

Синтез и исследование сополимеров 3-гидроксибутирата/4-гидроксибутирата

Е. И. Шишацкая, Н. О. Жила, Е. Д. Николаева,
Д. А. Сырвачева, Э. Дж. Сински

Синтезировано семейство сополимеров 3-гидроксибутирата/4-гидроксибутирата [П(ЗГБ-со-4ГБ)] с содержанием 4-гидроксибутирата (4ГБ) в диапазоне 6 – 28 мол.%. Показано, что включение 4ГБ приводит к резкому снижению степени кристалличности и практически не влияет на температуру плавления полученных образцов. Установлено, что поверхность пленочных образцов, изготовленных из П(ЗГБ-со-4ГБ), особенно с содержанием 15 – 18 мол. % 4ГБ, пронизана множественными неоднородными порами, в отличие от гомополимера поли(3-гидроксибутирата). С увеличением содержания 4ГБ в сополимере происходит снижение значений модуля Юнга, но растет показатель удлинение при разрыве. Потенциальная цитотоксичность сополимеров исследована при прямом контакте с культурой фибробластов мыши NIH 3T3. Показано отсутствие негативного влияния пленочных образцов исследованных сополимеров на жизнеспособность фибробластов *in vitro* вне зависимости от соотношения мономеров.

Ключевые слова: полигидроксиалканоаты, сополимер 3-гидроксибутират/4-гидроксибутират, физико-химические и механические свойства, фибробласты, цитотоксичность

A family of 3-hydroxybutyrate/4-hydroxybutyrate copolymers with different molar fractions of 4-hydroxybutyrate (4HB), from 6 to 28 mol. %, has been synthesized. It has been shown that 4HB inclusion resulted in a dramatic decrease in crystallinity, but practically did not affect the melting temperature of the samples. The surface of membranes made from P(3HB-co-4HB), especially those with 4HB content of 15-18 mol.%, was penetrated by multiple heterogenous pores, in contrast to poly(3-hydroxybutyrate) homopolymer. The increase in 4HB content in copolymers resulted in a decrease in Young's modulus, but an increase in elongation to break. Potential cytotoxicity of copolymers was studied at direct contact with fibroblasts. MTT assay showed biological safety of all copolymers regardless of monomers ratio.

Key words: polyhydroxyalkanoates, 3-hydroxybutyrate/4-hydroxybutyrate copolymer, physical, chemical and mechanical properties, cytotoxicity

Введение

Полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоаты (ПГА)), синтезируемые природными и генетически модифицированными организмами, имеют различный химический состав, определяемый типом и соотношением входящих в их состав мономерных единиц. Свойства ПГА зависят от строения боковых групп в полимерной цепи, а также от расстояния между эфирными группами в молекуле. На базе ПГА имеется принципиальная возможность получения спектра материалов с различными физико-механическими свойствами, от высококристаллических термопластов до термоста-

бильных эластомеров [1, 2]. Наиболее изученный представитель семейства ПГА — гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ)) — высококристаллический (степень кристалличности — свыше 70%) термопласт. Недостаток этого типа ПГА — то, что он не кристаллизуется упорядоченно, его весьма сложно перерабатывать в изделия, которые характеризуются низкой ударной прочностью, жесткостью и “старятся” во времени [3]. Сополимеры 3-гидроксибутирата-со-3-гидроксибурата имеют пониженную кристалличность (50–60%), они более технологичны для переработки, но, аналогично ПЗГБ, не обладают эластичностью и медленно разрушаются *in vivo* [4].

