

УДК 577.1

# Биосинтез сополимера поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7Б

А. П. Бонарцев<sup>1,2\*</sup>, Г. А. Бонарцева<sup>2</sup>, В. Л. Мышкина<sup>2</sup>, В. В. Воинова<sup>1</sup>, Т. К. Махина<sup>2</sup>, И. И. Жаркова<sup>1</sup>, С. Г. Яковлев<sup>2</sup>, А. Л. Зернов<sup>1</sup>, Э. В. Иванова<sup>1</sup>, Е. А. Акулина<sup>2</sup>, Е. С. Кузнецова<sup>1</sup>, В. А. Жуйков<sup>2</sup>, С. Г. Алексеева<sup>3</sup>, В. В. Подгорский<sup>4</sup>, И. В. Бессонов<sup>5</sup>, М. Н. Копицына<sup>5</sup>, А. С. Морозов<sup>5</sup>, Е. Ю. Милановский<sup>6</sup>, З. Н. Тюгай<sup>6</sup>, Г. С. Быкова<sup>6</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1</sup>, К. В. Шайтан<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>2</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

<sup>3</sup>ОАО «Институт пластмасс», 111024, Москва, Петровский пр-д, 35

<sup>4</sup>Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

<sup>5</sup>Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана, 105005, Москва, 2-я Бауманская ул., 5, стр. 1

<sup>6</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: ant\_bonar@mail.ru

Поступила в редакцию 26.10.2015

Принята к печати 21.06.2016

**РЕФЕРАТ** Получение новых полиоксиканоатов (ПОА) – биоразлагаемых полимеров биомедицинского назначения и биоматериалов на их основе – перспективное направление современной биоинженерии. Изучена способность эффективного штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б синтезировать не только гомополимер поли-3-оксибутирата (ПОБ) и его основной сополимер поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат (ПОБВ), но и новый сополимер поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат (ПОБ4МВ). Для биосинтеза сополимеров ПОБ мы использовали карбоновые кислоты в качестве дополнительных источников углерода и предшественников мономеров в цепи синтезируемых сополимеров. Определены основные параметры биосинтеза полимеров: урожай биомассы штамма-продуцента, продукция полимера, молекулярная масса и мономерный состав синтезируемых полимеров, а также морфология клеток *A. chroococcum* 7Б. Физико-химические свойства полученных полимеров определены с использованием спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК), измерения контактного угла смачивания и др. Рост клеток на полученных полимерах *in vitro* оценен с использованием стромальных клеток (СК), выделенных из костного мозга крыс, и теста анализа жизнеспособности клеток ХТТ. Синтез нового сополимера ПОБ4МВ показан путем определения его химического состава методом спектроскопии ЯМР – добавление в культуральную среду 4-метилвалериановой кислоты приводило к включению в полимерную цепь ПОБ мономеров 3-окси-4-метилвалерата (3О4МВ) (0.6 мол. %). Несмотря на малое молярное содержание 3О4МВ в составе сополимера, его физико-химические свойства значительно отличались от свойств гомополимера ПОБ: имел сниженную степень кристалличности и повышенный контактный угол смачивания, т.е. по своим физико-химическим свойствам сополимер ПОБ4МВ с содержанием 3О4МВ всего 0.6 мол. % соответствовал сополимеру ПОБВ с молярным содержанием от 2.5 до 7.8%. Рост СК, определенный по тесту ХТТ, на полученном сополимере ПОБ4МВ *in vitro* не отличался статистически от их роста на полимерах ПОБ и ПОБВ, что позволяет использовать его в биомедицинских разработках и исследованиях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** *Azotobacter chroococcum* 7Б, биосинтез, биосовместимость, кристалличность, поли-3-оксибутират, поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат, стромальные клетки костного мозга.

**ВВЕДЕНИЕ**

В связи с интенсивным развитием таких биомедицинских направлений, как регенеративная медицина, биоинженерия (в том числе тканевая инженерия), биофармацевтика, нанобиотехнология, возрастает потребность в создании новых биоматериалов, особенно биосовместимых и биоразлагаемых полимеров. В качестве материалов для изготовления медицинских изделий и лекарственных форм используют целый ряд природных и синтетических полимеров: полиоксикарбонаты (ПОА), полиангидриды, полиалкилцианоакрилаты, полифосфазены, полифосфоэфиры, полиортоэфиры, некоторые полисахариды (хитозан, гиалуроновая кислота, агароза, декстран, альгинаты, хондроитинсульфат) и белки (коллаген, фибрин, фиброин шелка, спидроин, желатин) [1–5]. Эти полимеры применяются в медицинских имплантатах при восстановительной хирургии [4, 5], тканевой инженерии [3, 6, 7], для создания новых лекарственных форм в биофармацевтике [8, 9], новых материалов для стоматологии и в других приложениях [1, 2].

Несмотря на широкий ассортимент используемых в медицине полимеров, подавляющее большинство из них получают химическим синтезом или выделяют из природного сырья (водорослей, высших растений, грибов, ракообразных, тканей домашних животных). К сожалению, методы химического синтеза и выделения полимеров из природного сырья не могут в полной мере обеспечить набор свойств, необходимый для полимеров биомедицинского назначения. Требуется глубокая и очень дорогая очистка получаемых полимеров, которые должны иметь заданную в узких рамках химическую структуру и свойства, а также быть биобезопасными и т.п. Кроме того, синтетические полимеры и продукты их биodeградации могут быть токсичными, а природные полимеры могут обладать выраженной иммуногенностью или быть загрязнены вирусами или прионными белками [10, 11].

Среди разрабатываемых и используемых биомедицинских полимеров особое внимание привлекают биоразлагаемые поли-3-оксикарбонаты – поли-3-оксибутират (ПОБ) и его сополимеры (согласно отечественной химической номенклатуре высокомолекулярных соединений и ИЮПАК [12]). В отличие от природных полимеров (хитозана, альгината, декстрана, коллагена и др.) и химически синтезируемых полимеров, ПОА получают биотехнологическим путем, что позволяет добиваться высокой степени чистоты, контролировать и задавать в узких пределах основные физико-химические свойства биополимеров в процессе их биосинтеза. ПОА обладают набором уникальных свойств: высокой механической прочностью и термопластичностью, что обеспечивает про-

стоту переработки и позволяет получать широкий спектр изделий, способностью к образованию композитов с синтетическими полимерами, неорганическими материалами и лекарственными веществами, а также к полному биоразложению с образованием нетоксичных продуктов, биосовместимостью (в том числе гемосовместимостью) с тканями и органами человека и животных и экологической безопасностью. В связи с этим ПОА считаются перспективными для применения в медицине [13–16].

ПОА обладают также уникальной наноструктурой. Будучи частично кристаллическими, ПОА могут формировать различные супрамолекулярные структуры, такие, как ламеллы и сферолиты. Подобная частично кристаллическая структура и морфология во многом определяют биологические свойства ПОА, например кинетику биodeградации [17, 18].

Однако ПОА, как и другие полимерные материалы, в частности гомополимер ПОБ, может обладать и некоторыми недостатками: высокой гидрофобностью и кристаллическостью, длительной биodeградацией и низкой пластичностью, что в ряде случаев серьезно ограничивает их применение в качестве биоинженерных материалов в медицине, например для изготовления протезов сосудов [19, 20]. В связи с этим разработка новых биотехнологических методов получения новых сополимеров ПОБ биомедицинского назначения с оптимальным сочетанием физико-химических и биологических свойств и биоматериалов на их основе считается наиболее перспективным направлением в современной биоинженерии [1, 2, 13–16].

