

## Синтез и исследование многокомпонентных полигидроксиалканоатов

Т.Г.Волова, П.В.Миронов, А.Д.Васильев

---

С использованием бактерий *Wautersia eutropha* B5786 в специализированном режиме ферментации на смешанном углеродном субстрате с регламентируемыми добавками в качестве ко-субстрата солей алкановых кислот синтезировано семейство пятикомпонентных полигидроксиалканоатов (ПГА), образованных коротко- и среднецепочечными мономерами с длиной C-цепи от C<sub>4</sub> до C<sub>8</sub> (C<sub>4</sub>-гидроксибутират, C<sub>5</sub>-гидроксивалерат, C<sub>6</sub>-гидросигексаноат, C<sub>7</sub>-гидросигепатоат, C<sub>8</sub>-гидроксиоктаноат) и исследованы физико-химические свойства. В образцах ПГА с макровключениями гидросигексаноата с ростом молярной фракции этого мономера (от 2,5 до 18,0 мол.%) зарегистрировано снижение степени кристалличности от 72 до 57 %. Температурные характеристики многокомпонентных ПГА, температура плавления ( $T_{пл}$ ) и температура разложения ( $T_{разл}$ ), ниже по сравнению с характеристиками у полигидроксибутирата, для которого эти показатели составляют, соответственно, 168 – 170 и 260 – 265 °С. У многокомпонентных полимеров (ПГА<sub>кц+сц</sub>) с ростом молярной фракции гидросигексаноата оба параметра снижаются; в изученном диапазоне включения этого мономера — до 156 и 252 °С, соответственно. Влияние гидросигексаноата на исследованные физико-химические свойства ПГА аналогичны влиянию гидроксивалерата; с ростом фракции этих среднецепочечных мономеров в ПГА кристалличность полимеров снижается при сохранении термостабильности.

---

### Введение

Анализ литературы свидетельствует об активном развитии работ, направленных на синтез и изучение полимеров на основе производных карбоновых кислот. Наряду с полилактидами и полигликолидами из полиэфиров, способных к биоразложению, особое место занимают полигидроксиалканоаты (ПГА) — полимеры микробиологического происхождения. Среди известных ПГА — полиэферы различной химической структуры, от высококристаллических термопластов до термолабильных резиноподобных эластомеров [1,2]. ПГА подразделяют на три группы — короткоцепочечные (ПГА<sub>кц</sub>), среднецепочечные (ПГА<sub>сц</sub>) и длинноцепочечные (ПГА<sub>дц</sub>). ПГА<sub>кц</sub> состоят из мономеров с длиной углеродной цепи от трех до пяти атомов (C<sub>3</sub>–C<sub>5</sub>), ПГА<sub>сц</sub> — от C<sub>6</sub> до C<sub>14</sub> и ПГА<sub>дц</sub> — свыше C<sub>17</sub> и C<sub>18</sub> [3]. Особо ценным в ПГА является возможность синтеза полимеров различного состава, то есть управления их свойствами. Однако для этого необходимы фундаментальные знания о

закономерностях синтеза ПГА того или иного состава и о влиянии химической структуры полимеров на физико-химические свойства.

Наиболее изученными являются короткоцепочечные ПГА — полигидроксибутират (ПГБ) и сополимеры гидроксibuтирата с гидроксивалератом. Активные исследования ПГА<sub>сц</sub> и ПГА<sub>дц</sub> начаты сравнительно недавно, при этом крайне мало данных о многокомпонентных ПГА новых типов, состоящих из коротко- и среднецепочечных мономеров (ПГА<sub>кц+сц</sub>) [1,2]. Способность к синтезу ПГА<sub>кц+сц</sub>, несмотря на охарактеризованное многообразие продуцентов ПГА (свыше 300), обнаружена у небольшого числа видов. Среди природных организмов — *Pseudomonas sp.* A33 и *Pseudomonas putida* GPO-1, синтезирующие среднецепочечные ПГА различного состава [4,5]; *Thiocapsa pfennigii*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*, синтезирующие сополимеры гидроксibuтирата и гидросигексаноата [6,7]; *Aeromonas punctata* и *Ralstonia eutropha*

