

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова

« 18 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Синтез и свойства полимеров, содержащих 4-гидроксипутират.

Руководитель _____18.06.2018

д.б.н. Н. О. Жила

Выпускник _____18.06.2018

В. С. Безбидо

Красноярск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1 Обзор литературы	5
1.1 Характеристика ПГА	5
1.2 Биосинтез ПГА	6
1.3 Мономерные звенья в полимерах.....	6
1.3.1 3ГБ мономер.....	7
1.3.2 4ГБ мономер.....	7
1.4 Сополимер П(3ГБ-со-4ГБ)	8
1.5 Получение сополимера П(3ГБ-со-4ГБ).....	9
1.5.1 Использование разных предшественников	9
1.5.2 Использование смеси субстратов.....	10
1.5.3 Использование мутантных штаммов.....	12
1.6 Синтез и свойства П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГБ)	13
2 Материалы и методы	15
2.1 Культивирование бактерий.....	15
2.2 Измерение параметров процессов.....	15
2.3 Определение содержания ϵ -капролактона в среде	15
2.4 Анализ структуры ПГА	16
2.5 Анализ молекулярного веса ПГА	16
2.6 Изготовление плёнок.....	16
2.7 Определение поверхностных свойств плёнок.....	16
2.8 Определение температурных характеристик полимера.....	17
3 Результаты и обсуждения.....	18
4 Выводы	28
5 Список используемых источников.....	29

ВВЕДЕНИЕ

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – термопластические полиэфиры, синтезируемые различными бактериями в качестве внутриклеточного запасного материала в условиях лимитирования роста питательными элементами (например, азотом, фосфором) и при избыточном содержании источника углерода. В последние годы изучению ПГА уделяется огромное внимание благодаря их потенциальному применению в различных областях – медицине, фармакологии, сельском и коммунальном хозяйстве, пищевой и косметической промышленности, радиоэлектронике и других сферах, так как по сравнению с обычными пластиками, получаемыми из нефти, ПГА разрушаются в аэробных/анаэробных условиях и являются биосовместимыми материалами.

Наиболее изученным является поли-3-гидроксibuтират, но помимо ПЗГБ, перспективны также и сополимерные ПГА, которые в зависимости от набора и соотношения мономеров имеют различные базовые свойства (степень кристалличности, температуры плавления и термической дегградации, пластичность, механическую прочность и др.).

Наиболее распространенный мономер, полимеризующийся большинством ПГА-синтаз, является 3-гидроксимасляная кислота (ЗГБ). Однако в результате, ПЗГБ гомополимер имеет ограничения из-за жестких и хрупких свойств. Поэтому исследователи сосредоточили внимание на изучении ПГА сополимеров, содержащих такие мономеры, как 4-гидроксibuтират (4ГБ), для создания различных типов ПГА с разными физико-химическими свойствами и широкими возможностями применения.

Различные виды ПГА могут быть произведены при включении различных мономерных единиц, и это зависит от используемого субстрата. От выбора предшественника зависит не только выход мономеров в полимере, но и зачастую накопление биомассы. В данной работе был впервые использован в качестве предшественника 4ГБ ϵ -капролактон.

Сополимер П(ЗГБ-со-4ГБ) является одним из биополимеров, который был признан многообещающим биоматериалом в медицине и фармацевтической промышленности. Это объясняется главным образом присутствием 4-гидроксibuтирата (4ГБ) мономера, поскольку данный мономер не вызывает воспалительных реакций в тканях и способен повысить общую биосовместимость этих сополимеров.

Цель работы: Исследование роста бактерий *Cupriavidus eutrophus* В-10646 и синтез полимера, содержащего 4-гидроксibuтират.

Задачи:

1. Исследовать накопление биомассы и полимера бактериями *C. eutrophus* В-10646 в присутствии различных концентраций ϵ -капролактона, как субстрата для синтеза мономеров 4-гидроксibuтирата.

2. Исследовать накопление биомассы и полимера бактериями *C. eutrophus* В-10646 в присутствии валерата калия, как субстрата для синтеза мономеров 3-гидроксивалерата.

3. Изучить свойства двухкомпонентных поли(3-гидроксибутират/4-гидроксибутират) и трехкомпонентных поли(3-гидроксибутират/3-гидроксивалерат/4гидроксибутират) при росте на ϵ -капролактоне и валерате калия.

1 Обзор литературы

1.1 Характеристика ПГА

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это линейные полиэфиры, синтезируемые прокариотическими микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста. Совокупность свойств, характерных для ПГА, делает их перспективными для применения в различных сферах – медицине, фармакологии, пищевой и косметической промышленности, сельском и коммунальном хозяйстве, радиоэлектронике и т.д. [1].

ПГА являются резервными макромолекулами клетки и синтезируются прокариотами в специфических условиях, при избытке углерода в среде, когда синтез основных соединений (белка и нуклеиновых кислот) ограничен.

ПГА ассоциируются в клеточной цитоплазме в виде сферических включений (гранул), количество которых в клетке и их размеры могут существенно варьировать в зависимости от условий роста микроорганизмов и его систематической принадлежности. Гранулы заключены в мембрану толщиной 2-4 мкм и на 98% состоят из полимера [2, 3].

Основными возобновляемыми источниками углерода для синтеза ПГА могут быть:

- сахара (глюкоза, фруктоза);
- органические кислоты;
- спирты;
- смеси CO_2 и H_2 ;
- продукты гидролиза растительного сырья;
- промышленные отходы производства сахара;
- различные масла (оливковое, кукурузное, соевое, рапсовое, пальмовое, подсолнечное);
- водородсодержащие продукты переработки бурых углей и гидролизного лигнина.

В зависимости от специфики штамма-продуцента, условий культивирования и типа используемого субстрата возможен синтез ПГА различного строения. К настоящему времени известно более 150 различных по структуре мономеров, входящих в состав ПГА. Этому направлению исследований уделяется большое внимание в связи с тем, что даже при незначительном изменении соотношения мономерных единиц в ПГА могут принципиальным образом изменяться их свойства, в том числе термомеханические, что является важным для практики.