Ранее мы показали возможность биосинтеза различных сополимеров ПОБ в высокоэффективном штамме-продуценте ПОА *Azotobacter chroococcum* 7Б с использованием различных методических подходов, провели комплексное исследование физико-химических и биологических свойств полученных полимеров. Этот штамм характеризуется неприхотливостью к условиям культивирования и биотехнологического процесса (необходимо только самое базовое оборудование, не требуются высокоспецифичные культуральные среды, газовое питание, высокоточный контроль специальных параметров и т.п.), высокой продуктивностью (высокий выход биомассы, содержание полимера и сухой биомассы в клетках до 80% и выше), высокой молекулярной массой синтезируемого полимера (более  $1.5 \times 10^6$  Да). Такие характеристики крайне важны для биотехнологической продукции полимеров биомедицинского назначения в связи с необходимостью технически простой и глубокой очистки, помимо обеспечения их эффективной наработки [15, 21]. Однако у таких продуцентов имеются ограничения в синтезе сополимеров ПОБ, содержащих мономеры 3-оксикарбо-

новых кислот с длиной более пяти атомов углерода [22, 23]. Биосинтез нового сополимера ПОБ, поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерата, показан с использованием таких бактериальных продуцентов, как *Ralstonia eutropha*, *Burkholderia* sp., *Chromobacterium* sp., способных к биосинтезу ПОА с короткоцепочечными и длинноцепочечными мономерами карбоновых кислот [24–27]. Однако химическая структура этого сополимера (мономер 3-окси-4-метилвалерат имеет Y-образную R-группу) особенно интересна для изучения его биосинтеза именно такими бактериальными продуцентами, как *Azotobacter* sp., из-за указанных ограничений.

Возможность биосинтеза новых сополимеров ПОБ такими бактериальными продуцентами, как *Azotobacter* sp., представляет большой научный и практический интерес. Нами изучена возможность биосинтеза нового сополимера ПОБ – поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат – высокоэффективным штаммом-продуцентом ПОА *A. chroococcum* 7Б, определены физико-химические свойства этого сополимера и его биосовместимость *in vitro*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы

Натриевая соль валериановой кислоты, или валерат натрия (ВК), натриевая соль 4-метилвалериановой кислоты, или метилвалерат натрия (4МВК), натриевая соль гексановой кислоты, или гексанат натрия (ГК); компоненты культуральной среды:  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , NaCl,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $CaCO_3$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , цитрат натрия,  $CaCl_2$ ,  $KH_2PO_4$ , сахароза, агар, фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Все реактивы закуплены в компании Sigma Aldrich (Германия) и использованы в том виде, в котором получены.

### Биосинтез полимеров

Для биосинтеза полимеров использован высокоэффективный штамм-продуцент ПОБ *A. chroococcum* 7Б, несимбиотическая азотфиксирующая бактерия, способная к сверхпродукции полимера (до 80% от сухого веса клеток) [28–31]. Штамм был выделен из ризосферы пшеницы (дерново-подзолистая почва) и поддерживался на среде Эшби, содержащей 0.2 г/л  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.2 г/л  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2 г/л NaCl, 0.006 г/л  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 5.0 г/л  $CaCO_3$ , 20 г/л сахарозы и 20 г/л агара. Все эксперименты проведены в лабораторных условиях. Для достижения высокой продуктивности клеток культуру *Azotobacter* выращивали в качалочных колбах в микробиологической качалке Innova 43 (New Brunswick Scientific, США)

при постоянном перемешивании и 30°C на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде, содержащей 0.4 г/л  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.01 г/л  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.006 г/л  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.5 г/л цитрата натрия, 0.1 г/л  $CaCl_2$ , 1.05 г/л  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ , 0.2 г/л  $KH_2PO_4$  и 17 г/л (50 мМ) сахарозы как основного источника углерода. Объем среды в колбе составлял 100 мл, что при высокой продуктивности штамма *A. chroococcum* 7Б при отборе проб в конце эксперимента позволяет анализировать процессы биосинтеза и иметь достаточное количество проб для статистической обработки (каждый эксперимент проведен в восьмикратной повторности). Для биосинтеза сополимеров ПОБ в культуральную среду добавляли соли карбоновых кислот (пропионовой, валериановой, 4-метилвалериановой, гексановой) в качестве дополнительных источников углерода. В качестве предшественника мономера 3-оксивалерата в составе ПОА в культуральную среду добавляли ВК в концентрации 5 и 20 мМ сразу и через 12 ч культивирования штамма-продуцента. Эти концентрации и временные интервалы выбраны для получения сополимера ПОВВ с различным содержанием 3-оксивалерата в цепи получаемого сополимера [28, 29]. В качестве потенциальных предшественников мономеров 3-окси-4-метилвалерата и 3-оксигексаноата в составе синтезируемого ПОА в культуральную среду добавляли 4МВК и ГК в концентрации 5, 10, 20 и 35 мМ через 12 ч культивирования штамма-продуцента и в концентрации 20 мМ через 0 ч. Такие концентрации этой карбоновой кислоты выбраны по аналогии с другими карбоновыми кислотами, используемыми для биосинтеза новых сополимеров ПОБ и согласно [24–27, 29]. Штамм-продуцент культивировали в течение 72 ч. Оптическую плотность культуральной среды контролировали при помощи нефелометрии. Рост и накопление полимера контролировали также при помощи световой микроскопии с использованием микроскопа Биомед-1 («Биомед», РФ) с цифровой камерой. Параметры биосинтеза сополимеров: урожай биомассы (г/л среды) и общее содержание полимера в клетках (вес. % от сухого веса клеток) (табл. 1) измеряли согласно ранее разработанным методикам. Процесс выделения и очистки полимера из биомассы штамма-продуцента включал экстракцию хлороформом, фильтрование, осаждение изопропиловым спиртом, очистку путем нескольких циклов растворения-осаждения и высушивание [28–31].

### Исследование химического состава полимера методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Спектры  $^1H$  ЯМР 1% (вес./об.) растворов полимеров в дейтерированном хлороформе были сня-

ты на спектрометре MSL-300 300 МГц (Bruker, Германия) с экспериментальными параметрами: температура 313 К, релаксационная задержка 2.5 с, ширина спектрального окна 4000 Гц, и на спектрометре Bruker Avance III 500 МГц с трехканальным криодатчиком TCI Prodigy (Bruker, Германия) с экспериментальными параметрами: температура 310 К, релаксационная задержка 3.3 с, ширина спектрального окна 10000 Гц. Химические сдвиги (в миллионных долях) выставлены по сигналу остаточных протонов  $\text{CDCl}_3$  (7.24 м.д. по ТМС). Процентное содержание мономеров 3-оксивалерата (ЗОВ) в сополимере ПОВВ рассчитывали по соотношению интегральных интенсивностей сигнала метильной группы гидроксивалерата (0.89 м.д.) и суммарных сигналов метильной группы гидроксивалерата (0.89 м.д.) и метильной группы гидроксibuтирата (1.27 м.д.) [29, 31]. Процентное содержание мономеров 3-окси-4-метилвалерата (ЗО4МВ) в сополимере ПОВ4МВ рассчитывали по соотношению суммы интегральных интенсивностей сигналов 4-метильной группы (g) (0.90 м.д.) и  $-\text{CH}$  (f) (1.91 м.д.) и суммы интегральных интенсивностей сигналов 4-метильной и  $-\text{CH}$ -групп остатка 3-окси-4-метилвалерата и метильной группы остатков 3-оксибутирата (1.27 м.д.) (рис. 2).

#### Определение молекулярной массы полимеров

Молекулярную массу (ММ) полимеров определяли методом гель-фильтрационной хроматографии (ГФХ). Данные, полученные методом ГФХ, были сопоставлены с вискозиметрическими данными [28–31].