Одним из перспективных, но мало изученным и трудно синтезируемым типом ПГА является сополимер 3-гидроксibuтирата/4-гидроксibuтирата (П(ЗГБ-со-4ГБ)), для которого характерны высокие скорости биодеградации *in vivo*; этот сополимер является эластомером, имеет более высокие показатели удлинения при разрыве и относительно высокий предел прочности на разрыв в отличие от большинства известных ПГА [5 – 7]. Соплимеры П(ЗГБ-со-4ГБ) способны синтезировать представители различных таксонов: *Ralstonia* [8], *Comamonas* [9], *Hydrogenophaga* [10], *Chromobacterium* [11], *Rhodococcus* [12] при росте на средах, содержащих 4-гидроксимасляную кислоту, γ -бутиролактон или 1,4-бутандиол в качестве предшественников 4ГБ. Однако ингибирующее воздействие этих субстратов отрицательно сказывается на общем урожае биомассы и выходах сополимера. Первый пример синтеза П(ЗГБ-со-4ГБ) в России представлен в [13], авторы которой разработали режимы выращивания нового продуцента различных ПГА, в том числе — *Cupriavidus eutrophus* В10646, обладающего толерантностью к γ -бутиролактону [14]. Биологические свойства сополимера П(ЗГБ-со-4ГБ) с содержанием 10,7 мол. % 4ГБ исследована в экспериментах *in vitro* [15].

Цель настоящей работы — получение и исследование сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ) с различным соотношением мономеров.

Объекты и методы исследования

В работе использовали штамм водородоксиляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* В10646, депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Бактерии культивировали в строго стерильных условиях в периодическом режиме в культиваторе BioFlo/CelliGen1 15 (“New Brunswick”, США) объемом 7,5 л. В качестве углеродных субстратов использовали CO_2 , фруктозу, масляную кислоту. Для стимулирования образования мономеров 4ГБ и синтеза сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ) в состав среды в качестве предшественника мономеров 4ГБ вносили γ -бутиролактон (“Fluka”, Германия).

Экстракцию полимера из бактериальной биомассы проводили хлороформом, осаждение экстрактов — гексаном. Состав ПГА определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра “Agilent Technologies” 7890А (США). Для корректного определения соотношения мономеров 3- и 4-гидроксibuтирата в сополимере, помимо регистрации масс-спектров, сняты ^1H -ЯМР спектры растворов сополимера в

CHCl_3 (ЯМР-спектрометр Avance III 600 “Bruker” (Германия)). Текущую концентрацию γ -бутиролактона в культуре анализировали хроматографически.

Исследованы физико-химические свойства гомогенных образцов сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ) различного состава. Рентгеноструктурный анализ и определение степени кристалличности образцов ПГА выполнены на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE “Bruker” (Германия) (графитовый монохроматор на отраженном пучке).

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии “Agilent Technologies” 1260 Infinity (США) относительно полистироловых стандартов (“Fluka”, Швейцария, Германия). Находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность ПД ($\text{ПД} = M_w/M_n$).

Комплексный термический анализ образцов полимера проведён с помощью синхронного термоанализатора STA 449 Jupiter фирмы “NETZSCH” (Германия), сочетающего одновременное определение изменений массы (термогравиметрия) и тепловых потоков (дифференциальная сканирующая калориметрия) и совмещённого с квадрупольным масс-спектрометром QMS 403 Aeolus для анализа газов, выделяющихся при нагревании образцов.

Из образцов сополимера различного состава получены пленочные образцы методом полива разогретого до 35°C 1,5 % раствора сополимера в дихлорметане на обезжиренную поверхность предварительно нагретых до такой же температуры чашек Петри. Стерилизацию пленок проводили H_2O_2 -плазмой в стерилизаторе Sterrad NX “Johnson&Johnson” (США); размещали в 24-луночных планшетах (Orange Scientific). В качестве контроля были использованы планшеты из полистирола.

Физико-механические характеристики пленочных образцов регистрировали с использованием универсальной электромеханической разрывной машины серии 5500 компании “Instron” (Великобритания) на основе методик испытаний на растяжение при 20°C и скорости испытания 3 мм/мин.

Микроструктуру поверхности пленок анализировали с применением растровой электронной микроскопии (РЭМ) (Phillips SEM 525 М). Свойства поверхности рассчитывали на базе измерения контактного краевого угла смачивания водой (θ , град.), используя известные уравнения Де Жена [16], находили свободную поверхностную энергию (γ_s), свободную энергию межфазовой поверхности (γ_{SL}) и величину сил сцепления (W_{SL} , эрг/см 2).