В целом, исходя из длины углеродной цепи гидроксикислот, образующих полимеры той или иной структуры, ПГА подразделяют на три основные группы:

- 1) короткоцепочечные – ПГА_{кц} (shot-chain-length, SCL), состоящих из кислот с длинной углеродной цепи от 3-х до 5-ти углеродных атомов;

2) среднецепочечные – ПГА_{СЦ} (medium-chain-length, MCL), в составе которых от 6 до 14 атомов углерода;

3) длинноцепочечные – ПГА_{ДЦ} (long-chain-length, LCL) с содержанием кислот C₁₇ и C₁₈.

ПГА выполняют ключевые функции в защите клеток от окружающих стрессовых условий таких, как экстремальная температура, воздействие оксидантов, органические растворители и УФ-радиация. Изменение состава ПГА на уровне мономеров делает возможным тонкую настройку свойств полимера (температура плавления, температура стеклования, степень кристалличности, разрушаемость, эластичность или предел прочности) согласно требованиям [3].

1.2 Биосинтез ПГА

Внутриклеточный метаболизм ПГА носит циклический характер, и в клетке одновременно, но с разными скоростями, происходят процессы синтеза и разрушения полимера [1].

В биосинтезе ПГА участвуют три фермента – β-кетотиолаза (КТ), ацетоацетил-КоА-редуктаза (АА-КоА-редуктаза) и ПГА-синтаза, которые кодируются генами *phbA*, *phbB*, *phbC*, соответственно, образуя один оперон, *phbCAB*. Активность β-кетотиолазы в бактериях, выращенных в условиях лимитирования роста азотом или углеродом, одинакова, что позволило авторам сделать вывод о конститутивном характере синтеза этого фермента [1].

ПГА-синтаза является ключевым и наиболее изученным ферментом биосинтеза полимера, определяющая тип ПГА. В настоящее время описано более 50 структурных генов синтаз, выделенных из разных микроорганизмов. Все ПГА-синтазы различаются субстратной специфичностью и первичной структурой.

В клетке ПГА-синтаза находится в двух формах – растворимой и связанной с гранулами полимера. Ряд данных свидетельствуют о конститутивном синтезе ПГА-синтазы. В условия лимита по углероду *Ralstonia eutropha* синтезирует преимущественно растворимую форму фермента, при переносе культуры в условия лимита по азоту активность растворимой ПГА-синтазы резко падает и в клетках в основном определяют гранулозависимую форму фермента. При этом суммарная активность фермента остается на одном и том же уровне [4].

1.3 Мономерные звенья в полимерах

В зависимости от набора мономеров, образующих полимеры, ПГА классифицируют как гомополимеры, если в полимере представлен только один тип мономера, и гетерополимеры, если они построены из различных мономеров. Многих характеристики ПГА, включая физические и химические свойства, зависят от молярного содержания мономеров в полимере [1,5].

1.3.1 3ГБ мономер

Доминирующим мономером в ПГА, синтезируемых природными штаммами *R. eutropha*, является короткоцепочечный 3-гидроксibuтират, выходы которого могут достигать в специализированных режимах до 80–90% от веса сухой биомассы. Для промышленного применения было выделено несколько высокопродуктивных и перспективных микроорганизмов, эффективно синтезирующих ПЗГБ: *R. eutropha* (ранее *Alcaligenes eutrophus*), *Alcaligenes latus*, азотфиксаторы *Azotobacter vinelandii*, псевдомонады *Pseudomonas oleovorans*, *Comamonas testosteronii*, *Chromobacterium sp.*, *Rhodococcus ruber*. Очищенные образцы ПЗГБ обладают высокой степенью биосовместимости, которая связана с тем, что мономер, образующий этот полимер – 3-гидроксимасляная кислота – это естественный метаболит клеток и тканей организма [6].

Однако, хрупкость и высокая кристалличность полимеров, содержащих 3ГБ, ограничивает их использование в медицинской и фармацевтической промышленности.

ПЗГБ обладают следующими свойствами (по Виноградова, 2015):

Температура плавления ($T_{пл}$) – 178°C;

Температура термической деградации ($T_{дегр}$) – 295°C;

Степень кристалличности (C_x) – 76%;

Средневесовая молекулярная масса (M_v) – 920 кДа;

Полидисперсность (ПД) – 2,52;

Напряжение при разрыве (σ) – 16,7 МПа [7].

1.3.2 4ГБ мономер

Наличие 4ГБ в сополимере снижает кристалличность и, как правило, обеспечивает гибкие и эластичные свойства. Химическая структура П(4ГБ) похожа на нынешние рассасывающиеся полиэфирные, используемые в имплантируемых медицинских изделиях [8,9,10].

Способность *R. eutropha* и *A. latus* аккумулировать ПГА, содержащих 4ГБ мономеры, была впервые обнаружена Дои и сотрудниками [5]. Мономер 4-гидроксibuтирата структурно отличается от мономера 3-гидроксibuтирата и характеризуется отсутствием в боковой цепи алкильной группы, прикрепленной к полимерной основе. Согласно Williams и Martin, у П(4ГБ) сложноэфирные группы находятся на большом расстоянии, по сравнению с П(3ГБ), в полимерной основе. Это сильно смещает свойства полимеров от хрупких и кристаллических П(3ГБ) к высокопластичным и гибким П(4ГБ). Благодаря этому, внедрение мономеров 4-гидроксibuтирата формирует П(3ГБ-со-4ГБ) с различной молярной фракцией, которая, в результате, приводит к формированию группы материалов с различной механической прочностью и свойствами [11].

Это обусловлено применением полимеров, содержащих 4ГБ мономер, в медицинской и фармацевтической промышленности в качестве ранозаживляющего материала, оболочки лекарств, имплантации и тканевой инженерии [11,12].