(недавно переименованные *Wautersia eutropha* [8]), синтезирующие ПГА, состоящие из мономеров с длиной С-цепи от С<sub>4</sub> до С<sub>8</sub> [3,9]. Для этого также конструируют генетически модифицированные продуценты, например, известны штаммы *Pseudomonas* с клонированными генами синтеза ПГА из *Ralstonia*; *Ralstonia* с геном синтазы из *Pseudomonas*; *E. coli* с генами синтеза ПГА из *Aeromonas* и *Ralstonia*, синтезирующие сополимеры оксибутирата и оксигексаноата [10, 11, 12]; *R. eutropha*, содержащий гены синтазы из *Pseudomonas fluorescens* GK-13, аккумулярующий ПГА из мономеров с длиной углеродной цепи от С<sub>4</sub> до С<sub>12</sub> [13]; *Wautersia eutropha* с клонированными генами из *Pseudomonas sp.* 61-3, синтезирующий гидроксibuтират с гидроксioктаноатом [14].

Бактерии *Wautersia eutropha* относят к наиболее перспективным продуцентам ПГА, так как они синтезируют полимеры различной химической структуры (ПГА<sub>КЦ</sub> и ПГА<sub>КЦ+СЦ</sub>) с высокими выходами (до 80–90 %) на различных субстратах (смесь водорода и углекислоты, сахарах, органических кислотах, спиртах, отходах промышленных и сельскохозяйственных производств).

Целью исследований было получение многокомпонентных полигироксиалканоатов, содержащих мономеры коротко- и среднецепочечных мономеров и исследование физико-химических свойств.

### Объекты и методы

Для синтеза ПГА бактерии *W. eutropha* B5786 выращивали в строго стерильных условиях в периодической культуре в разработанном ранее режиме синтеза ПГА [2] с использованием автоматизированного ферментационного комплекса Bio-Flo 110 ("New Brunswick Sci, Inc.", США) в 10-литровом ферментере (объем культуры 5 л). При автотрофном режиме контроль компонентов газовой смеси (СО<sub>2</sub>, О<sub>2</sub>, Н<sub>2</sub>) проводили с помощью серийных газоанализаторов и хроматографически (хроматограф ЛХМ-80, Россия), детектор катарометр; при гетеротрофном режиме концентрацию фруктозы в культуре регистрировали на портативном флуориметре ИГП-01 (Россия). Использована стандартная солевая среда на основе фосфатного буфера с лимитированной подачей NH<sub>4</sub>Cl. Для синтеза многокомпонентных полимеров в качестве ко-субстратов дополнительно в культуральную среду вносили валерат, гексаноат, гептаноат или октаноат (реагенты фирмы "Sigma") в концентрации 0,5 – 2,0 г/л. Концентрацию ко-субстратов определяли газовой хроматографией после экстракции гексаном из проб

культуральной среды (рН 4,5 – 5,0); в качестве внутреннего стандарта использовали соответствующие алкановые кислоты. Регистрировали накопление биомассы в культуре по весу сухого вещества и измерением оптической плотности культуры. Общее содержание полимера в биомассе и состав мономеров определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза проб сухой биомассы на хромато-масс-спектрометре GSD plus (Hewlett Packard, USA). Экстракцию полимера и липидов из биомассы проводили хлороформ-этанольной смесью (2:1 по объему) с последующим отделением полимера от липидов осаждением гексаном. Анализ химической структуры выделенного полимера выполняли аналогичным образом на хроматомасс-спектрометре.

Молекулярную массу полимеров (M<sub>в</sub>) определяли на вискозиметре Убеллоде, диаметр капилляра 0,34 мм при 30 °С. Использовали растворы ПГА в хлороформе с концентрацией полимера (С, г/л) 0,25 – 1,0. По экспериментальным данным времени истечения растворителя и исследуемых растворов полимеров различной концентрации рассчитывали соответствующие значения относительной (η<sub>отн</sub>), удельной (η<sub>уд</sub>) вязкости, а также отношения η<sub>уд</sub>/С. Далее строили график зависимости η<sub>уд</sub>/С от концентрации полимера в растворе (С). Экстраполируя результаты к величине С, равной 0, получали значение характеристической вязкости [η], которая пропорциональна величине M<sub>в</sub>.

