOWEJ PRODUKCJI PHA I ICH OSIĄGNIĘCIA (38)

Die Chiemie Linz — Austria

szczep: *Alcaligenes latus*

substrat: sacharoza

produkt: poli(3HB)

Grupa badawcza — Suzuki, Yamane, Shimizu — Japonia

szczep: *Pseudomonas* sp. K

substrat: metanol

produkt: poli(3HB)

wydajność: 230g s.m. komórek/l podłoża

Grupa badawcza — Steinbüchel — Niemcyszczep: *Chromobacterium violaceum*

substrat: kwas walerianowy

produkt: poli(3HV)

wydajność: 40g s.m. komórek/l, 70% polimeru w s.m.

Grupa badawcza — Preusting — Holandiaszczep: *Pseudomonas oleovorans*

substrat: oktan

produkt: poli(3HO) + ?

wydajność: 37g s.m. komórek/l; 37% polimeru w s.m.

Większość możliwości wykorzystywania polimerów hydroksykwasów jest weryfikowana w licznych eksperymentach laboratoryjnych, ale na rzeczywiście zastosowania trzeba będzie jeszcze poczekać. Tak jest, np. z właściwościami piezoelektrycznymi PHB czy też innych kopolimerów, które nie doczekały się jeszcze wykorzystania (89). Lista przedmiotów, które z powodzeniem próbowano wytwarzać z PHA jest bardzo długa. Obejmuje ona zarówno szeroką gamę opakowań, jak i rozmaite drobiazgi, które dzięki biodegradowalności zmniejszyłyby zaśmiecenie Ziemi (np. filtry do papierosów, lampki nagrobne czy tonery do kserokopiarek). Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem tych biopolimerów w medycynie (kapsułki do preparatów retard, nici chirurgiczne, sztuczne naczynia krwionośne, itp.), ale są to zaledwie plany lub w wąskim zakresie prowadzone badania wstępne. Bardzo szybko natomiast rozwijają się prace, w których wykorzystuje się opisaną amorficzną strukturę PHA wewnątrz natywnych granul. Okazało się, że przy zastosowaniu odpowiedniej obróbki termicznej można taki „naturalny” polimer (tzw. lateksowe PHA) nawarstwić na papier zamieniając go, w prosty i tani sposób, w nieprzepuszczalne dla wody tworzywo o znakomitych cechach biodegradowalności, znacznie lepszych niż przy zastosowaniu polimeru ekstrahowanego rozpuszczalnikami organicznymi. Pokryta błyszcząca, przejrzystą i doskonale przylegającą warstwą polimeru powierzchnia papieru zyskuje korzystne właściwości elektrostatyczne (90). Lateksowe PHA tworzy też znakomite mieszanki, np. ze skrobią, polistyrenem, naturalnym kauczukiem, itp. (91). Jedną z nowszych propozycji wykorzystania granul PHA jest użycie ich jako nośników dla substancji zapachowych w niskokalorycznej żywności (92).

10. Biodegradacja PHA

Rozkład granul polimerów zapasowych badano początkowo w aspekcie wykorzystywania ich przez komórki dla własnych potrzeb energetycznych. Najdawniejsze prace prowadzone przez zespół Merricka (93), Griebela (94) czy też Hippego (95), w których badano rozkład wyodrębnionych granul PHB,

doprowadziły do poznania głównych dla tych przemian enzymów i aktywatorów. W wyniku tych badań wysunięto pogląd, że aktywny system rozkładu polimeru w bakteriach nie idzie w parze ze zdolnością do syntezy PHA w dużych ilościach, a także wpływa na ograniczenie długości łańcucha polimeru. Te koncepcje zostały później potwierdzone i wspaniale udokumentowane w badaniach grupy Doi (96,97), w których pokazano, że procesy syntezy i degradacji PHA w spoczynkowych komórkach *Alcaligenes eutrophus* zachodzą równolegle. Badacze ci zauważyli także, że cząsteczki polimeru, które zostały zsyntezowane przez komórki korzystające z jednego substratu, mogą być rozkładane równolegle z syntezą polimeru z następnego substratu, podanego im w czasie hodowli.