Основными продуцентами 4ГБ являются *Cupriavidus sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Comamonas sp.*, *Hydrogenophaga sp.*, *Chromobacterium sp.*, *Burkholderia sp.* [13,14]. Однако, Lee-Mei Ng и Kumar Sudesh (2016) впервые использовали в качестве продуцента *Aquitalea sp.* USM4, изолированного из пресной воды в водопаде Лата Искандар, Перак. Результаты биосинтеза ПГА показали, что мочевины является наилучшим источником азота, благодаря чему *Aquitalea sp.* USM4 накопила до 55% ПГА, когда 10 г/л сахарозы и 0,3 г/л мочевины были использованы в качестве источников углерода и азота, соответственно. Добавление производных источников углерода обычно проводится в целях определения способности нового штамма синтезировать различные типы ПГА. Результаты показали, что 3-гидроксивалерат(3ГВ), 3-гидрокси-4-метилвалерат и 4-гидроксibuтират (4ГБ) мономеры были успешно включены. Содержание 4ГБ мономера составило 21% [15].

1.4 Сополимер П(3ГБ-со-4ГБ)

Сополимер П(3ГБ-со-4ГБ) – короткоцепочечный ПГА, произведенный под действием ПГА-синтазы, которая полимеризует метаболически произведенные мономеры 3-гидроксibuтирата и 4-гидроксibuтирата [26]. Для этого типа ПГА характерны высокие скорости биодegradации *in vivo* и в окружающей среде, он является эластомером, имеет более высокие показатели удлинения при разрыве и относительно высокий предел прочности на разрыв в отличие от большинства общеизвестных полимеров этого класса [10,11,17].

Мономеры 4-гидроксibuтирата внедряются путем добавления источников углерода в питательную среду, которая включает: γ -бутиролактон, 4-гидроксibuтират, соль 4-гидроксibuтирата, 1,4-бутиролактон, 1,4-бутандиол, 1,6-гександиол, 1,8-октандиол, 1,10-декандиол и 1,12-додекандиол. Однако, эти источники углерода не полностью метаболизируются для формирования гомополимера, 4-гидроксibuтират может быть катализирован в 3-гидроксibuтирил-СоА. Это способствует включению со-мономеров 3-гидроксibuтирата, в результате, формируется сополимер П(3ГБ-со-4ГБ). П(3ГБ-со-4ГБ) привлекает внимание, как биосовместимый и разлагающийся материал [11,16].

П(3ГБ-со-4ГБ) достигает высокого уровня биосовместимости, потому что мономеры 4-гидроксibuтирата являются естественным веществом организма млекопитающих. Они найдены в мозге, почках, сердце, печени, легких и мышцах. Более того, включение единиц 4-гидроксibuтирата в поли(3-гидроксibuтират) ведет к улучшению физических и термических свойств ПГА [10,18].

1.5 Получение сополимера П(ЗГБ-со-4ГБ)

Способность микроорганизмов синтезировать этот тип ПГА при росте на средах, содержащих в качестве углеродного субстрата 4-гидроксимасляную кислоту, γ -бутиролактон или 1,4-бутандиол, показана в серии работ еще в 90-е годы прошлого века. Однако ингибирующее воздействие этих субстратов отрицательно сказывается на общем урожае биомассы и выходах сополимера. В последние годы изучение этого представителя ПГА активизировалось [19].

Из изученной мной литературы наибольший выход 4ГБ мономера (35-40%) удалось получить Huong и соавт. (2015). В качестве предшественника 4ГБ мономера бала использована смесь, состоящая из 1,4-бутандиола и 1,6-гександиола в соотношении 3:1. Общее содержание ПГА и биомассы составило 73% и 6,1г/л соответственно [13].

1.5.1 Использование разных предшественников

Tran Huu Phong и Doan Van Thuoc (2016) впервые доказали способность синтезировать сополимер П (ЗГБ-со-4ГБ) галофильными бактериями *Yangia sp.* ND199. Максимальная фракция 4ГБ (7,1%) была получена при 0,5 г/л бутиролактона; 5,7% в присутствии 1, 4-бутандиола и 4,0% при содержании 4-гидроксибутирата натрия. Напротив, самый высокий сухой вес 2,47 г/л и содержание П(ЗГБ-со-4ГБ) в 55,2%, были получены в присутствии 4-гидроксибутирата натрия в качестве косубстрата. Однако высокая концентрация бутиролактона в среде может быть токсична для бактерии и таким образом, препятствует росту и синтезу полимера [8].

В другой работе было исследовано влияние γ -бутиролактона и 4-гидроксибутирата натрия на биосинтез П(ЗГБ-со-4ГБ) *Burkholderia sacchari* DSM 17165 на сахарозе. Исследование показало, что при использовании γ -бутиролактона доля ПГА в сухой биомассе была чуть ниже, чем при использовании 4-гидроксибутирата натрия, но идентично без использования предшественника. Доля 4-гидроксибутирата в ПГА различалась в зависимости от добавления предшественника: при использовании γ -бутиролактона, это значение составляло 20,8%, при использовании 4-гидроксибутирата натрия, оно составляло лишь 14,1%. Опираясь на результаты лабораторных исследований, ученые сделали вывод, что биосинтез сополимера П(ЗГБ-со-4ГБ) с добавлением γ -бутиролактона в качестве предшественника, может быть произведен в масштабах биореактора. В течение процесса было добавлено в культуру 15,5 г/л γ -бутиролактона на 10 добавок субстрата. В конце процесса, массовая доля ПГА в сухой биомассе составляла 71,5%, что показало огромное улучшение по сравнению с предыдущими экспериментами. Значения средневесовой массы и полидисперсности выделенного сополимера, с добавлением γ -бутиролактона, составляли 315 ± 24 кДа и $2,51 \pm 0,15$ кДа. К тому же, анализ дифференциальной сканирующей калориметрии показал, что

кристалличность и температура плавления П(ЗГБ-со-4ГБ) ($24\pm 3,6\%$) и ($160,9\pm 0,8^\circ\text{C}$) стали значительно ниже, чем в П(ЗГБ) ($72,8\%$) и ($177,6^\circ\text{C}$) [3].