Для исследования температурных характеристик и степени кристалличности использовали образцы ПГА в виде пленок, полученных методом полива из растворов. Температурные характеристики измерены методом дериватографии на приборе фирмы MOM (Венгрия) при одновременной регистрации кривых дифференциального термического анализа (ДТА), термогравиметрии (ТГ) и деривативной термогравиметрии (ДТГ). Образцы пленок толщиной 0,1 мм из ПГА разного состава помещали в платиновые тигли; анализ проводили в среде инертного газа в диапазоне изменения температуры от 20 до 300 °С при скорости нагрева 5 °С/мин. Температуры плавления и разложения определяли как температуры максимумов теплопоглощения соответствующих эндотермических эффектов. Погрешность определения температур эндоэффектов по дериватограммам составляла ±1 °С.

Рентгеноструктурный анализ пленок, полученных из образцов ПГА разного состава, выполнен на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE фирмы Bruker (Германия) (графитовый монохроматор на отраженном пучке). Для определения степени

кристалличности  $C_x$  сняты спектры в пошаговом режиме ("scan-step") с шагом  $0,04^\circ$  и 2-секундной выдержкой для измерения интенсивности в точке (режим работы прибора  $40 \text{ кВ} \times 40 \text{ мкА}$ )

ИК-спектры поглощения пленочных образцов ПГА регистрировали с помощью ИК-Фурье-спектрометра "ИНФРАЛЮМ ФТ-02" фирмы Люмэкс (Россия).

### Результаты и обсуждение

В ходе исследований проанализировано содержание и состав ПГА в биомассе бактерий, культивируемых на смешанном углеродном субстрате, а также в выделенных из биомассы образцах полимера. Поэтому идентифицированные включения среднецепочечных мономеров в полимере являются истинными мономерами, чего нельзя категорично констатировать при анализе биомассы, так как гидроксипроизводные кислот могут циркулировать в клеточном пуле в качестве интермедиатов биосинтеза без включения в цепи полимера.

Нельзя не отметить, что синтез многокомпонентных ПГА — весьма сложная биотехнологическая задача. Для ее решения необходимо учитывать ряд факторов; первое, высокие выходы ПГА, за исключением *Alcaligenes latus*, невозможны в быстрорастущих культурах, поэтому необходимы специальные режимы, обеспечивающие высокие выходы полимеров при общей высокой продуктивности культуры по биомассе; второе, скорости синтеза мономеров с различной длиной С-цепи не совпадают, это сопровождается нестабильностью соотношения мономеров в ПГА в ходе культивирования микроорганизмов; третье, углеводородные кислоты, используемые в качестве ко-субстрата, токсичны для большинства микробных культур, поэтому необходимо нахождение ПДК по каждому ко-субстрату для каждого конкретного продуцента. Вследствие этого получение многокомпонентных ПГА в плотных культурах при высоком содержании ПГА в клетках (свыше 50–60%), в котором средне- и длинноцепочечные момеры включены в качестве основных мономеров, весьма проблематично.

При внесении дозированных добавок валерата в концентрации от 0,5 до 2,0 г/л в растущую при дефиците азота культуру *W. eutropha* B5786 спустя 12 ч фракция гидроксивалерата в полимере достигала от 35–40 до 60–70 мол.%. Дальнейшее культивирование сопровождалось увеличением урожая биомассы и накоплением полимера до 93% при перераспределении соотношения мономеров — фракция гидроксивалерата падала по мере длитель-

Таблица

Состав многокомпонентных ПГА, синтезированных *W. eutropha* B5786 и содержащих мономеры гидроксипропаната ( $C_4$ ), гидроксивалерата ( $C_5$ ), гидроксигексаноата ( $C_6$ ), гидроксигептаноата ( $C_7$ ) и гидроксооктаноата ( $C_8$ )

№ образца	Состав ПГА, мол.%				
	$C_4$	$C_5$	$C_6$	$C_7$	$C_8$
1	31,22	68,46	0,13	0,16	0,04
2	36,01	63,64	0,12	0,21	0,02
3	49,50	50,01	0,34	0,09	0,06
4	52,25	47,33	0,09	0,33	нет
5	59,36	40,48	0,07	0,09	0,1
6	77,41	4,3	18,0	нет	0,29
6'	81,81	3,69	13,8	нет	0,74
7	88,38	4,47	6,63	нет	0,52
8	90,63	2,29	6,52	нет	0,56
9	91,7	4,6	2,5	нет	1,2
10	41,94	56,30	0,71	0,98	0,06
11	93,31	3,34	2,38	нет	0,97
13	100	нет	нет	нет	нет