W procesie rozkładu PHA podstawową rolę odgrywają zawsze depolimerazy. Enzym związany z powierzchnią granul, zarówno u *Alcaligenes eutrophus*, jak i u *Pseudomonas oleovorans* jest egzohydrolazą rozcinającą wiązania estrowe od karbonylowego końca łańcucha. Jest to esteraza serynowa z grupą hydroksylową ulokowaną w centrum aktywnym (32).

Wiele nowych pytań i sugestii w kwestii regulacji aktywności depolimerazy wewnątrzkomórkowej przyniosły badania grupy Steinbüchela nad mutantami *leaky* (98).

Innym enzymem uczestniczącym w wewnątrzkomórkowym rozkładzie PHB jest hydrolaza dimeru 3-hydroksymaślanu. Substrat dla jego aktywności nie pojawia się u *Alcaligenes eutrophus* (95), ale jest, obok monomeru, produktem działania depolimerazy *Bacillus megaterium* (99), *Rhodospirillum rubrum* (93), *Pseudomonas lemoignei* (100) czy *Zooglea ramigera* (101).

Trudne do wyjaśnienia mechanizmy wewnątrzkomórkowego rozkładu PHA zawartego w granulach wymagają jeszcze odpowiedzi na wiele pytań. Znacznie szybciej rozwijają się badania nad środowiskową degradacją polimerów, często w postaci prototypów przedmiotów, które mogą być z nich wytwarzane. Już wcześniej zauważono, że natywne granulki zawierające krystaliczny polimer reagują na działanie wewnątrzkomórkowych systemów degradujących, podczas gdy chemicznie czysty polimer w ogóle się im nie poddaje (91). Wiadomo jednakże, że wiele drobnoustrojów, zarówno bakterii, jak i grzybów wydziela do środowiska enzymy (o specyficzności esteraz) zdolne do depolimeryzacji takiego PHA. Szczegółowe badania przeprowadzono na szczepach *Alcaligenes faecalis* (102), *Pseudomonas lemoignei* (103), *Zooglea ramigera* (101) i bakteriach metanowych (104). Rozkład PHA w środowisku zachodzi także z udziałem bakterii beztlenowych: laseczek *Clostridium* (105) oraz *Ilyobacter delafieldi*. Te ostatnie mają zdolność rozkładu polimeru poprzez fermentację, prowadzącą do powstania octanu, maślanu i wodoru (106). Nie są zbyt zaawansowane szersze badania nad beztlenowym rozkładem polimerów. Wiadomo jednak, że rozkład w tych warunkach nie jest kompletny. Hydrolazy degradujące PHB, aktywne przy niskich wartościach pH, izolowano z grzybów pleśniowych (107). Stwierdzono, że wszystkie badane bakterie, które są zdolne do gromadzenia PHB, w ostatnim etapie rozkładu tego związku utleniają 3-hydroksymaślan do acetoctanu za pomocą zawartego w komórkach swoistego konstitutywnego enzymu: zależnej od NAD dehydroge-

nazy (51). Enzym ten wyizolowano i oczyszczono z ekstraktów bezkomórkowych wielu bakterii (60,108,109).