1.5.2 Использование смеси субстратов

В работе Нее Huong и Chin-Ное Теh (2017) была представлена одностадийная ферментация П(ЗГБ-со-4ГБ), имеющая более выгодную физиологическую природу культивирования на смешанных субстратах, стимулируя биосинтез целевых продуктов. В данном исследовании использовалась смесь из трёх субстратов: (γ -бутиролактон и 1,4-бутандиол 1:3); (γ -бутиролактон и 1,6-гександиол 1:3) и (1,4-бутандиол и 1,6-гександиол 3:1) на базе предыдущих исследований. Ферментация была проведена с различными концентрациями углерода каждой смеси субстратов: 0,42 % C, 0,56 %C и 0,69%С соответственно. Результаты показывают, что и рост и накопление П(ЗГБ-со-4ГБ) зависели от состава субстрата. Для смеси субстратов, где мало γ -бутиролактона и много 1,4-бутандиола (1:3), наблюдалось самое низкое содержание ПГА (37%), однако, это культивирование дало самый высокий бактериальный рост со свободной биомассой 6,6 г/л. Напротив, 0,56% углерода – оптимальная концентрация для смеси субстратов, где мало γ -бутиролактона и много 1,6-гександиола (1:3), показало самое высокое содержание ПГА – 66% со свободной биомассой 6,5 г/л. Между тем, смесь субстратов, где много 1,4-бутандиола и мало 1,6-гександиола (3:1) показала более высокое накопление ПГА 70%. Значения средневесовой молекулярной массы была в пределах от 419 кДа до 923 кДа, а значения среднечисловой молекулярной массы колебалась в пределах от 113 кДа до 360 кДа. Смесь субстратов, где много 1,4-бутандиола и мало 1,6-гександиола показала более высокие значения средневесовой молекулярной массы от 703 до 923 кДа, по сравнению с двумя другими составами. Эластичность сополимеров оказалась в пределах от 506 кДа до 1637 кДа. Исследование показывает, что вариации концентрации углерода значительно влияют на бактериальный рост и накопление сополимера. В целом, смесь 1,4-бутандиола и 1,6-гександиола была наиболее эффективной комбинацией, которая создала больше сополимера с максимальной биомассой, равной 70%, дала высокую молекулярную массу и высокую эластичность – 927 кДа и 1637%. Этот сополимер имел высокую эластичность, которая была высокопрочная к деформации полимера после растяжения. Предполагается, что одноэтапное культивирование при смесях субстрата не только повысило производство сополимера, но и получили полимер с неожиданными свойствами. Это говорит о том, что осуществилась стратегия выращивания с нужным соотношением комбинаций и концентраций углерода [11].

Другая работа подтвердила данные, продемонстрированные выше. В ходе данной работы изучалось влияние различных смесей субстрата на производство полимеров в биореакторном масштабе в одностадийном культивировании. Он был выполнен с использованием смеси 4ГБ производных, а именно γ -бутиролактон (γ), 1,4-бутандиол (1,4) и 1,6-

гександиол (1,6) . Комбинация с углеродным сочетанием 1,4 + 1,6 привела к удивительно высокому накоплению ПГА в 73%. Среди всех смесей субстрата в этом исследовании γ + 1,4 зафиксировал наивысший рост биомассы в 6,2 г/л, следовательно, эта комбинация обеспечивает наиболее благоприятное и оптимальное условие для роста бактерий. Это сочетание субстрата также привело к высокой концентрации ПГА (55%). Как правило, использование субстратных смесей γ -бутиролактона и 1,4-бутандиола производило сополимер с более низким диапазоном 4ГБ мономера (12-20%); субстратная смесь 1,4-бутандиол и 1,6-гександиол производили сополимеры с более высоким диапазоном 4ГБ мономера (35-40%); субстратная смесь γ -бутиролактон и 1,6-гександиол производили полимеры с более широким диапазоном 4ГБ мономерного состава (25-55%). Сополимеры, изготовленные из смесей субстратов γ + 1,6 и 1,4 + 1, 6, обладают низким уровнем модуля Юнга, поэтому можно предположить, что эти сополимеры более эластичные. Мартин и Уильямс (2003) сообщили, что эти сополимеры использовались в качестве материалов для разработки рассасывающих медицинских приборов, таких, как сердечные клапаны, сосудистые протезы, швы и медицинские текстильные изделия [13].

Биосовместимость сополимеров с сокращённой скоростью деградации, гибкостью при изгибе и растяжением делают его отличным биоматериалом в медицинской сфере, особенно в мягкой тканевой инженерии и системы доставки лекарств [16,20].

Однако в медицинском применении распространённая и часто связанная с биоматериалом проблема заключается в микробной инфекции, которая, как правило, вызвана созданием биопленки. Биоплёнки известны как последовательность полимерной матрицы, производимой микробными клетками в качестве среды обитания для роста. Эксперименты показали, что под защитой биопленкой, микробные клетки могут быть устойчивы к антибиотикам и иммунной реакции [21]. В качестве корреляции с производством полимера с сильным противомикробным свойством, производство сополимера П(3ГБ-со-4ГБ), покрытое желтым пигментом, даст многообещающий биоматериал, который способен выделять антимикробные вещества в условиях лимитирования роста. Впоследствии это исследование было направлено на улучшения производства желтого пигмента путем использования различных дополнительных веществ, таких, как рибофлавин, пиридоксин, фолиевая кислота, биотин и экстракт дрожжей [22]. Новое открытие природных антибактериальных полимеров является одной из перспективных характеристик, помимо биологического разложения и биосовместимости, что полезно в различных прикладных областях.