#### Получение экспериментальных образцов полимерных пленок

С целью изучения физико-химических свойств и роста клеток *in vitro* на полимерных пленках получены экспериментальные образцы полимерных пленок толщиной 40 мкм и диаметром 30 мм. Для изготовления образцов использовали синтезированные в бактериях полимеры: ПОВ, ПОВВ1 (2.5 мол. % ЗОВ), ПОВВ2 (7.8 мол. % ЗОВ) и ПОВ4МВ, характеристики которых приведены в табл. 2. Полимерные пленки готовили из 2% (вес/об.) растворов соответствующих полимеров в хлороформе путем испарения растворителя на стеклянной подложке. Вес пленок измерен с помощью весов AL-64 (Max = 60 г, d = 0.1 мг, Acculab, США) и составил  $61 \pm 8$  мг. Толщина пленок, измеренная магнитным толщинометром, составила  $38 \pm 6$  мкм. Для работ с культурами клеток пленки стерилизовали автоклавированием, их предварительно инкубировали в дистиллированной воде при 37°C в термостате (ЕС 1/80 СПУ, РФ) в течение 2 ч [30, 31].

#### Дифференциальная сканирующая калориметрия

Теплофизические характеристики полимерных пленок (температуры плавления и кристаллизации, теплоты плавления и кристаллизации) измеряли с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии согласно [32, 33]. Температуру начала и максимума пика плавления или кристаллизации обозначали как  $T_{\text{пл}}^0$ ,  $T_{\text{пл. пик}}$  и  $T_{\text{кр. пик}}$  соответственно. Кристалличность ПОВА ( $X_c$ ) рассчитывали согласно [33]:

$$X_c = \Delta H_m(\text{ПОВА}) / \Delta H_0 m(\text{ПОВ}) \times 100\%,$$

где  $\Delta H_0 m(\text{ПОВ})$  – теоретическое значение термодинамической энтальпии плавления, которая у 100% кристаллического ПОВ могла составить 146.6 Дж/г [34], а  $\Delta H_m(\text{ПОВА})$  – экспериментальная энтальпия плавления соответствующего образца ПОВА. Расчеты степени кристалличности образцов и температуры плавления произведены для данных, полученных на втором цикле нагрева полимеров, температура кристаллизации – на основании данных, полученных на первом цикле охлаждения. Данные представлены как средние значения из трех измерений.

#### Измерение контактного угла смачивания

Гидрофильность поверхности полимерных пленок оценивали, измеряя контактный угол смачивания, формирующийся между каплей воды и поверхностью полимерной пленки, с помощью цифрового угломера – системы анализа формы капли Drop Shape Analysis System – DSA100 (KRÜSS, GmbH, Германия) согласно [30, 31].

#### Исследование роста стромальных клеток на полимерных пленках

Стромальные клетки (СК) выделяли из костного мозга бедренных костей 3-дневных крыс линии Вистар по стандартной методике [35]. Животных забивали декапитацией, выделяли бедренные кости, отрезали эпифизы, костный мозг вымывали из диафизов с помощью шприца (2 мм, игла 27G). Полученную суспензию инкубировали в среде DMEM с коллагеназой типа 1 (1075 ед/мл) («ПанЭко», Россия) в течение 1 ч при 37°C, центрифугировали (10 мин, 100 об/мин), осадок высаживали на культуральный пластик. На следующий день меняли ростовую среду и далее культивировали до появления первичной монослойной культуры.

Жизнеспособность клеток оценивали с использованием теста ХТТ – аналога широко применяемого теста МТТ [30, 31, 36]. Этот тест, основанный на превращении неокрашенной соли тетразолия в окрашенные соединения формазана под действием NADPH-зависимых оксидоредуктаз, позволяет оце-

нить активность митохондриальных дегидрогеназ. Использовали набор для ХТТ (ХТТ Cell Proliferation Kit, Biological Industries, Израиль).

Задачей нашей работы была не проверка цитотоксичности, а выявление пролиферации клеток на матриксах, т.е. биосовместимости полимерных пленок. Клетки поддерживали в среде DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, «ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biological Industries, Израиль), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко»), при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Среду меняли каждые 3 дня. Стерильные образцы пленок ПОВ, ПОВВ1 и ПОВ4МВ (стерилизация автоклавированием) ( $n = 6$ ) помещали в лунки 96-луночного планшета, клеточную суспензию наносили сверху из расчета 1500 клеток на образец. Использовали клетки второго пассажа, так как пролиферация клеток первого пассажа была не вполне стабильной, в повторных экспериментах наблюдались значительные различия в росте клеток первого пассажа на полимерных пленках. Мы определяли жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных пленках, на 1, 3, 7 сут, так как важно было оценить данный параметр в динамике. Установлено, что рост клеток стабилен в этом временном промежутке, а данные точки наиболее полно описывают динамику роста СК на пленках. После заданного времени культивирования удаляли среду из лунок, вносили 100 мкл свежей среды в новые чистые лунки и переносили туда наши образцы. Это делалось для того, чтобы учитывать только клетки, прикрепленные к полимерной подложке, и не учитывать клетки, которые могли открепиться от подложки и прикрепиться к полимерному планшету. Затем добавляли 50 мкл свежеприготовленного раствора ХТТ (по методике). По прошествии 4 ч инкубации при 37°C при плавном покачивании вынимали образцы и измеряли оптическую плотность на приборе Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector (Anthos Labtec Instruments GmbH, Австрия) при 450 нм против 690 нм [30, 31].

### Статистический анализ

Статистическую обработку параметров биосинтеза полимеров, контактного угла смачивания полимеров и их биосовместимости *in vitro* на культуре клеток проводили с использованием программного пакета SPSS/PC+ Statistics™ 12.1 (SPSS). Использовали однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA). В таблицах и на рисунках данные представлены в виде средних величин и стандартной ошибки среднего ( $M \pm SD$ ) при уровне значимости  $p < 0.05$ , в подписях к рисункам и в примечании к таблицам указано число измерений ( $n$ ). Представлены

средние значения физико-химических свойств полимеров, вычисленные из трех измерений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Биосинтез сополимеров ПЗОВ с использованием дополнительных источников углерода

Результаты изучения биосинтеза сополимеров ПОВ штаммом-продуцентом *A. chroococcum* 7Б при добавлении различных дополнительных источников углерода (солей пропионой, валериановой и 4-метилвалериановой и гексановой кислот) в культуральную среду приведены в *табл. 1*. Результаты изучения биосинтеза сополимера ПОВВ подтверждают полученные ранее данные: мономеры 3-оксивалерата включаются в цепь сополимера ПОВВ при добавлении валериановой и пропионовой кислот в качестве дополнительных источников углерода, тогда как в присутствии более длинноцепочечной гексановой кислоты синтеза сополимеров не происходило. Причем молярное содержание ЗОВ в синтезируемом сополимере прямо зависит от концентрации ВК, добавляемой в культуральную среду. Молекулярная масса сополимера ПОВВ была ниже, чем у гомополимера ПОВ, что, вероятно, связано с ингибирующим действием валерата на синтез полимера. Если же сахара служит единственным источником углерода, то штамм-продуцент синтезирует высокомолекулярный ПОВ (1710 кДа) [29, 37–39].

С целью улучшения параметров биосинтеза полимеров используют различные дополнительные источники углерода. Показано, что дополнительные источники углерода не только влияют на молекулярную массу синтезируемых полимеров, но и приводят к синтезу сополимеров с новыми и модифицированными физико-химическими и биомедицинскими свойствами [29–31, 40–46].