Aktywne procesy rozkładu egzogennego PHA przez wiele drobnoustrojów budzą optymizm i wiarę, że poliestry hydroksykwasów alkanowych spełnią nadzieje na zastosowanie ich jako biodegradowalnego tworzywa. Z przeprowadzonych badań wynika, że żyjące w środowisku drobnoustroje dysponują hydrolazami o różnorodnych specyficznościach, jak również, iż są one zdolne do atakowania polimerów o różnej wielkości cząsteczek, w odmiennych warunkach pH i natlenienia (110). Wiemy także, iż można kontrolować i intensyfikować rozkład PHA zachodzący w kompoście i ściekach komunalnych (111). Plany zastosowania PHA w medycynie do wytwarzania, takich produktów jak kapsułki dla preparatów *retard*, czy nici chirurgiczne, które ulegałyby rozkładowi wewnątrz organizmu, są bardziej odległe. *In vivo* ulegają bowiem biodegradacji tylko polimery zbudowane z czystego PHB, natomiast lepsze pod wieloma względami kopolimery nie ulegają rozkładowi (112). Mechanizmy degradacji PHB w organizmie nie są znane. Przymuszczalnie biorą w nim udział niespecyficzne esterazy, których aktywność jest regulowana procesami immunologicznymi.

Serdecznie dziękuję prof. dr. hab. med. Zbigniewowi Krzemińskiemu za materiały i sugestie, które zapoczątkowały powstanie tego artykułu.

Literatura

1. Brandl H., Bachofen R., Mayer J., Wintermantel E., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, suppl.1, 143-153.
2. Reusch R. N., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, suppl.1, 50-54.
3. Horowitz D. M., Sanders J. K. M., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, suppl.1, 115-123.
4. Lemoigne M., (1926), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, (Paris), 8, 770-782.
5. Schlegel H. G., Gottschalk G., von Bartha R., (1961), *Nature*, 191, 463-465.
6. Baptist J. N., (1962), U.S. Patent 3.036.959.
7. Wallen L. L., Rohwedder W. K., (1974), *Environ. Sci. Technol.*, 8, 576-579.
8. Slater S. C., Volge W. H., Dennis D. E., (1988), *J. Bacteriol.*, 170, 4431-4436.
9. Barnard G. N., Sanders J. K. M., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 3286-3291.
10. Nawrath Ch., Poirier Y., Somerville C., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12760-12764.
11. Stockdale H., Ribbons D. W., Dawes E. A., (1968), *J. Bacteriol.*, 95, 1798-1803.
12. Nanninga H. J., Gottschalk J. C., (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 802-908.
13. Haywood G. W., Anderson A. J., Chu L., Dawes E. A., (1988), *Biochem. Soc. Trans.*, 16, 1046-1047.
14. Stal L. J., (1992), *FEMS Microbiol.Rev.*, 103, 169-180.
15. Gaffron H., (1935), *Biochem. Zeitschrift*, 275, 301-319.
16. Steinbüchel A., (1991), *Polyhydroxyalkanoic acids*, in: *Biomaterials*, Ed. D. Byrom, Macmillan Publishers Ltd., Basingstoke, 123-213.
17. Lemoigne M., Delaporte B., Grosion M., (1944), *Annal. Inst. Pasteur*, 70, 224-233.
18. Williamson D. H., Wilkinson J. F., (1958), *J. Gen. Microbiol.*, 19, 198-209.
19. Nuti M. P., de Bertoldi M., Lepidi A. A., (1972), *A simple method of extraction of poly-β-hydroksybutyrate from aerobic and anaerobic soil bacteria*, Editrice Giardini, Pisa, 1-5.
20. Emeruwa A. C., (1981), *Ann. Microbiol.*, 132b, 13-21.
21. Tamura Y., Fujino T., Kondo M., Kotani S., (1968), *Biken J.*, 11, 225-234.