Для оценки адгезионных свойств поверхности полимерных образцов и их способности поддерживать рост клеток использована линия фибробластов мыши NIH 3T3, которыми засеивали мембраны $5 \cdot 10^3$ клеток/см², размещенные в 24-луночных планшетах. Культивирование фибробластов проводили по стандартной методике в среде DMEM, с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки — 10 %, раствора антибиотиков (стрептомицин 100 мкг/мл, пенициллин 100 ЕД/мл (Gibco, Invitrogen)) в CO₂-инкубаторе при 5 % атмосфере CO₂ при 37°C. Замену среды производили раз в три дня.

Анализ морфологии клеток и подсчет их количества в ходе культивирования выполнен через 1, 4 и 7 суток после засева клеток окрашиванием азури-эозином. Для этого пленочные образцы с прикрепленными клетками были промыты от питательной среды фосфатным буфером, зафиксированы раствором Май-Грюнвальда, снова промыты буферным раствором и окрашены красителем Романовского. Визуализацию и подсчет клеток проводили с помощью микроскопа Биолам П2-1 (ЛЮМО) при увеличении $\times 300$. Жизнеспособность культивируемых фибробластов NIH 3T3 изучали в реакции с МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромидом] (реактивы фирмы “Sigma”), основанной на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид до формазана, что характеризует активность митохондрий и количество живых клеток и косвенно отражает способность клеток к пролиферации на матриксах. Измерение содержания МТТ-формазана проведено при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad LABORATORIES Inc, США). Количество клеток оценивали по калибровочному графику.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические со стандартным отклонением. Достоверность

результатов определяли по критерию Стьюдента (уровень значимости $P = 0,05$).

Результаты и обсуждение

С использованием разработанных режимов культивирования штамма *Cupriavidus glutophus* В10646 в условиях автотрофного и гетеротрофного роста на средах, содержащих в качестве источника углерода различные субстраты: СО₂, фруктозу, масляную кислоту и γ -бутиролактон, синтезирована линейка сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ) с различным соотношением мономеров, от 6 до 28 мол. % 4ГБ.

Режим выращивания бактерий *Cupriavidus glutophus* В10646 в ферментере на среде, содержащей в качестве основного субстрата соли масляной кислоты (или фруктозу) и добавки γ -бутиролактона в различной концентрации (от 2,0 до 10,0 г/л), позволил реализовать процесс при общих выходах биомассы и сополимера за 29 – 32 ч культивирования, соответственно, до 25 – 32 г/л и 88 – 95 % и различным содержанием 4-ГБ. Получены высокоочищенные образцы и исследованы базовые физико-химические свойства.

Важнейшими характеристиками полимеров служат величина молекулярной массы и степень полимеризуемости. Реакции полимеризации приводят к образованию цепей в полимере разной длины, что влияет на величину молекулярной массы. ПД позволяет оценить, каково соотношение в образце фрагментов полимера с различной степенью полимеризуемости. Корректная регистрация данных параметров возможна только с применением гелепроникающей хроматографии, которая позволяет определить вес средней молекулярной массы полимера (M_w) и ПД материала.

С использованием гелепроникающей хроматографии исследована молекулярная масса серии синтезированных образцов сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ) (табл. 1). В исследованном диапазоне соотношения мономеров в сополимере (включение 4ГБ варьиро-

Таблица 1

Показатели молекулярной массы сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ), содержащих различное включение 4ГБ

Включение 4ГБ, мол. %	Среднечисловая молекулярная масса, M_n , кДа	Средневесовая молекулярная масса, M_w , кДа	Полидисперсность, ПД
6	140 ± 6,0	410 ± 15,4	2,93 ± 0,11
10	260 ± 3,6	810 ± 10,6	3,12 ± 0,08
12	450 ± 11,1	950 ± 17,9	2,11 ± 0,06
15	320 ± 4,6	840 ± 12,2	2,63 ± 0,05
18	350 ± 9,2	890 ± 18,2	2,54 ± 0,06
22	360 ± 17,2	820 ± 24,1	2,30 ± 0,07
28	270 ± 7,5	540 ± 9,9	2,0 ± 0,02