Несмотря на то, что все добавки показали положительные последствия для накопления 4ГБ мономера, экстракт дрожжей оказал значительное влияние на синтез сополимера П(3ГБ-со-4ГБ) (5,85 г/л) с содержанием ПГА (46%). Присутствие дрожжей дало наивысшее производство желтого пигмента 0,27 г/л. На основе литературы, наличие дополнительных добавок, таких, как

витамины, аминокислоты и минералы, способны стимулировать производство микробных пигментов. Экстракт дрожжей является сложным субстратом, и известно, что он содержит комплекс витамина В, наличие которого в качестве кофактора, повлияло на способность бактерий производить желтый пигмент. Увеличение производства желтого пигмента с 0,13 до 0,29 г/л было заметно связано с возрастающей концентрацией экстракта дрожжей от 1 до 2 г/л. Однако концентрация и содержимое ПГА уменьшились с 5,83 до 5,05 г/л и 46-38%, соответственно. В связи с увеличением концентрации дрожжей, произошел небольшой сдерживающий эффект.

В экспериментах Iszatty Ismail и соавт. были отобраны три параметра, а именно: а) концентрация 1, 4-бутандиола, б) концентрация ацетата аммония и с) концентрация экстракта дрожжей. Эти факторы оказали влияние как на П (3ГБ-со-4ГБ), так и на производство желтого пигмента. Были сделаны выводы, что оптимальные значения для максимального содержания ПГА, концентрации пигмента и остаточной биомассы составляли 0,56 массовой доли 1,4-бутандиола, 1,14 г/л ацетата аммония и 2 г/л экстракта дрожжей [22].

1.5.3 Использование мутантных штаммов

В исследовании Ishak Muhammad Syafid и Kai-Hee Huong (2017) использовался мутантный штамм, в котором был введен дополнительный ген ПГА-синтазы (*phaC*), ответственный за полимеризацию П(3ГБ-со-4ГБ) – *Cupriavidus sp. phaC*. Было произведено культивирование трансформанта на субстратах с предшественником 4-гидроксипутирата, а именно 1,6-гександиолом и γ -бутиролактоном для производства сополимера П(3ГБ-со-4ГБ). *Cupriavidus sp. USMAA1020* была использована как модельный штамм. *Cupriavidus sp. USMAA1020phaC1020* производит полимер с самым высоким содержанием мономеров 4ГБ (92 %). Сухой вес клетки и содержание ПГА составляют, соответственно, 1,5 г/л и 23 %, при культивировании с высокой концентрацией 1,6-гександиола и низкой концентрацией γ -бутиролактона. Чуть меньше мономеров 4ГБ было произведено при культивировании с низкой концентрацией 1,6-гександиола и высокой концентрацией γ -бутиролактона (89 %). И при равных концентрациях 1,6-гександиола и γ -бутиролактона было получено 83% 4ГБ. Биосинтез сополимера П(3ГБ-со-4ГБ) трансформированным штаммом *Cupriavidus sp. USMAA1020phaC2-4* с комбинацией (много 1,6-гександиола + мало γ -бутиролактона) дал самое большое количество мономеров 4-гидроксипутирата (91 %) с сухой биомассой клеток (1,8 г/л). Это наблюдалось среди всех комбинаций концентраций источников углерода, описанных в данной статье, оба трансформированных штамма *Cupriavidus sp. USMAA1020phaC2-4* и *Cupriavidus sp. USMAA1020phaC1020* показывают общую тенденцию производства самой высокой молярной фракции 4-гидроксипутирата, использующей углеродную комбинацию (много 1,6-гександиола + мало γ -бутиролактона). В целом, оба трансформанта были способны производить сополимер П(3ГБ-со-4ГБ) с молярной фракцией 4-

гидроксibuтирата выше, чем молярная фракция диких штаммов *Cupriavidus sp.* USMAA1020 при культивировании в присутствии субстратов 1,6-гександиола и γ -бутиролактона. Биосинтез П(ЗГБ-со-4ГБ) был в дальнейшем исследован в 5 л и 30 л биореакторе с рабочими объемами 3 л и 18 л. Культивирование было проведено в период 96 часов. Углеродная комбинация (много 1,6-гександиола + мало γ -бутиролактона) была применена для производства сополимера. В течение процесса культивирования была определена общая картина состава мономеров 4-гидроксibuтирата в произведенном П(ЗГБ-со-4ГБ) между трансформированными штаммами *Cupriavidus sp.* USMAA1020phaC2-4 и *Cupriavidus sp.* USMAA1020phaC1020. Минимум 82% 4-гидроксibuтирата было синтезировано обоими трансформированными штаммами в процессе культивирования. Сополимеры П(ЗГБ-со-4ГБ), производимые в биореакторах, были оценены на механические и термические свойства. П(ЗГБ-Со-83%4ГБ) обладал самой высокой $M_w(98 \pm 5$ кДа) и $M_n(47 \pm 1$ кДа) с полидисперсностью 2,1. Сополимер П(ЗГБ-со-91%4ГБ) имел самые низкие значения среди всех других сополимеров $M_w(60$ кДа) и $M_n(39$ кДа) с полидисперсностью 1,5. Однако оба сополимера были схожими. Эластичность сополимеров П(ЗГБ-со-4ГБ) возросла от 367% до 402%, с увеличением содержания мономеров 4ГБ от 83% до 91%. Кристалличность произведенных сополимеров возросла с появлением молярной фракции 4-гидроксibuтирата [18].