22. Timm A., Steinbüchel A., (1990), *Appl. Environ Microbiol.*, 56, 3360-3367.
23. Levine H. B., Wolochow H., (1960), *J. Bacteriol.*, 79, 305-306.
24. Chandler F. W., Blackmon, J. A., Hieklín M. D., Cole R. M., Callaway C. S., (1979), *Am. J. Clin. Pathol.*, 71, 43-50.
25. Szewczyk E. M., Mikucki J., (1989), *FEMS Microbiol. Lett.*, 61, 279-284.
26. Reusch R. N., Sadoff H. L., (1983), *J. Bacteriol.*, 156, 778-788.
27. Reusch R. N., (1989), *Proc. Soc. Ex. Biol. Med.*, 191, 377-381.
28. Pedros-Alio C., Mas J., Guerrero R., (1985), *Arch. Microbiol.*, 143, 178-184.
29. Dunlop W. F., Robards A.W., (1973), *J. Bacteriol.*, 114, 1271-1280.
30. Mas J., Pedros-Alio C., Guerrero R., (1985), *J. Bacteriol.*, 164, 749-756.
31. Stuard E. S., Lenz R. W., Fuller R. C., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, suppl. 1, 84-93.
32. Foster L. J. R., Lenz R. W., Fuller R. C., (1994), *FEMS Microbiol. Lett.*, 118, 279-282.
33. Steinbüchel A., Aerts K., Follner Ch., Liebergesell M., Madkour M. H., Mayer F., Pieper-Fürst U., Pries A., Valentin H. E., Wiczorek R., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, suppl.1, 94-105.
34. Doi Y., Tamaki A., Kunioka M., Soga K., (1987), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1635-1636.
35. Huisman G. J., de Leeuw O., Eggink G., Witholt B., (1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1949-1954.
36. Fritzsche K., Lenz R. W., Fuller R. C., (1990), *Int. J. Biol. Macromol.*, 12, 85-91.
37. Fritzsche K., Lenz R. W., Fuller R. C., (1990), *Int. J. Biol. Macromol.*, 12, 92-101.
38. Steinbüchel A., (1993), *CLB Chemie und Biotechnik*, 8, 378-384.
39. Schlegel H. G., Lafferty R., Krauss I., (1970), *Experientia*, 26, 554-555
40. Senior P. J., Dawes E. A., (1973), *Biochem. J.*, 134, 225-238.
41. Steinbüchel A., Schlegel H. G., (1991), *Mol. Microbiol.*, 5, 535-542.
42. Moskowitz G. J., Merrick J. M., (1969), *Biochemistry*, 8, 2748-2755.
43. Lageveen R. G., Huisman G. W., Preusting H., Ketelaar P., Eggink G., Witholt B., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2924-2932.
44. Doi Y., Kunioka M., Nakamura Y., Soga K., (1986), *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1696-1697.
45. Doi Y., Segawa A., Kunioka M., (1989), *Polym. Commun.*, 30, 169-171.
46. Doi Y., Tamaki M., Kunioka M., Soga K., (1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 330-334.
47. Gottschalk G., (1964), *Arch. Mikrobiol.*, 47, 230-235.
48. Brandl H., Gross R. A., Lenz R. W., Fuller R. C., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1977-1982.
49. Haywood G. W., Anderson A. J., Ewing D. F., Dawes E. A., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3354-3359.
50. Haywood G. W., Anderson A. J., Williams D. R., Dawes E. A., (1991), *Int. J. Biol. Mol.*, 13, 83-88.
51. Doudoroff M., (1966), *Metabolism of poly-β-hydroxybutyrate in bacteria*, in: *Current aspects of biochemical energetics*, Eds. N. O. Kaplan, E. P. Kennedy, Academic Press Inc., New York, 385-400.
52. Matin A., Veldhuis C., Stegeman V., Veenhuis M., (1979), *J. Gen. Microbiol.*, 112, 349-355.
53. Dawes E. A., (1985), *Starvation, survival and energy reserves*, in: *Bacteria in natural environments*, Eds. M. Fletcher, G. D. Floodgate, Academic Press — Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, 43-79.
54. Mikucki J., Surewicz K., Szewczyk E. M., (1989), *Acta. Microbiol. Pol.*, 38, 55-62.
55. Szewczyk E. M., (1992), *FEMS Microbiol. Rev.*, 103, 165-168.
56. Nakata H. M., (1966), *J. Bacteriol.*, 91, 784-788.
57. Sadoff H. L., (1975), *Bacteriol. Rev.*, 39, 516-539.
58. Lafferty R. M., Korsatko B., Korsatko W., (1988), *Microbial production of poly-β-hydroxybutyric acid*, in: *Biotechnology*, Eds. H. J. Rehm, G. Reed, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 135-176.
59. Senior P. J., Dawes E. A., (1971), *Biochem. J.*, 125, 55-66.