Используя этот метод, показали возможность биосинтеза нового для штамма-продуцента *A. chroococcum* 7Б сополимера ПОВ4МВ путем добавления в культуральную среду 4МВК в качестве дополнительного источника углерода и предшественника мономера 3О4МВ в цепи сополимера. Вхождение остатков 3О4МВ в состав синтезированного полимера ПОВ4МВ подтверждено также данными спектроскопии ЯМР <sup>1</sup>H. На спектре ЯМР <sup>1</sup>H 4-метильная группа (е) и –СН-группа (ж) мономера 3О4МВ представлены пиками 1.91 и 0.90 м.д. соответственно (*рис. 2*), тогда как у гомополимера ПОВ и сополимера ПОВВ в этой области нет сигналов. Мы предполагаем, что полученный сополимер, как и ПОВВ, является мультиблок-сополимером, и его синтез осуществляется по следующей схеме: 4МВК → 4-метилвалерил-КоА → 3-кето-4-

Таблица 1. Биосинтез сополимеров ПОБ *A. chroococum* 7Б на сахарозосодержащей культуральной среде с добавлением солей карбоновых кислот

Субстрат	Время добавления соли карбоновой кислоты в культуральную среду, ч	Урожай биомассы, г/л среды	Содержание ПОА в биомассе, % от сухого веса клеток	Молекулярная масса ПОА, кДа	Содержание ЗОВ/ЗО4МВ в сополимере, мол. %
Сахароза, 50 мМ	-	5.8 ± 0.6	83.4 ± 3.1	1710	0
С + 20 мМ ПК	12	2.2 ± 0.7*	63.3 ± 3.3*	890	2.9
С + 5 мМ ВК	12	4.4 ± 0.9*	76.2 ± 3.0*	1290	2.5
С + 20 мМ ВК	0	3.1 ± 1.3*	67.4 ± 4.6*	1020	7.8
С + 20 мМ ВК	12	3.5 ± 0.8*	70.5 ± 3.2*	1270	21.3
С + 20 мМ 4МВК	0	2.6 ± 1.2*	71.2 ± 4.8*	620	0.04
С + 5 мМ 4МВК	12	3.7 ± 0.8*	79.3 ± 3.2*	1390	0.14
С + 10 мМ 4МВК	12	3.6 ± 0.9*	78.8 ± 3.4*	1340	0.23
С + 20 мМ 4МВК <sup>#</sup>	12	3.4 ± 0.9*	76.7 ± 3.3*	1300	0.60
С + 35 мМ 4МВК	12	2.7 ± 0.8*	71.4 ± 3.5*	1130	0.32
С + 20 мМ ГК	12	2.7 ± 0.7*	64.3 ± 3.7*	1020	0

\* $p < 0.05$  при сравнении с группой «Сахароза» (С),  $n = 8$ .

<sup>#</sup> – экспериментальные данные для полученного согласно приведенным в данной строке условиям биосинтеза сополимера ПОБ4МВ показаны на рис. 2, 4 и в табл. 2.

метилвалерил-КоА → D-3-окси-4-метилвалерил-КоА → ЗО4МВ в составе ПОБ4МВ, т.е. подобно биосинтезу ПОБВ: ВК → валерил-КоА → 3-кетовалерил-КоА → D-3-гидроксивалерил-КоА → ЗОВ в составе ПОБВ [29, 37–39] (рис. 1).

Максимальное вхождение мономеров ЗО4МВ в состав синтезированного полимера ПОБ4МВ составляло 0.6 мол. % при добавлении в культуральную среду 4МВК в концентрации 20 мМ в качестве дополнительного источника углерода, при других концентрациях карбоновой кислоты-предшественника вхождение мономеров было гораздо ниже. Тем не менее подтвержден сам факт синтеза этого сополимера.

Кодируемая геном *phbC* ПОБ-синтаза является полимеразой короткоцепочечных карбоновых кислот, таких, как 3-гидроксипропанат и 3-гидроксивалерат. Эта полимеразы не способна использовать для синтеза ПОА средне- и длинноцепочечные 3-гидроксикарбоновые кислоты, а именно кислоты, длиннее 3-гидроксивалериановой кислоты (5С 3-гидроксикарбоновая кислота), т.е. 3-гидроксигексановую и 3-гидроксигептановую кислоты этот фермент не может инкорпорировать в состав растущей цепи ПОА [22, 23]. Тем не менее в качестве добавки мы использовали ГК, которая как изомер 4МВК может служить контролем, поскольку известно, что присутствие ГК не приводит к синтезу сополимера ПОБ клетками *A. chroococum*. Однако влияние ГК на сам процесс биосинтеза необходимо было проконтролировать. Полученные нами данные подтверждают ограничения по длине используемых

мономеров для ПОБ-синтазы, что, по-видимому, связано со строгой специфичностью этого фермента по отношению к субстратам, используемым для синтеза полимера. Включение остатков 3-окси-4-метилвалерата лишь подтверждает это ограничение, так как несмотря на то, что 3-окси-4-метилвалерат является остатком 6С 3-гидроксикарбоновой кислоты, его боковая группа имеет вилкообразную форму, что не приводит к увеличению длины боковой цепи. А вот линейная молекула – 3-оксигексановая кислота (6С линейная 3-оксикарбоновая кислота) не может быть включена ферментом в состав растущей цепи полиэфира по тем же причинам.

Интересно, что добавление в культуральную среду ВК и 4МВК вызывает небольшое снижение молекулярной массы синтезируемого полимера, что можно объяснить ингибирующим действием карбоновых кислот на процесс биосинтеза ПОА (табл. 1). Однако если добавить 4МВК в культуральную среду не через 12 ч, а сразу же, то будет наблюдаться не только значительное снижение молекулярной массы полимера, но, прежде всего, практически не будет синтезироваться собственно сам сополимер ПОБ4МВ. Аналогичный эффект наблюдается и при начальном добавлении ВК в культуральную среду, но в этом случае синтезируется сополимер ПОБВ с гораздо меньшим содержанием мономеров ЗОВ. Снижение молекулярной массы происходит и при добавлении в культуральную среду ГК, хотя сополимер при этом не синтезируется. Это также может быть связано с ингибирующим действием карбоновых кислот