1.6 Синтез и свойства П(ЗГБ-со-3ГВ-со-4ГБ)

В последнее годы усилился интерес к 3-компонентным ПГА, однако данных по их свойствам невелико. Плотность, температурные и механические характеристики, молекулярный вес трехкомпонентных сополимеров существенно зависят от соотношения мономеров. Большинство трехкомпонентных сополимеров характеризуется пониженной по сравнению с ПЗГБ температурой плавления и более длительным периодом кристаллизации. Тройной полимер П(ЗГБ-со-3ГВ-со-4ГБ) с различными свойствами имеет большой потенциал, чтобы использоваться как упаковочный материал, в сельском хозяйстве, медицинской и фармацевтической областях [9,23,24]. В одной из работ Т. М. Fahima Azira (2010) была использована в двухступенчатом культивировании граммотрицательная бактерия *Cupriavidus sp.* USMAA2-4, как продуцент тройного сополимера П(ЗГБ-со-3ГВ-со-4ГБ). В качестве источников углерода использовались с-бутиролактон или 1,4-бутандиол с валериановой кислотой или 1-пентанолом. Наибольшее содержание ПГА (51%) было получено с использованием комбинации с-бутиролактона с 1-пентанолом, который содержал 30%3ГВ и 26%4ГБ. Комбинация с-бутиролактона с валериановой кислотой произвела самое низкое содержание ПГА (36%), но полученный мономер 3ГВ (56 %) был самым высоким. Было показано, что валериановая кислота стала лучшим предшественником для мономера 3ГВ. Однако при увеличении концентрации валериановой кислоты до определенных значений состав мономера 3ГВ

уменьшался из-за токсичности этого источника углерода для микробных клеток (Park et al. 2001). Содержание ПГА и состав мономеров были идентичны для комбинации 1,4-бутандиол с 1-пентанолом или валериановой кислотой. Состав мономера 3ГВ и 4ГБ находились в диапазоне 24-25 % и 30-34%, соответственно. Этот результат показал, что с-бутиролактон с 1-пентанолом является лучшей комбинацией для получения П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГБ) по сравнению с другими. Было показано, что мономерный состав 3ГБ и 4ГБ уменьшился по мере снижения концентрации с-бутиролактона и при увеличении концентрации 1-пентанола с 0,06 мас.% до 0,22 мас.%. Значение M_n для тройного полимера, полученного в этом исследовании, варьировалось от 177 до 484 кДа при значении индекса полидисперсности в пределах 1,9-2,8. Значение температуры стеклования (T_g) тройного сополимера П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГБ) снизился с -11,7 до -18,4°C, когда доля 4ГБ увеличилась с 8 до 30%. Тогда как температура плавления (T_m) находилась в диапазоне 160-164°C [24].

Показано, что состав тройного полимера также можно контролировать путем варьирования аэрации культуры. За счет снижения аэрации уменьшилась масса сухих клеток и содержание ПГА, но значительно увеличилась молярная доля 4ГБ и 3ГВ, которые колебались от 10 до 24 % и от 40 до 67 % соответственно.. Аналогичное наблюдение было сообщено Ли и сотрудниками [24,25].

В другом исследовании была использована *Alcaligenes sp.* A-04 в присутствии фруктозы или масляной кислоты (субстрат для мономера 3ГБ), валериановой кислоты (субстрат для 3ГБ и 3ГВ мономеров), и 4-гидроксibuтирата натрия (субстрат для 3ГБ и 4ГБ мономеров) для синтеза тройного сополимера. Полимер П(10%3ГБ-со-40%3ГВ-со-50%4ГБ) был получен в течение 72 часового культивирования при 10 г/л валериановой кислоты и 10 г/л 4НВ-На. Тройные полимеры П(10%3ГБ-со-6%3ГВ-со-84%4ГБ) и П(4%3ГБ-со-3%3ГВ-со-93%4ГБ) были получены в процессе с 5 г/л фруктозы, 5 г/л валериановой кислоты и 20 г/л 4НВ-На в течение 72 и 96 ч соответственно. Значение T_g П(3ГБ-со-3ГВ-со-4ГБ) снизилось с -13,7°C до -51,6°C, когда доля 4ГБ увеличилась с 50 % до 93 %. Наличие 4ГБ в полимере увеличило эластичность (%удлинения), тогда как 3ГВ увеличило модуль Юнга (МПа) [26].

Таким образом, состав тройного полимера может быть изменен путем изменения соотношения источников углерода, состава среды и времени культивирования.

2 Материалы и методы

2.1 Культивирование бактерий

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 0.5 л, заполненных культурой на 50% объема с использованием термостатируемого шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova® серии 44 («New Brunswick Scientific», США) при температуре 30°C и 200rpm. Для выращивания бактерий за основу была принята среда Шлегеля, состоящая из: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9,1; KH_2PO_4 – 1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; NH_4Cl – 1.0 (г/л) и раствор микроэлементов (H_3BO_3 – 0,288; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,030; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176; NaMoO_4 – 0,05; NiCl_2 – 0,008 (г/л)). В качестве источника углерода использовали фруктозу, начальная концентрация которой составляла 10-12 г/л. В качестве предшественника 4ГБ использовали ϵ -капролактон; в качестве предшественника 3ГВ – валерат калия. По ходу роста культуры и исчерпания фруктозы в культуру бактерий добавляли субстрат в концентрациях, аналогичных исходных. Длительность культивирования составляла 48-72 часа.

2.2 Измерение параметров процессов

Урожай биомассы клеток в ходе развития культуры бактерий регистрировали по весу сухого вещества и оптическим показателям культуры. Периодически отбирали пробы культуры и измеряли их оптическую плотность на ФЭКе при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и $\lambda=440$ нм (ФЭК-М).

Определение урожая проводили следующим образом: 25 мл культуры центрифугировали 10 мин при 6000g. Затем дважды отмывали клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы сушили при температуре 105°C в сушильном шкафу в течение суток, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Биомассу бактерий определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

Для определения концентрации фруктозы 1 мл культуры разводили в 25 мл дистиллированной воды. Из этого разведения 1мл пробы наливали в пробирку, куда добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (1 г резорцина растворяли в 100 мл 95%-ого этилового спирта) и 3 мл смеси соляная кислота:дистиллированная вода=5:1. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Пробирки с контролем и пробой помещали на водяную баню ($t=80^\circ\text{C}$) на 20 минут. По истечении этого времени контроль и пробу охладили до комнатной температуры. Концентрацию фруктозы измеряли на ФЭКе при длине волны 540 нм.