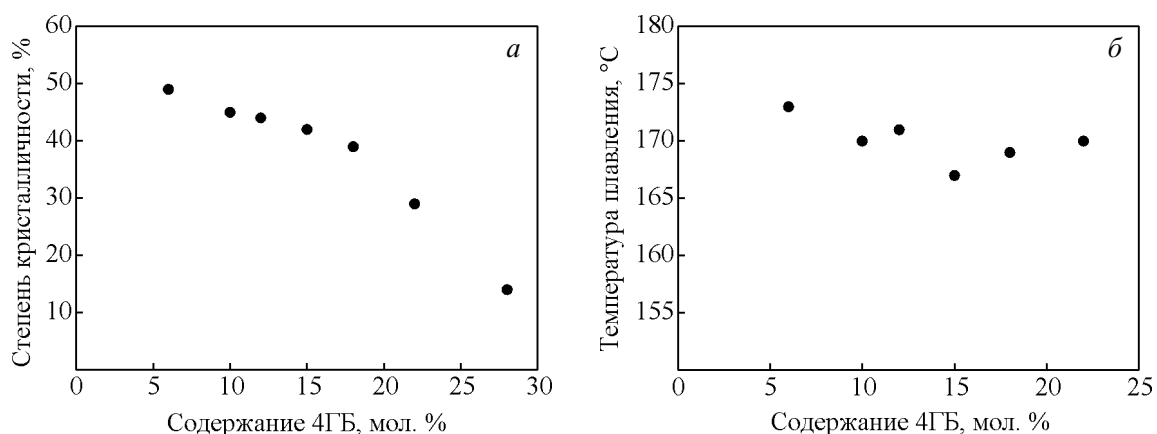


Рис. 1. Зависимость степени кристалличности (а) и температуры плавления (б) сополимеров П(3ГБ-со-4ГБ) от содержания 4ГБ.

вали от 6 до 28 мол.%) не обнаружено влияния этого параметра на величины M_v и ПД сополимера. Величина M_v у серии образцов изменялась в диапазоне 410–950 кДа; ПД — от 2,0 до 3,12 без четкой связи с содержанием 4ГБ. Это подтверждает ранее полученные результаты об отсутствии связи между составом ПГА и молекулярной массой [17].

Влияние соотношения 3ГБ и 4ГБ в сополимере на температурные свойства сополимера иллюстри-

рует рис. 1б, из которого следует, что температура плавления полученных образцов сополимера П(3ГБ-со-4ГБ) составляла 167–173°C. Показано отсутствие зависимости между содержанием 4ГБ в диапазоне 6–22 мол.% и температурой плавления.

Наибольшее влияние фракции 4ГБ обнаружено при проведении рентгеноструктурного анализа сополимеров. Включение 4ГБ резко, существенно в большей степени по сравнению с 3-гидроксибутира-