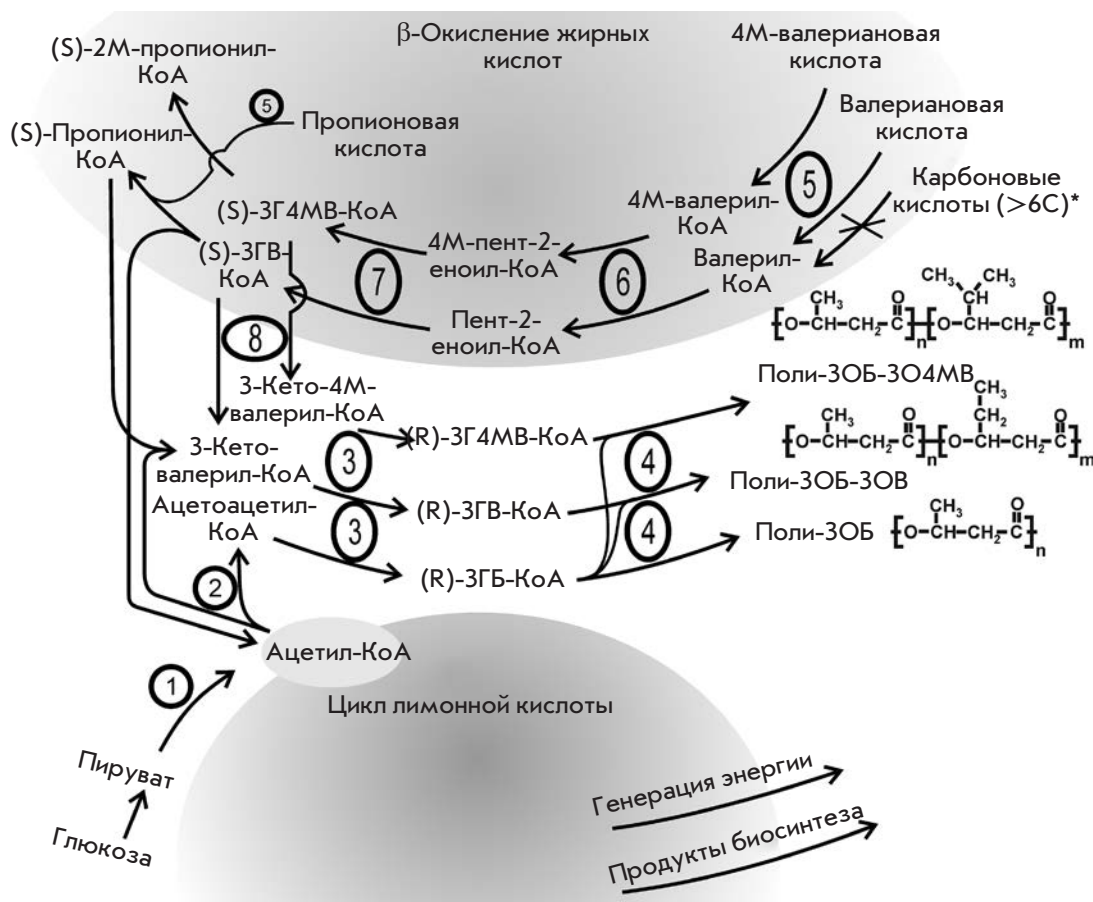


Рис. 1. Схема биосинтеза ПОБ и его сополимеров *A. chroococcum* 7Б. 1 – пируват-дегидрогеназный комплекс; 2 –  $\beta$ -кетотиолаза; 3 – NADPH-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза; 4 – ПОА-полимераза короткоцепочечных карбоновых кислот; 5 – ацил-КоА-синтаза; 6 – ацил-КоА-дегидрогеназа; 7 – еноил-КоА-гидратаза; 8 – NADH-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза. Сокращения на схеме: 4М – 4-метил; 2М – 2-метил; 3ГБ – 3-гидроксибутират-; 3ГВ – 3-гидроксивалерат-; 3Г4МВ – 3-гидрокси-4-метилвалерат; поли-3ОБ-3О4МВ – поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат; поли-3ОБ-3ОВ – поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат; поли-3ОБ – поли-3-оксибутират

на ПОБ-синтазу, которое на ранних стадиях биосинтеза полимера приводит к снижению включения молекул-предшественников в растущую цепь сополимера, хотя теоретически, напротив, должно приводить к синтезу сополимеров с большим содержанием ЗОВ и 3О4МВ.

Влияние карбоновых кислот на биосинтез полимеров подтверждают результаты изучения роста культуры *A. chroococcum* 7Б. Полученные результаты свидетельствуют о том, что добавление в среду карбоновых кислот приводит к заметному подавлению роста клеток, снижению содержания полимера и, как следствие, продукции полимера, причем степень такого ингибирующего влияния на рост клеток зависит от химической природы добавки [29]. Так, несмотря на то, что при использовании ГК в качестве

дополнительного источника углерода, сополимер не синтезируется, ГК значительно подавляет рост клеток и продукцию полимера (табл. 1).

Несмотря на некоторое снижение параметров биосинтеза ПОБ4МВ, следует отметить высокую продуктивность (урожай биомассы – 3.4 г/л, содержание сополимера – 76.7%) штамма-продуцента и высокую молекулярную массу сополимера ( $1.3 \times 10^6$ ). Биосинтез ПОБ4МВ был показан ранее с использованием различных продуцентов: *R. eutropha*, *Burkholderia* sp., *Chromobacterium* sp., однако, содержание полимера в клетках штаммов-продуцентов редко превышал 50%, а сам биотехнологический процесс требовал высокоспецифичных технических условий, что может существенно ограничивать использование этих методик для продукции новых

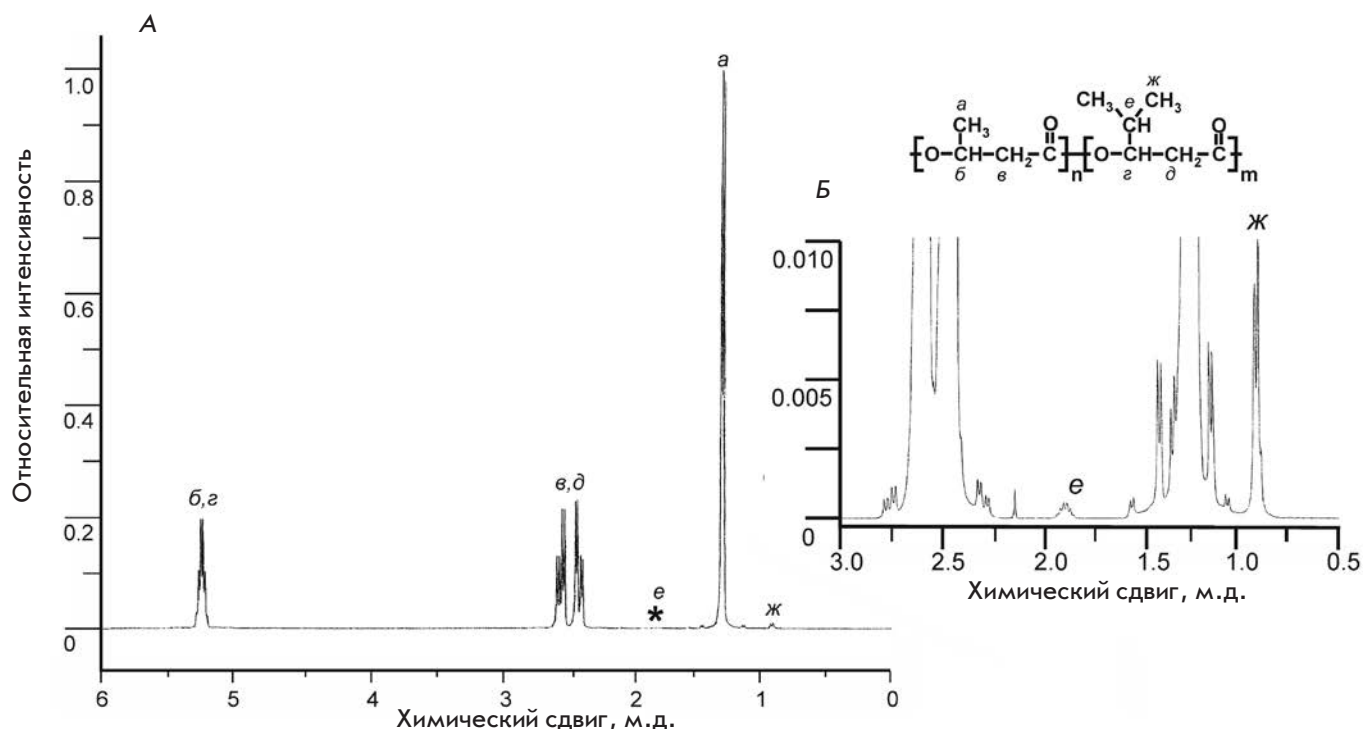


Рис. 2. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  500 МГц сополимера ПОБ4МВ. А – полимерная цепь ПОБ: а –  $\text{CH}_3(s)$ , б –  $\text{CH}(b)$ , в –  $\text{CH}_2(b)$ , полимерная цепь поли-3-окси-4-метилвалерата: г –  $\text{CH}_2(s)$ , д –  $\text{CH}_3(s)$ , е –  $\text{CH}(b)$ , ж –  $\text{CH}_2(b)$ ; \* увеличенный участок графика изображен на врезке (Б)

полимеров биомедицинского назначения. Вероятно, в связи с подобными препятствиями биосовместимость синтезированных по разработанным методикам сополимеров не тестировали [24–27]. Поэтому использование высокопродуктивных и неприхотливых к условиям культивирования штаммов-продуцентов для получения новых сополимеров, таких, как *A. chroococcum* 7Б [15, 29–31], представляется особенно важным.