2.3 Определение ϵ -капролактона в среде

Содержание капролактона в культуральной среде определяли следующим образом: отбирали 20 мл культуральной среды в пластиковые пробирки и центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810R при 6000 оборотов/мин в течение 10 минут. По завершении центрифугирования 5 мл среды после осаждения клеток подкисляли несколькими каплями концентрированной серной кислоты до значения рН=2-3, добавляли 3 мл хлороформа, перемешивали. Когда происходило расслоение фаз, из нижнего слоя отбирали по 1 мкл пробы и запускали в хроматограф. Параметры хромато-масс-спектрометра 6890N/5975C (Agilent Technologies). Условия хроматографирования: колонка FFAP капиллярная длиной 30 метров и диаметром 0,25 мм, фаза полярная. Температура ввода пробы составляла 120 °С. В течение 3 минут изотермальный режим, затем 15 °С/мин до 230 °С/мин. Время проведения хроматографирования 16 минут. Запуск проб производили в режиме «split» с расщеплением потока. Температура интерфейса 230°С, спектрометра 150°С.

2.4 Анализ структуры ПГА

Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза образца (навеска 4 мг) на хромато-масс-спектрометре GCD plus (“Hewlett Packard”, USA). Метанолиз проводили следующим образом. Для этого к 4 мг пробы добавляли 1 мл внутреннего стандарта (0.5 мг бензойной кислоты/1 мл хлороформа), 0,85 мл метанола и 0,15 мл конц. серной кислоты и кипятили под обратными холодильниками в течение 2 часов 40 минут. По окончании метанолиза в колбу добавляли 1 мл дистиллированной воды.

2.5 Анализ молекулярного веса ПГА

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 ($ПД = M_w/M_n$).

2.6 Изготовление плёнок

100 мг полимера растворяли в 5 мл дихлорметана с использованием ультразвуковой мешалки до полного растворения. Далее разливали в чашки Петри, предварительно обезжиренные спиртом, и ставили под стеклянный колпак на сутки.

2.7 Определение поверхностных свойств плёнок

Краевой угол смачивания является количественной характеристикой процесса смачивания, его величина определяет межмолекулярное взаимодействие частиц поверхности твёрдых тел с жидкостями.

Для изучения свойств поверхности через краевой угол смачивания работали на аппарате «KRUSS»

В качестве твердой поверхности использовались образцы пленок дву- и трехкомпонентных полимеров различного состава. Плёнки нарезали тонкими полосками шириной 1-2 см и закрепляли на подложке. На плёнки наносили поочередно воду и дийодметан в 4-5 повторностях. Таким образом, реализовался способ измерения динамических краевых углов методом “сидячей капли”. Процесс растекания фиксировался скоростной видеокамерой. Полученные видеок cadры обрабатывались при помощи программного обеспечения КРУСС, в котором использовался метод Юнга-Лапласа для определения динамики краевого угла смачивания. Данная программа распознаёт профиль капли и определяет её химические параметры, такие как краевой угол, общая поверхностная энергия, дисперсионная составляющая и полярная составляющая.

2.8 Определение температурных характеристик полимера

Термический анализ проводили с применением дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 («Mettler Toledo», Швейцария). Определяли температуры плавления, стеклования, кристаллизации, деградации.

[изъято 10 стр.]

ВЫВОДЫ

1. Исследовано влияние ϵ -капролактона в концентрациях 1-5 г/л на рост биомассы и синтез полимера. Показано, что концентрация ϵ -капролактона выше 2 г/л ингибирует рост бактерий, однако не влияет на накопление полимера.

2. Показано, что дробная подача ϵ -капролактона приводит к увеличению содержания 4ГБ мономера в сополимере. Максимальное содержание 4ГБ мономера составило 21,4% при общей концентрации капролактона 6 г/л.

3. Добавление валерата калия (1-2 г/л) и ϵ -капролактона (4 г/л) приводит к синтезу трехкомпонентного полимера с содержанием 3ГВ (7-15%) и 4ГБ (21-23%).

4. Исследованы молекулярная масса и поверхностные свойства полимеров различного состава. Отмечено снижение молекулярной массы у сополимеров, содержащих 4ГБ.

5. Температуры плавления, стеклования и кристаллизации у двух- и трехкомпонентных полимеров ниже, чем у гомополимера ПЗГБ. Температура деградации же практически не изменялась.

6. С увеличением содержания 4ГБ мономера увеличивается гидрофильность поверхностей плёнок двухкомпонентных полимеров. У плёнок трехкомпонентных полимеров гидрофильность выше там, где одновременно высокое содержание 4ГБ и низкое содержание 3ГВ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Прудникова, С. В. Экологическая роль полигидроксиалканоатов – аналога синтетических пластмасс: закономерности биоразрушения в природной среде и взаимодействия с микроорганизмами / С. В. Прудникова, Т. Г. Волова. – Красноярск: Красноярский писатель, 2012. – 184 с.
2. Higuchi-Takeuchi, M. Synthesis of High-Molecular-Weight Polyhydroxyalkanoates by Marine Photosynthetic Purple Bacteria / Mieko Higuchi-Takeuchi, Kumiko Morisaki, Kiminori Toyooka, Keiji Numata // JOURNAL PLOS ONE. – 2016. №10. P. 1-17.
3. Miguel, D. Fed-Batch Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate) from Sucrose and 4-Hydroxybutyrate Precursors by *Burkholderia sacchari* Strain DSM 17165 / Miranda de Sousa Dias Miguel, Martin Koller, Dario Puppi, Andrea Morelli, Federica Chiellini, Gerhart Braunegg // Bioengineering. – 2017. – Vol. 36
4. Kalacheva, G. S. Fatty Acid Composition of *Wautersia eutropha* Lipids under Conditions of Active Polyhydroxyalkanoates Synthesis / G. S. Kalacheva, T. G. Volova // Microbiology. – 2007. V. 76. No.5. P. 535–540.
5. Muzaiyanah, A. R. Studies on the Microbial Synthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Containing 4-Hydroxyvalerate Using γ -Valerolactone/ A. R. Muzaiyanah, A. A. Amirul // Biochemist Biotechnology – 2013. V. 170. P. 1194-1215.
6. Волова, Т. Г. Синтез Сополимеров 3-гидроксibuтирата-Со-4-гидроксibuтирата водородокисляющими бактериями / Т. Г. Волова, Н. О. Жила, Г. С. Калачёва, В. А. Соколенко Прикладная биохимия и микробиология –2011. Т. 47. С. 544–550.
7. Виноградова, О.Н. Микробиологический синтез и свойства П(3ГБ/4ГБ) с высоким включением фракции 4ГБ / О. Н. Виноградова // Актуальная биотехнология – 2015. Т3. С. 38.
8. Tran, P. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers by *Yangia sp.* NP199 from different carbon sources / Huu Phong Tran, Doan Van Thuoc, Kumar Sudes // International Journals of Biological Macromolecules. – 2016. V.84. P. 361-366.
9. Cavalheiro, M. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol /