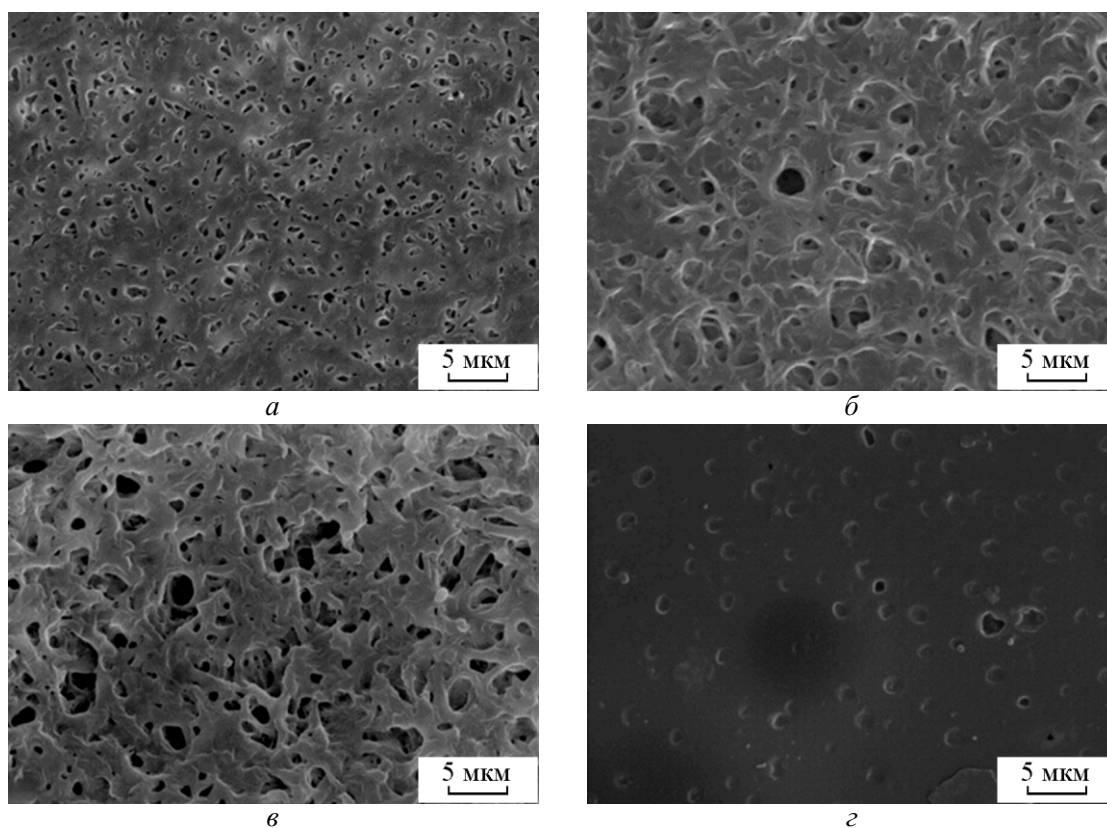


Рис. 2. РЭМ поверхности пленочных образцов, изготовленных из сополимеров П(3ГБ-со-4ГБ) с различным включением 4ГБ, мол.%. а – 10, б – 15, в – 18, г – 28.

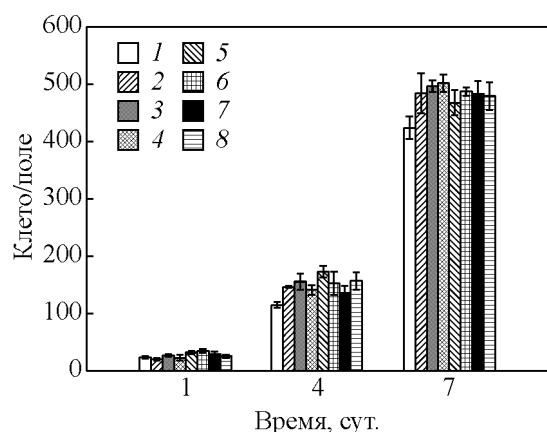


Рис. 3. Количество адгезированных клеток на поверхности пленок из сополимера П(ЗГБ-со-4ГБ) спустя 24 ч, 4 и 7 суток (1 – полистирол; 2 – 8 – П(ЗГБ-со-4ГБ) при разном содержании 4ГБ, мол.%; 2 – 6, 3 – 10; 4 – 12; 5 – 15; 6 – 18; 7 – 22; 8 – 28.

том и 3-гидроксигексаноатом, влияло на соотношение кристаллической и аморфной фаз в сополимере, значительно снижая кристалличность последнего (рис. 1а). Получены образцы ПГА, имеющие степень кристалличности ниже 50% (от 49 до 14%).

Таким образом, варьируя условия выращивания штамма *Cupriavidus eutrophus* В10646, возможно получение образцов П(ЗГБ-со-4ГБ) с различным соотношением мономеров ЗГБ и 4ГБ, существенно различающиеся степенью кристалличности.