Добавление в культуральную среду карбоновых кислот также вызывает изменение морфологии бактериальных клеток (рис. 3). *A. chroococcum* характеризуется высокой склонностью к плеоморфизму клеток, чем и может быть объяснен этот эффект. Так, если при добавлении валериановой кислоты в низких концентрациях (5 мМ) морфология клеток почти не изменялась, то добавление ВК в относительно высоких концентрациях (20 мМ) приводило к выраженному изменению клеточной морфологии – коккоидные клетки трансформировались в бациллярные формы (рис. 3Б). Добавление 20 мМ ГК приводило даже к возникновению нитеобразных клеток, хотя коккоидные и бациллярные формы также присутствовали (рис. 3В). Такое влияние карбоновых кислот на морфологию бактериальных клеток сходно

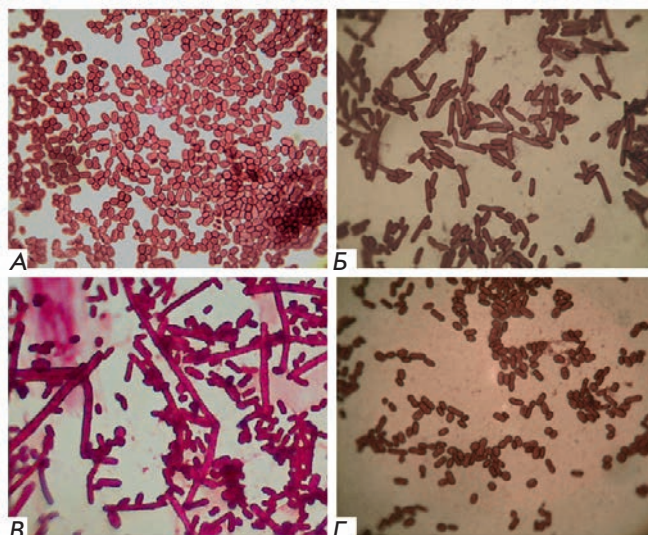


Рис. 3. Влияние добавления карбоновых кислот в культуральную среду на морфологию клеток штамма-продуцента *A. chroococcum* (световая микроскопия,  $\times 900$ ). А – С + 5 мМ ВК (добавка через 12 ч), через 72 ч культивирования; Б – С + 20 мМ ВК (добавка на 0 ч), через 72 ч культивирования; В – С + 20 мМ ГК (добавка через 12 ч), через 72 ч культивирования; Г – С + 20 мМ 4МВК (добавка через 12 ч), через 72 ч культивирования



Таблица 2. Физико-химические свойства сополимеров ПОБ, полученных в клетках *A. chroococcum* 7Б

Полимер	Химический состав			Физико-термические свойства			Гидрофильность
	Содержание ЗОВ/304МВ, мол. %	Молекулярная масса, кДа	$M_w/M_n$	Температура плавления (нач. и пик) ( $T_{пл}^0 / T_{пл}^{пик}$ , °C)	Температура кристаллизации (нач. и пик) ( $T_{кр}^{пик}$ , °C)	Кристалличность ( $X_c$ ), %	Контактный угол смачивания, град
ПОБ	0	1710	1.7	166.8/176.9	62.2	86.6*/74.7**	$70.1 \pm 2.6$
ПОБВ1	2.5	1290	1.9	166.0/174.8	60.3	56.4/52.8	$70.7 \pm 2.2$
ПОБВ2	7.8	1020	1.8	161.2/169.0	66.3	47.5/45.2	$76.4 \pm 2.3^*$
ПОБ4МВ	0.6	1300	2.0	169.9/177.3	75.1	58.0/49.6	$75.1 \pm 1.1^*$

\*Расчет по первому циклу прогрева.

\*\*Расчет по второму циклу прогрева.

Примечание. Во всех столбцах, кроме последнего, приведены как средние данные, вычисленные по трем измерениям; в последнем столбце «Контактный угол смачивания» – \* $p < 0.05$  при сравнении с группой ПОБ,  $n = 10$ .

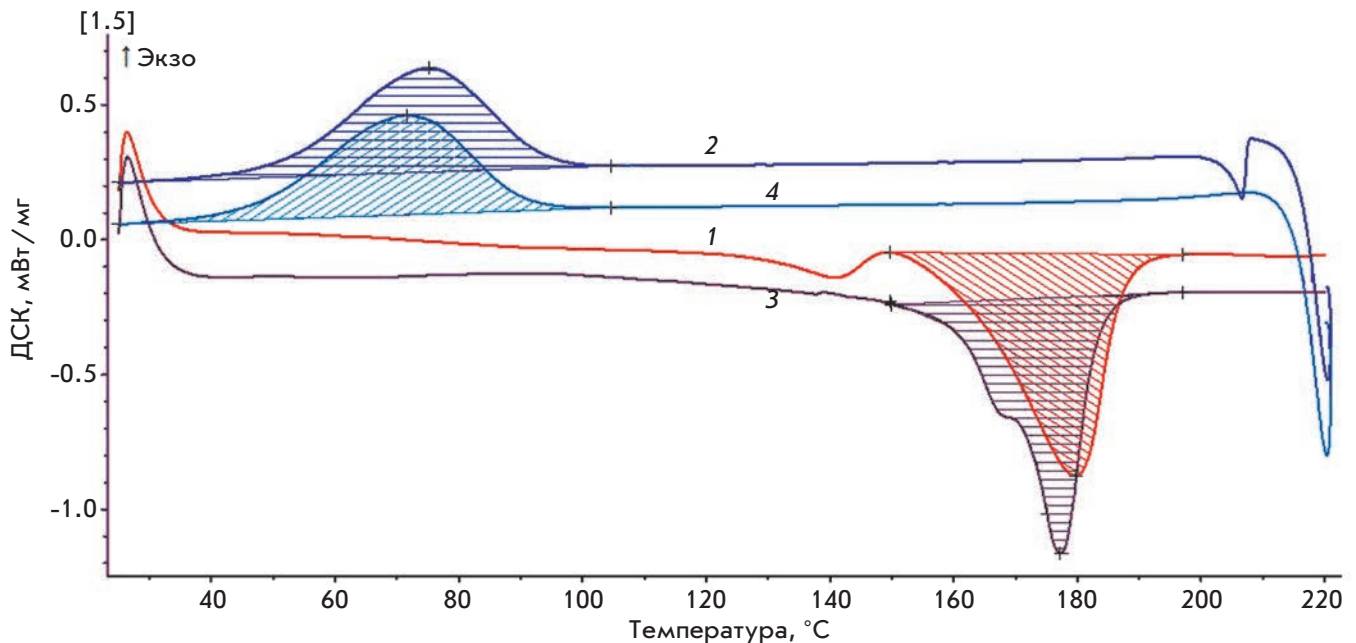


Рис. 4. ДСК-термограммы ПОБ4МВ, полученного путем биосинтеза *A. chroococcum* 7Б: 1 – кривая первого цикла нагрева; 2 – кривая первого цикла охлаждения; 3 – кривая второго цикла нагрева; 4 – кривая второго цикла охлаждения; заштрихованы площади пиков плавления и кристаллизации соответственно

с хорошо известным эффектом различных стрессиндуцирующих веществ (кислот, щелочей, пептона) на форму клеток [47, 48].

#### Исследование физико-химических свойств полимеров

Изучение физико-химических свойств полимеров, синтезируемых штаммом-продуцентом *A. chroococcum* 7Б, выявило значительное отличие физико-термических свойств и гидрофильности сополимеров ПОБ – ПОБВ1 (2.5 мол. % ЗОВ), ПОБВ2 (7.8

мол. % ЗОВ) и ПОБ4МВ от гомополимера ПОБ, несмотря на низкое молярное содержание ЗОВ и ЗО4МВ в сополимерах ПОБВ1 и ПОБ4МВ соответственно (табл. 2).