60. Karr D. B., Waters I. K., Suzuki F., Emerich D. W., (1984), *Plant Physiol.*, 75, 1158-1162.
61. Stam H., van Verweid H. W., de Vries W., Stouthamer A. H., (1986), *FEMS Microbiol. Lett.*, 35, 215-220.
62. Reusch R. N., (1992), *FEMS Microbiol. Rev.*, 103, 119-130.
63. Burdon K. L., (1946), *J. Bacteriol.*, 52, 665-678.
64. Ostle A. G., Holt J. G., (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 238-241.
65. Sackett D. L., Wolf J., (1987), *Anal. Biochem.*, 167, 228-234.
66. Greenspan P., Mayer E. P. Fowler S. D., (1985), *J. Cell Biology*, 100, 965-973.
67. Srien F., Arnold B., Bailey J. E., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 982-987.
68. Groom C. A., Luong J. H. T., Mulchandani A., (1988), *J. Biotechnol.*, 8, 271-278
69. Liebergesell M., Schmidt B., Steinbüchel A., (1992), *FEMS Microbiol. Lett.*, 99, 227-232.
70. Nickerson K. W., (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1208-1209.
71. Fukui T., Matsumoto M. A., Hosokawa S., Saito T., Nishikawa H., Tomita K., (1976), *Arch. Microbiol.*, 110, 149-156.
72. Anderson A. J., Dawes E. A., (1990), *Microbiol. Rev.*, 54, 450-472.
73. Ward A. C., Dawes E. A., (1973), *Anal. Biochem.*, 52, 607-613.
74. Law J. H., Slepecky R. A., (1961), *J. Bacteriol.*, 82, 33-42.
75. Brandl H., (1993), *Proc. Intern. Symp. on Bacterial Polyhydroxyalkanoates*, Eds. H. G. Schlegel, A. Steinbüchel, Goltze-Druck, Gottingen, 441.
76. Reusch R. N., Sparrow A. W., Gardiner J., (1992), *Biochim. Biophys. Acta*, 1123, 33-40.
77. Jüttner R. R., Lafferty R. M., Knackmuss H. J., (1975), *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 1, 233-237.
78. Braunegg G., Sonnleitner B., Lafferty R. M., (1978), *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 6, 29-37.
79. Helleur R. J., (1988), *Polym. Prepr.*, 29, 609-610.
80. Horowitz D. M., Sanders J. K. M., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41 suppl. 1, 115-123.
81. Owen A. J., (1985), *Colloid Polym. Sci.*, 263, 799-803.
82. Kunioka M., Kawaguchi Y., Doi Y., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 569-573.
83. Bloembergen S., Holden D. A., Marchessault R. H., (1988), *Polym. Prepr.*, 29, 594-595.
84. Lenz R. W., Yang J. P., Wu B., Harlan C. J., Barron A. R., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, suppl. 1, 274-281.
85. Hori Y., Takahashi Y., Yamaguchi A., Hagiwara T., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, suppl. 1, 282-288.
86. Gross R. A., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, suppl. 1, 32-43.
87. Lee S. Y., Yim K. S., Chang Y. K., (1994), *J. Biotechnol.*, 32, 203-211.
88. Byrom D., (1987), *Trends Biotechnol.*, 5, 246-250.
89. Fukada E., Ando Y., (1986), *Int. J. Biol. Macromol.*, 8, 361-366.
90. Marchessault R. H., Rioux P., Saracovan I., (1993), *Nordic Pulp and Paper Research J.*, 1, 211-216.
91. Lauzier C. A., Monasterios C. J., Saracovan I., Marchessault R. H., Ramsay B. A., (1993), *Tappi Journal*, 76, 71-76.
92. Yalpani M., (1994), *Proceedings of the Fourth International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates*, Montreal, 83.
93. Merrick J. M., Yu C. I., (1966), *Biochemistry*, 5, 3563-3568.
94. Griebel R., Smith Z., Merrick J. M., (1968), *Biochemistry*, 7, 3676-3681.
95. Hippe H., Schlegel H. G., (1967), *Arch. Mikrobiol.*, 56, 278-299.
96. Doi Y., Kawaguchi Y., Koyama N., Nakamura S., Haramitsu M., Yoshida Y., Kimura H., (1992), *FEMS Microbiol. Rev.*, 103, 103-108.
97. Kawaguchi Y., Doi Y., (1992), *Macromolecules*, 25, 2324-2329.
98. Pries A., Priefert H., Krüger N., Steinbüchel A., (1991), *J. Bacteriol.*, 173, 5843-5853.
99. Gavard R., Dahinger A., Hauttecoeur B., Reynaud C., (1967), *C. R. Acad. Sci.*, 265, 1557-1559.
100. Delafield F. P., Cooksey K. E., Doudoroff M., (1965) *J. Biol. Chem.*, 240, 4023-4028.