ности процесса на фоне увеличения фракции гидроксипропаната. В образцах ПГА в небольших количествах зафиксированы включения гидроксигексаноата, гидроксигептаноата и гидроксооктаноата, соответственно, 0,13–0,34; 0,09–0,33; 0,02–0,06 мол.%. При внесении в культуру гептаноата (ко-субстрата с четным числом атомов углерода в С-цепи) полимер также обогащался гидроксивалератом фракция которого в зависимости от количества внесенного в культуру гептаноата через 12 ч составляла от 44,6 до 60,6 мол.%. В полимере идентифицированы гидроксигептаноат (от 0,37 до 1,87 мол.%) и в следовых количествах - гидроксигексаноат и гидроксооктаноат (таблица). Максимальное включение гидроксивалерата составило от 57 до 69 мол.%. При внесении в среду гексаноата отмечено обогащение ПГА гидроксигексаноатом, включение которого через 12 ч после добавки ко-субстрата достигло от 13 до 18 мол.%. Кроме гидроксигексаноата, в полимере обнаружен другой среднецепочечный мономер с четным числом атомов углерода — гидроксооктаноат (от 0,29–1,20 мол.%). В ходе дальнейшего культивирования концентрация этих мономеров, так же как и в предыдущих опытах, падала на фоне аккумуляции полимера в клетках и увеличением в нем фракции гидроксипропаната.

Отмечено возрастание токсичности алкановых кислот с ростом длины С-цепи для бактерий. Так, после внесения в культуру бактерий октаноата в концентрации 0,5–1,0 г/л рост бактерий и синтез полимера приостанавливались. Только после снижения концентрации октаноата в культуре до 0,05 г/л отмечено увеличение урожая и концентрации ПГА в

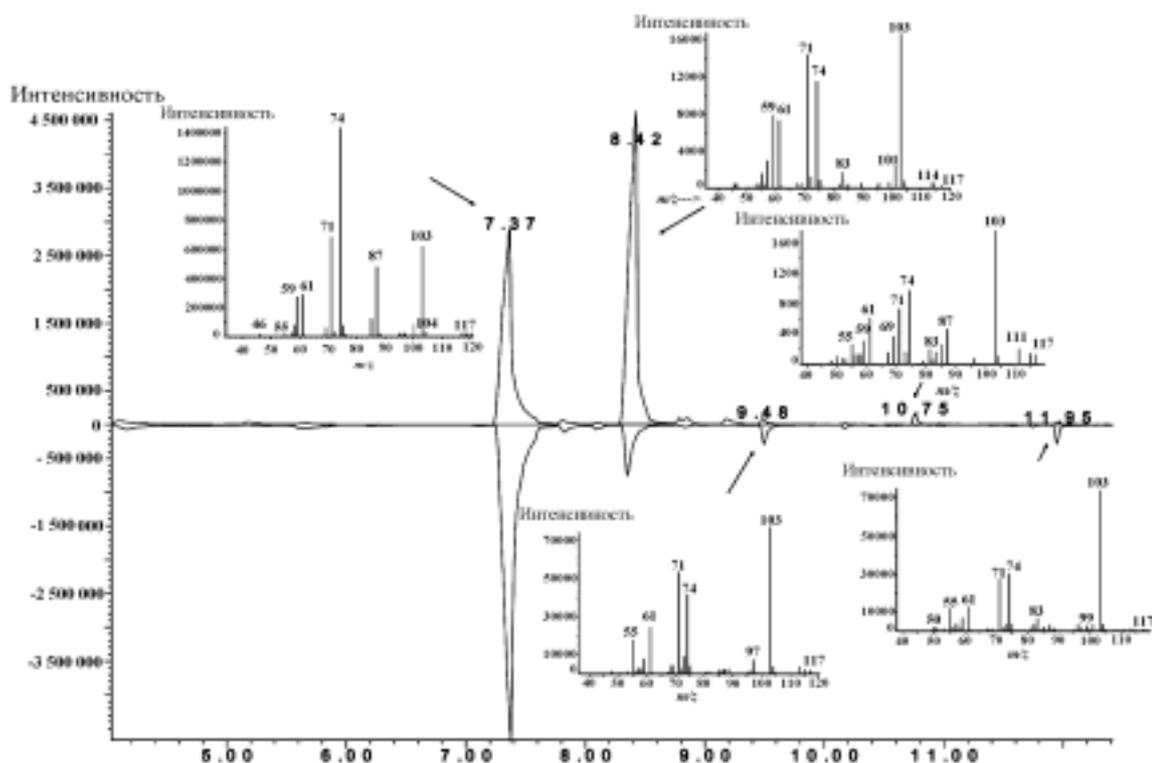


Рис.1 Ионные хроматограммы двух образцов многокомпонентных ПГА разного состава, синтезированных *W.eutropha* B5786 на среде с добавкой гептановой (верх) и октановой кислоты (зеркально внизу) и масс-спектры мономеров: гидроксибутирата; гидроксивалерата; гидроксигексаноата, гидроксигептаноата, гидроксиктаноата с временами удержания, соответственно, 7,37; 8,42; 9,48; 10,75; 11,95.