На рис. 4 представлены термограммы ДСК сополимеров ПОБВ и ПОБ4МВ в сравнении с ПОБ. Термограмма плавления полимеров содержит выраженные пики плавления полукристаллических полимеров и их кристаллизации. Пики плавления сополимеров ПОБВ и ПОБ4МВ в сравнении с гомополимером ПОБ характеризовались:

– незначительным изменением пика плавления, что свидетельствует об отсутствии значительного изменения температуры плавления сополимеров;

– смещением пика кристаллизации ПОБ4МВ в область более высоких температур, что свидетельствует об увеличении температуры кристаллизации этого сополимера;

– уменьшением площади пика плавления, что свидетельствует об уменьшении энтальпии плавления и соответственно кристалличности сополимеров.

Расчет физико-термических параметров, полученных из анализа данных ДСК-термограмм, приведен в табл. 2. Из табл. 2 следует, что сополимеры как ПОБВ, так и ПОБ4МВ обладают значительно меньшей степенью кристалличности, чем ПОБ (на 21.9 и 25.1% соответственно), причем у нового сополимера ПОБ4МВ степень падения кристалличности даже выше, чем у сополимера ПОБВ1, несмотря на то, что молярное содержание ЗО4МВ в ПОБ4МВ составляет всего 0.6 против 2.5% ЗОВ в сополимере ПОБВ, и сравнима со степенью кристалличности сополимера ПОБВ2, у которого молярное содержание ЗОВ составляет 7.8%. Частично такое падение кристалличности сополимеров может быть связано с более низкой их молекулярной массой (на более 300 кДа по сравнению с ПОБ). Сами показатели кристалличности (рассчитанные по первому и второму циклам прогрева полимерных образцов, табл. 2) соответствуют опубликованным данным [49]. Показано, что уменьшение молекулярной массы полимеров может приводить к довольно значительному (до 10% и более при уменьшении ММ в 2 раза) падению степени их кристалличности [49]. Однако основной вклад в падение степени кристалличности вносят мономеры (ЗОВ и ЗО4МВ) в сополимерах с более длинной боковой группой, чем у ЗОВ. Это подтверждает данные о том, что введение мономеров ЗОВ в полимерную цепь ПОБ приводит к получению сополимера с измененными физико-химическими свойствами: с более низкой температурой плавления, с меньшей кристалличностью, более пластичного, менее прочного и обладающего большей скоростью биodeградации [22, 32], причем кристалличность сополимера ПОБВ значительно падает при увеличении молярного содержания мономеров ЗОВ в составе его цепи [32]. Однако в случае ПОБ4МВ мы наблюдаем гораздо более выраженный эффект: по своим физико-химическим свойствам сополимер ПОБ4МВ с молярным содержанием ЗО4МВ всего 0.6% соответствует сополимеру ПОБВ с молярным содержанием от 2.5 до 7.8%. Аналогичную картину мы наблюдаем при анализе гидрофильности полимеров. Если контактный угол смачивания (как показатель гидрофильности поверхности полимеров) гомополимера ПОБ и его сополиме-

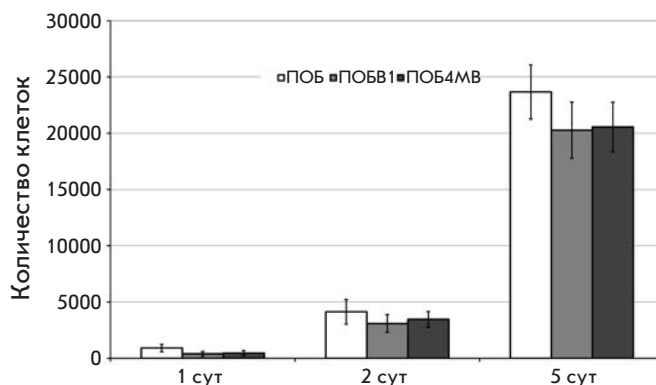


Рис. 5. Динамика изменения количества жизнеспособных стромальных клеток костного мозга крыс, культивируемых на полимерных пленках ПОБ, ПОВВ1 и ПОВ4МВ по данным теста ХТТ. \* $p < 0.05$  при сравнении с группой ПОБ,  $n = 6$

ра ПОВВ1 не различались, то у сополимеров ПОВВ2 и ПОВ4МВ этот показатель был значительно выше, но при этом контактный угол смачивания у ПОВ4МВ был лишь незначительно ниже ПОВВ2. Ранее показали, что контактный угол смачивания сополимера ПОВВ возрастает при увеличении в нем молярного содержания мономеров ЗОВ, а гидрофильность полимерной пленки падает из-за увеличения концентрации гидрофобных групп на ее поверхности [50]. Таким образом, по данным анализа гидрофильности полимеров сополимер ПОВ4МВ с содержанием ЗО4МВ всего 0.6% соответствует сополимеру ПОВВ с молярным содержанием от 2.5 до 7.8%. Это может быть связано с гораздо более выраженным дестабилизирующим влиянием вилокобразной боковой группы остатков ЗО4МВ на кристаллическую структуру полимера по сравнению с эффектом линейной группы ЗОВ в сополимере ПОВВ (рис. 1), что и объясняет столь непропорционально большой вклад столь низкого содержания ЗО4МВ в изменение физико-химических свойств полимера.

#### Исследование роста стромальных клеток на пленках из полимеров

Изучение биосовместимости *in vitro* полимеров, полученных путем биосинтеза в клетках *A. chroococcum* 7Б с использованием культуры выделенных из костного мозга стромальных клеток, выявило значительное увеличение количества жизнеспособных СК на пленках из трех полимеров: ПОБ, ПОВВ1 (2.5 мол. % ЗОВ) и ПОВ4МВ в течение 5 сут. Не наблюдали статистических различий в пролиферации клеток на пленках из различных полимеров. Таким образом, новый сополимер ПОВ4МВ можно

использовать для биомедицинских разработок и исследований наряду с его аналогами – ПОБ и ПОБВ, в частности, для изготовления матриц, применяемых в инженерии костной ткани [51, 52].

## ВЫВОДЫ

Нами показано, что добавление 4-метилвалериановой кислоты в культуральную среду штамма-продуцента *A. chroococcum* 7Б приводит к включению в полимерную цепь ПОБ мономеров 6С-оксикарбоновой кислоты – 3-окси-4-метилвалерата, и синтезу сополимера поли-3-оксипропионат-со-3-окси-4-метилвалерат. Несмотря на малое молярное содержание 3О4МВ в составе полученного сополимера, по своим физико-химическим свойствам ПОБ4МВ, содержащий всего 0.6% 3О4МВ, соответствовал со-

полимеру ПОБВ с молярным содержанием от 2.5 до 7.8% 3О4МВ. Рост СК, определенный по тесту ХТТ, на сополимере ПОБ4МВ *in vitro* не отличался статистически значимо от их роста на ПОБ и ПОБВ, что позволяет использовать его в биомедицинских разработках и исследованиях. ●

*Авторы благодарят В.О. Попова (Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН) за поддержку работы. В работе использовано оборудование центров коллективного пользования МГУ и ФИЦ ФОБ РАН.*