Из охарактеризованных образцов П(ЗГБ-со-4ГБ) различного состава изготовлены пленочные образцы (рис. 2). На поверхности пленок из сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ) были видны множественные неоднородные поры размером от 1 до 4 мкм, в особенности, при содержании 4ГБ в сополимере 15 – 18 мол. % (рис. 2б, в).

Измерение величины контактного краевого угла смачивания водой, косвенно характеризующего гидрофильность поверхности материалов, показало, что наличие мономеров 4ГБ в сополимере приводит к снижению величины угла контактных краевых углов смачивания и свободной энергии межфазовой поверхности, и незначительному увеличению поверхностного натяжения (γ) и величины сил сцепления (W_{SL}), что говорит об увеличении степени гидрофильности поверхности пленочных образцов с увеличением содержания 4ГБ в сополимере (табл. 2).

Результаты исследования механических свойств пленок представлены в табл. 3. Из таблицы видно, что с увеличением содержания 4ГБ в сополимере происходит снижение значений модуля Юнга. Напротив, более высокое включение 4ГБ привело к увеличению показателя удлинение при разрыве более чем в 20 раз по сравнению с сополимером, содержащим 6 мол.% 4ГБ.

Подсчет фибробластов НИН ЗТЗ, окрашенных по Романовскому, адгезированных и растущих на исследуемых сополимерных пленках на всех сроках наблюдения не выявил достоверных различий по сравнению с контрольным полистиролом (рис. 3) Через 24 ч после засева количество клеток (в поле зрения) на пленках из сополимеров с различным соотношением мономеров ЗГБ и 4ГБ составило: $n = 18,4 - 32,4$, а на полистироле — $n = 22,3$. Через 4 суток количество клеток на экспериментальных пленках было более равномерным и лежало в

Таблица 2

Свойства поверхности пленочных образцов из П(ЗГБ-со-4ГБ) с различным содержанием 4ГБ

№	Содержание 4ГБ, мол. %	Контактный угол смачивания, θ , град	Поверхностное натяжение, γ , эрг/см ²	Свободная энергия межфазовой поверхности, γ_{SL} , эрг/см ²	Величина сил сцепления, W_{SL} , эрг/см ²
1	6	67,86 ± 1,10	34,50 ± 0,89	7,56 ± 0,80	100,22 ± 1,29
2	10	65,30 ± 1,78	36,59 ± 1,42	6,21 ± 0,49	103,19 ± 2,09
3	12	57,40 ± 0,61	43,10 ± 0,71	3,90 ± 0,34	112,01 ± 0,93
4	15	66,07 ± 1,02	35,96 ± 0,84	6,44 ± 0,53	102,32 ± 1,28
5	18	54,01 ± 4,36	45,81 ± 0,98	3,27 ± 0,28	115,34 ± 1,27
6	22	58,64 ± 1,92	42,07 ± 2,02	4,23 ± 0,15	110,64 ± 2,77
7	28	53,66 ± 1,5	46,16 ± 0,63	3,04 ± 0,29	115,92 ± 0,78

Таблица 3

Механические свойства пленочных образцов толщиной 0,03 мм, полученных из сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ)

Содержание 4ГБ, мол. %	Модуль Юнга, МПа	Прочность на разрыв, МПа	Удлинение при разрыве, %	Максимальное удлинение, %
6	410 ± 63	9,15 ± 1,07	8 ± 3	11 ± 3
10	120 ± 41	4,88 ± 0,43	14 ± 3	19 ± 4
18	107 ± 36	7,63 ± 1,65	26 ± 6	38 ± 8
28	11 ± 2	7,19 ± 2,13	188 ± 3	520 ± 15