M. Cavaleiro, R. Raposo, M. Catarina, C. Servin // *Bioresource Technology*. - 2012. P. 1-7.

10. Iqbal, N. Synthesis of P(3HB-co-4HB) copolymer with target-specific 4HB molar fractions using combinations of carbon substrates / Nurhezreen Md. Iqbal, A. A. Amirul // *Research Article*. – 2013.

11. Huong, K. Microbial-based synthesis of highly elastomeric biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) thermoplastic / Kai-Hee Huong, Chin-Hoe Teh, Amirul Al-Ashraf Abdullah // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. V. 17.

12. Shishatskaya, E. I. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures. / E. I. Shishatskaya, T. G. Volova // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2004. V. 15. P. 915-923.

13. Huong, K. Biosynthetic enhancement of single-stage Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by manipulating the substrate mixtures / Kai-Hee Huong, Shantini Kannusamy, Sumithda Yeong Hui Lim, A. A. Amirul // *Journal Indi Microbial Biotechnology*. – 2015. V. 42. P. 1291-1297.

14. Gorenflo, V. Development of a process for the biotechnological large-scale production of 4-hydroxyvalerate-containing polyesters and characterization of their physical and mechanical properties / V. Gorenflo, G. Schmack, R. Vogel, A. Steinbüchel // *Biomacromolecules*. – 2001. V. 2. P. 45 –57.

15. Lee-Mei, Ng. Identification of a new polyhydroxyalkanoate (PHA) producer *Aquitalea* sp. USM4(JCM 19919) and characterization of its PHA synthase / Lee-Mei Ng, Kumar Sudesh // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2016. V. 122. N. 5. P. 550-557.

16. Ramachandran, H. Bioconversion of Glycerine Pitch into a Novel Yellow-Pigmented P(3HB-co-4HB) Copolymer: Synergistic Effect of Ammonium Acetate and Polymer Characteristics / H. Ramachandran, A. A. Amirul // *Appl Biochemist Biotechnology*. – 2014. №172. P. 891-909.

17. Martin, D.P., Williams S.F. // *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2003. V. 16. № 2. P. 97–105.

18. Ishak, S. Synthesis of high 4-hydroxybutyrate copolymer by *Cupriavidus* sp. Transformants using one-stage cultivation and mixed precursor substrates strategy / Muhammad Syafid Ishak, Kai-Hee Huong, K. Shantini, S. Vigneswari // *Journal Enzyme and Microbial Technology*. – 2017. V.98. P. 1-7.

19. Li Z.-J. / *Metabolic Engineering* // Li Z.-J., Shi Z.-Yu, J. Jian, Y.-Y. Guo, Q. Wu, G.-Q. Chen// –2010. V. 12. №4. P. 352–359

20. Chee, J. W. The Influence of Copolymer Ratio and Drug Loading Level on the Biocompatibility of P(3HB-co-4HB) Synthesized by *Cupriavidus* sp. USMAA2–4./ J. W. Chee, A. A. Amirul, Tengku Muhammad, S. M. Mansor // *Biochemist Engineering Journal*. – 2008. V. 38. P. 314–318.

21. Wu, H. Strategies for Combating Bacterial Biofilm Infections./ H. Wu, C. Moser, H. Z. Wang, Z. J. Song // *International Journal Oral Sci*. – 2015. V. 7. P. 1–7.

22. Iszatty, I. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer and antimicrobial yellow pigmentation from *Cupriavidus* sp. USMAHM13 with antibiofilm capability / Ismail Iszatty, Tana Poorani Gurusamy, Nema Ramachandran, Abdullah AlAshraf Amirul // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. – 2017. V. 10.

23. Волова, Т. Г. Биомедицинский потенциал разрушаемых полигидроксиалканоатов: экспериментально-клинические исследования / Т. Г. Волова [и др.]. – Красноярск: Версо, – 2014. –332 с.

24. Fahima Azira, T. M. Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) terpolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 through two-step

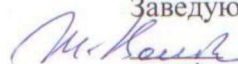
cultivation process / T. M. Fahima Azira, A. A. Nursolehah, Y. Norhayati // *World J Microbiol Biotechnol*. – 2010. V. 7.

25. Lee, W. H. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. / W. H. Lee, N. M. Azizan, K. Sudesh // *Polym. Degrad. Stab*. – 2004. V. 84. P. 129–134.

26. Suchada, C. Production and Characterization of Biodegradable Terpolymer Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate-co-4-Hydroxybutyrate) by *Alcaligenes* sp. A-04 / Suchada Chanprateep, Songsri Kulpreecha // *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*. – 2006. V. 101. №1. P. 51-56

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова


« 18 » июня 2018 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Синтез и свойства полимеров, содержащих 4-гидроксibuтират.

Руководитель  18.06.2018

Выпускник  18.06.2018

к.б.н. Н. О. Жила

В. С. Безбидо

Красноярск 2018