*Работа поддержана грантом РФФИ офи-м, проект № 15-29-04856.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Biomedical polymers / Ed. Jenkins M. Birmingham, UK: University of Birmingham, 2007. 203 p.
- Shtilman M.I. Polymeric biomaterials. Part 1. Polymer implants. VSP: Leiden, Netherlands, 2003. 294 p.
- Moisenovich M.M., Pustovalova O., Shackelford J., Vasiljeva T.V., Druzhinina T.V., Kamenchuk Y.A., Guzeev V.V., Sokolova O.S., Bogush V.G., Debabov V.G., et al. // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 15. P. 3887–3898.
- Satyam A., Kumar P., Fan X., Gorelov A., Rochev Y., Joshi L., Peinado H., Lyden D., Thomas B., Rodriguez B., et al. // *Advanced Materials*. 2014. V. 26. № 19. P. 3024–3034.
- Miroiu F.M., Stefan N., Visan A.I., Nita C., Luculescu C.R., Rasoga O., Socol M., Zgura I., Cristescu R., Craciun D., et al. // *Appl. Surface Sci*. 2015. V. 355. P. 1123–1131.
- Baradaran-Rafii A., Biazar E., Heidari-Keshel S. // *ASAIO J*. 2015. V. 61. № 5. P. 605–612.
- Bondar O.V., Saifullina D.V., Shakhmaeva I.I., Mavlyutova I.I., Abdullin T.I. // *Acta Naturae*. 2012. V. 4. № 1. P. 78–81.
- Ulasov A.V., Khrantsov Y.V., Trusov G.A., Rosenkranz A.A., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. // *Mol. Therapy*. 2011. V. 19. № 1. P. 103–112.
- Kolotova E.S., Egorova S.G., Ramonova A.A., Bogorodski S.E., Popov V.K., Agapov I.I., Kirpichnikov M.P. // *Acta Naturae*. 2012. V. 4. № 1. P. 101–106.
- Agrawal C.M., Athanasiou K.A. // *J. Biomed. Mater. Res*. 1997. V. 38. P. 105–114.
- Stevanovic M., Pavlovic V., Petkovic J., Filipic M., Uskokovic D. // *Express Polymer. Lett*. 2011. V. 5. № 11. P. 996–1008.
- Киреев В.В. Высокомолекулярные соединения. М.: Высшая школа, 1992. 512 с.
- Volova T., Shishatskaya E., Mogilnaya O., Sevastianov V., Efremov S. // *Biochem. Engin. J*. 2003. V. 16. № 2. P. 125–133.
- Sevastianov V.I., Perova N.V., Shishatskaya E.I., Kalacheva G.S., Volova T.G. // *J. Biomat. Sci. Polymer Ed*. 2003. V. 14. № 10. P. 1029–1042.
- Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. // *Биомед. химия*. 2011. V. 57. № 4. P. 374–391.
- Singh M., Kumar P., Ray S., Kalia V.C. // *Ind. J. Microbiol*. 2015. V. 55. № 3. P. 235–249.
- Shtukenberg A.G., Punin Y.O., Gunn E., Kahr B. // *Chem. Rev*. 2012. V. 112. № 3. P. 1805–1838.
- Chardron S., Bruzard S., Lignot B., Elain A., Sire O. // *Polymer Testing*. 2010. V. 29. № 8. P. 966–971.
- Bonartsev A.P., Boskhomdgiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Filatova E.A., Ivanov E.A., et al. // *Mol. Crystals Liquid Crystals*. 2012. V. 556. № 1. P. 288–300.
- Engelberg I., Kohn J. // *Biomater*. 1991. V. 12. P. 292–304.
- Прудскова Т.Н., Кириллович В.И., Заковряшина Н.А., Ермилина Н.И., Андреева Т.И., Бонарцева Г.А., Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Попов В.О. // Патент РФ на изобретение № 2333962. 17.10.2006.
- Pearce R.P., Marchessault R.H. // *Macromol*. 1994. V. 27. P. 3869–3874.
- Pettinari M.J., Vazquez G.J., Silberschmidt D., Rehm B., Steinbüchel A., Mendez B.S. // *Appl. Environ. Microbiol*. 2001. V. 67. № 11. P. 5331–5334.
- Lau N.S., Tsuge T., Sudesh K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2011. V. 89. № 5. P. 1599–1609.
- Saika A., Watanabe Y., Sudesh K., Tsuge T. // *J. Biosci. Bioeng*. 2014. V. 117. № 6. P. 670–675.
- Ling S.C., Tsuge T., Sudesh K. // *J. Appl. Microbiol*. 2011. V. 111. № 3. P. 559–571.
- Tanadchangsaeng N., Tsuge T., Abe H. // *Biomacromolecules*. 2010. V. 11. № 6. P. 1615–1622.
- Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2008. V. 44. № 5. P. 533–538.
- Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Филатова Е.В., Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2010. V. 46. № 3. P. 1–8.
- Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhiiev A.P., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Kharitonova E.P., Samsonova O.V., Voinova V.V., et al. // *BMC Biochem*. 2013. V. 14. P. 12.
- Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Boskhomdzhiiev A.P., Zharkova I.I., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Charitonova E.P., Samsonova O.V., Zernov A.L., et al. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. e57200.
- Savenkova L., Gercberga Z., Bibers I., Kalnin M. // *Proc. Biochem*. 2000. V. 36. № 5. P. 445–450.

33. Zheng Z., Bei F.F., Tian H.L., Chen G.Q. // *Biomaterials*. 2005. V. 26. № 17. P. 3537–3548.
34. Barham P.J., Keller A., Otun E.L., Holmes P.A. // *J. Materials Sci.* 1984. V. 19. № 9. P. 2781–2794.
35. Maniatopoulos C., Sodek J., Melcher A.H. // *Cell Tissue Res.* 1998. V. 254. № 2. P. 317–330.
36. Sutherland M.W., Learmonth B.A. // *Free Rad. Res.* 1997. V. 27. № 3. P. 283–289.
37. Senior P.J., Dawes E.A. // *Biochem. J.* 1973. V. 134. P. 225–238.
38. Madison L.L., Huisman G.W. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1999. V. 63. № 1. P. 21–53.
39. Ren Q., Siervo N., Kellerhals M., Kessler B., Witholt B. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. № 4. P. 1311–1320.
40. Elsayed N.S., Aboshanab K.M., Aboulwafa M.M., Hassouna N.A. // *African J. Microbiol. Res.* 2013. V. 7. № 43. P. 5025–5035.
41. Pramanik N., Mukherjee K., Nandy A., Mukherjee S., Kundu P.P. // *J. Appl. Polym. Sci.* 2014. V. 131. № 22. P. 41080.
42. Xin J., Zhang Y., Dong J., Song H., Xia C.G. // *African J. Biotechnol.* 2011. V. 10. № 36. P. 7078–7087.
43. Karthikeyan O.P., Chidambarampadmavathy K., Nadarajan S., Lee P.K., Heimann K. // *Chemosphere.* 2015. V. 141. P. 235–242.
44. Zhu C., Chiu S., Nakas J.P., Nomura C.T. // *J. Appl. Polym. Sci.* 2013. V. 130. № 1. P. 1–13.
45. Pena C., Castillo T., Garcia A., Millán M., Segura D. // *Microbial Biotechnol.* 2014. V. 7. № 4. P. 278–293.
46. Pena C., Lopez S., Garcia A., Espín G., Romo-Uribe A., Segura D. // *Ann. Microbiol.* 2014. V. 64. № 4. P. 39–47.
47. Eisenstark A., McMahon K.J., Eisenstark R. // *J. Bacteriol.* 1950. V. 59. № 1. P. 75–81.
48. Vela G.R., Rosenthal R.S. // *J. Bacteriol.* 1972. V. 111. № 1. P. 260–266.
49. Dominguez-Diaz M., Meneses-Acosta A., Romo-Uribe A., Pena C., Segura D., Espin G. // *European Polymer J.* 2015. V. 63. P. 101–112.
50. Choi G.G., Kim H.W., Rhee Y.H. // *J. Microbiol.* 2004. V. 42. № 4. P. 346–352.
51. Andreeva N.V., Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Makhina T.K., Myshkina V.L., Kharitonova E.P., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Belyavskii A.V. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015. V. 159. № 4. P. 567–571.
52. Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Zernov A.L., Kudryashova K.S., Feofanov A.V., Akulina E.A., Ivanova E.V., et al. // *J. Biomaterials Tissue Engin.* 2016. V. 6. № 1. P. 42–52.