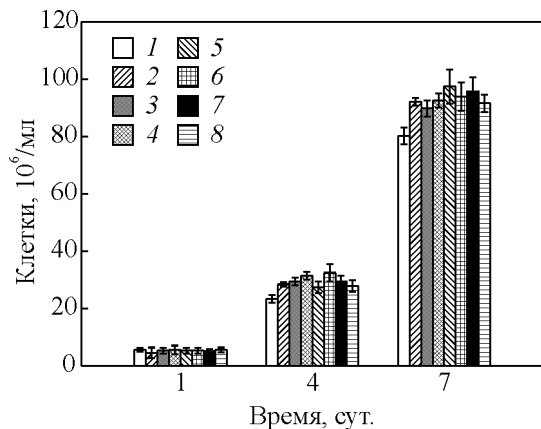


Рис. 4. Количество жизнеспособных клеток, культивируемых на пленках из П(ЗГБ-со-4ГБ) спустя 24 ч, 4 и 7 суток по результатам МТТ-теста (нумерация аналогично рис. 3).

диапазоне $n = 134,5 - 172,2$, в контроле — $n = 148,2$. Спустя 7 суток количество клеток на сополимерных пленках было на уровне $n = 467,0 - 501,2$; в контроле $n = 479,5$. Таким образом, пленки из всех исследованных типов сополимера П(ЗГБ-со-4ГБ) при прямом контакте с фибробластами мыши линии NIH 3T3 не оказывали негативного влияния на их адгезию и рост, по способности поддерживать адгезию и пролиферацию клеток сопоставимы с полистиролом. Следует отметить, что прикрепленные клетки на всех исследуемых пленках были хорошо распластаны, в основном имели звездчатую форму; то есть были в активном состоянии.

Отсутствие негативного влияния на клетки со стороны пленочных образцов сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ) свидетельствуют также результаты МТТ-теста (рис. 4). Через 24 ч после засева количество клеток было одинаковым на всех экспериментальных образцах пленок ($n = (4,2 - 5,21) \cdot 10^6$ клеток/мл). Через 4 суток количество клеток на сополимерных пленках всех типов было сопоставимым ($n = (27,0 - 32,0) \cdot 10^6$ клеток/мл), а в контроле несколько выше — $n = 35,4 \cdot 10^6$ клеток/мл. Через 7 суток количество клеток на экспериментальных пленках с различным включением 4ГБ (6, 10, 12, 15, 18, 22 и 28 мол. %) было сопоставимо с контролем и составляло, соответственно, $n = 92 \cdot 10^6$, $89,5 \cdot 10^6$, $92,4 \cdot 10^6$, $97,1 \cdot 10^6$, $93,7 \cdot 10^6$, $95,6 \cdot 10^6$ и $91,7 \cdot 10^6$ клеток/мл; в контроле на полистироле — $n = 93,1 \cdot 10^6$ клеток/мл.

Выводы

1. С использованием штамма водородоксилирующих бактерий *Cupriavidus eutrophus* B-10646 получена серия образцов сополимера П(ЗГБ-со-4ГБ) с содержанием 4ГБ от 6 до 28 мол. %.

2. Включение 4ГБ до 28 мол. % приводит к резкому снижению степени кристалличности до 14%, однако не влияет на температуру плавления. Средневесовая молекулярная масса изученных образцов сополимеров не зависит от соотношения мономеров и находится в широких пределах 410 – 950 кДа.

3. Пленочные образцы, полученные из исследованных типов П(ЗГБ-со-4ГБ), характеризуются различной структурой поверхности. Увеличение содержания 4ГБ приводит к снижению угла контактных краевых углов смачивания, что говорит об увеличении степени гидрофильности поверхности.

4. С увеличением содержания 4ГБ в сополимере происходит снижение модуля Юнга пленок и увеличение показателя удлинения на разрыв, что свидетельствует о возрастании эластичности сополимера с увеличением фракции 4ГБ.

5. В культуре фибробластов мыши NIH 3T3 по результатам окрашивания и МТТ-теста доказано отсутствие негативного влияния всех исследованных типов П(ЗГБ-со-4ГБ). По адгезивным свойствам и способности поддерживать рост клеток образцы сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ) сопоставимы с материалом культуральных планшет — специально обработанным полистиролом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, Постановление Правительства РФ №220 (проект “Биотехнологии новых биоматериалов”) и гранта президента Российской Федерации для поддержки молодых докторов наук MD-3112.2012.4.