101. Tanaka Y., Saito T., Fukui T., Tanio T., Tomita K., (1981), *Eur. J. Biochem.*, 118, 177-182.
102. Tanio, T., Fukui T., Saito T., Tomita K., Kaiho T., Masamune S., (1982), *Eur. J. Biochem.*, 124, 71-77.
103. Müller B., Jendrossek D., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 487-492.
104. Budwill K. P., Fedorak M., Page W. J., (1992), *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 1398-1401.
105. Dörner C., Schink B., (1990), *Arch. Microbiol.*, 154, 342-348.
106. Jansen P. H., Harfoot C. G., (1990), *Arch. Microbiol.*, 154, 253-259.
107. McLellan D. W., Halling P. J., (1988), *FEMS Microbiol. Lett.*, 52, 215-218.
108. Bergmayer H. U., Gawehn K., Klotzsch H., Krebs H. A., Williamson D. H., (1967), *Biochem. J.*, 102, 423-431.
109. Szewczyk E.[M], Różalska M., (1994), *Acta Microbiol. Pol.*, 43, 33-45.
110. Schirmer A., Jendrossek D., Schlegel H. G., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1220-1227.
111. Briese B. H., Jendrossek D., Schlegel H. G., (1994), *FEMS Microbiol. Lett.*, 117, 107-112.
112. Holmes P. A., (1988), *Biologically produced (R)-3-hydroxyalkanoate polymers and copolymers*, in: *Developments of crystalline polymers*, Ed. D. C. Bassett, Elsevier Applied Science Publishers, London, 1-65.

Biodegradable polyesters — polyhydroxyalkanoic acids (PHA) — synthesized by microorganisms

Summary

Polyhydroxyalkanoic acids (PHAs) are insoluble in water, thermoplastic, biocompatible and biodegradable plastics. These polyesters are synthesized by a variety of microorganisms. Polymer cumulation in bacteria, metabolic pathways of PHA and their significance for living cells are discussed. Structure and biochemistry of bacterial PHAs, chemical composition and physical properties, methods of polymer detection and analysis are described. Polymer production for commercial use and possible applications of this natural plastic are discussed.

Key words:

biodegradable polyesters, natural thermoplastic plastics, microbial storage materials, polyhydroxyalkanoic acid.

Adres do korespondencji:

Eligia M. Szewczyk, Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej, Katedra Mikrobiologii, Akademia Medyczna, ul. Pomorska 137, 90-235 Łódź.