Литература

1. Sudesh K., Abe H., Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog. Polym. Sci., 2000, v. 25, p. 1503 – 1555.
2. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение. Красноярск: Издательство “Красноярский писатель”, 2011, 393 с.
3. Philip S., Keshavarz T., Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. J. Chem. Technol. Biotechnol., 2007, v. 82, p. 233 – 247.
4. Kim Y.B., Lenz R.W. Polyesters from microorganisms. Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., 2001, v. 71, p. 51 – 79.
5. Martin D.P., Williams S.F. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. Biochem. Eng. J., 2003, v. 16, p. 97 – 105.
6. Freier T. Biopolyesters in tissue engineering applications. Adv. Polym. Sci., 2006, v. 203, p. 1 – 61.

7. Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.*, 2010, v. 110, p. 621 – 632.
8. Nakamura S., Doi Y., Scandola M. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules*, 1992, v. 25, p. 4237 – 4241.
9. Renner G., Pongratz K., Braunegg G. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Cotamonas testosteronii*. *Food Technol. Biotechnol.*, 1996, v. 34, p. 91 – 95.
10. Choi M.H., Yoon S.C., Lenz R.W. Production of poly(3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly(4-hydroxybutyric acid) without subsequent degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, v. 65, p. 1570 – 1577.
11. Kimura H., Iwama M., Sasaki S., Takeishi M. Production of polyester blend of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxyalkanoate) with saturated and unsaturated monomers from 4-hydroxybutyric acid by *Chromobacterium sp.* *Chem. Lett.*, 1999, v. 28, p. 737 – 738.
12. Haywood G.W., Anderson A.J., Williams D.R., Dawes E.A., Ewing D.F. Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus sp.* NCIMB 40126. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1991, v. 13, p. 83 – 88.
13. Волова Т.Г., Жила Н.О., Калачева Г.С., Соколенко В.А., Сински Э.Дж. Синтез сополимеров 3-гидроксибутирата-со-4-гидроксибутирата водородокисляющими бактериями. *Прикладная биохимия и микробиология*, 2011, т.47, с. 544 – 550.
14. Волова Т.Г., Шишацкая Е.И. Штамм бактерий *Cupriavidus eutrophus* ВКПМ В-10646 — продуцент полигидроксиалканоатов и способ их получения. Патент РФ. №2439143 от 15.11.2010.
15. Николаева Е. Д., Шишацкая Е.И., Мочалов К.Е., Волова Т.Г., Сински Э. Дж. Сравнительное исследование клеточных носителей, полученных из резорбируемых полигидроксиалканоатов различного химического состава. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*, 2011, т. 6, с. 54 – 63.
16. Де Жен П.Ж. Смачивание: Статистика и динамика. *Успехи физических наук*, 1987, т. 151, с. 619 – 681.
17. Волова Т.Г., Калачева Г.С. Синтез сополимеров гидроксibuтирата и гидроксивалерата [поли(3ГБ/3ГВ)] бактериями *Ralstonia eutropha*. *Микробиология*, 2005, т. 74, с. 63 – 69.

Статья поступила в редакцию 27.02.2012 г.

Шишацкая Екатерина Игоревна — Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник. Сибирский федеральный университет, заведующая кафедрой, профессор. Специалист в области материаловедения и биомедицины. E-mail: shishatskaya@inbox.ru.

Жила Наталья Олеговна — Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, кандидат биологических наук, научный сотрудник. Сибирский федеральный университет, доцент. Специалист в области структуры и свойств полимеров, синтеза полигидроксиалканоатов. E-mail: nzhila@mail.ru.

Николаева Елена Дмитриевна — Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, кандидат биологических наук, инженер. Специалист в области культивирования клеток.

Сырвачева Дарья Анатольевна — Сибирский федеральный университет, аспирант. Специализируется в области физико-механических свойств полигидроксиалканоатов.

Сински Энтони Джон — Массачусетский технологический институт, Кембридж, Массачусетс, США, профессор. Специалист в области материаловедения и биомедицины.