биомассе. Синтезированный полимер в основном был представлен фракцией гидроксибутирата (до 93,3 мол.%); содержание гидроксигексаноата и гидроксиктаноата было невысоким, соответственно, 2,38 и 0,97 мол.%. Увеличение длительности периода культивирования бактерий после добавки ко-субстрата характеризовалось накоплением гидроксибутирата в ПГА и снижением всех остальных фракций.

Таким образом, модифицируя режимы ферментации и углеродного питания, а именно, варьируя концентрацию ко-субстрата и длительность последующего культивационного цикла, получено семейство многокомпонентных ПГА различного состава с использованием одного природного микробиологического штамма. Химическая структура серии образцов ПГА, взятых для исследования, представлены в таблице. Многокомпонентные ПГА такого типа синтезированы с использованием *W. eutropha* впервые. На рис.1 в качестве примера приведена хроматограмма двух пятикомпонентных образцов ПГА, содержащих коротко- и среднецепочечные мономеры.

Результаты определения физико-химических свойств пятикомпонентных полимеров, в которых

доминирующими мономерами были среднецепочечные гидроксибутират (31,22 – 93,31 мол.%) и гидроксивалерат (40,48 – 68,46 мол.%) с небольшими включениями среднецепочечных гидроксигексаноата (0,07 – 0,34 мол.%), гидроксигептаноата (0,09 – 0,33 мол.%) и гидроксиктаноата (0,06 – 0,10 мол.%) (образцы №№ 1 – 5 и 11 – 12, таблица) подтвердили ранее полученные результаты о том, что включения гидроксивалерата в значительной мере вызывают перераспределение аморфной и упорядоченной фаз в полимере, снижая степень кристалличности. Однако эти изменения характерны только для диапазона включений гидроксивалерата от 5 – 10 до 25 – 30 мол.%, так как дальнейшее увеличение фракции гидроксивалерата не сопровождается изменением величины  $C_x$ . Действительно, образцы ПГА с содержанием гидроксивалерата 47,33; 50,01; 63,64 и 68,46 мол.% имели значения  $C_x$  около 50%. Присутствие среднецепочечных мономеров с длиной C-цепи  $C_6$ – $C_8$  в обозначенных количествах (таблица) на степень кристалличности ПГА не влияло. Выполненное нами ранее исследование трехкомпонентных образцов ПГА также показало, что включения гидроксигексаноата в концентрации до 2,4 мол.%

на соотношение аморфной и кристаллической фаз не влияет [6].

Наибольший интерес для исследования представляли образцы пятикомпонентных ПГА, содержащие в качестве макровключений, помимо гидроксисобутирата и гидроксивалерата, гидроксигексаноат. Следует отметить, что исследования ПГА, образованных коротко- и среднецепочечными мономерами, начаты только в самое последнее время после того, как несколькими исследовательским группам удалось синтезировать полимеры такого типа. Авторами работ [7, 13] показано, что увеличение фракции среднецепочечных мономеров в ПГА влияет на температуру плавления и степень кристалличности материала, снижая оба показателя.

При анализе рентгенспектров пятикомпонентных ПГА с макровключениями гидроксигексаноата получена четкая зависимость степени кристалличности полимера от величины включения гидроксигексаноата ( $C_x/C_6$ ) (рис.2). С увеличением содержания гидроксигексаноата в исследованном диапазоне (от 2,5 до 18,0 мол.%) степень кристалличности ПГА монотонно падала от 74 до 57%. Таким образом, включения гидроксигексаноата влияют на соотношения аморфной и кристаллической фаз в ПГА аналогично гидроксивалерату, выравнивая их соотношение. Это делает материал менее кристаллическим и более технологичным для переработки.

На полученных дериватограммах (в изученном диапазоне положительных температур) зафиксированы два четких эндотермических эффекта. Интервал температур пиков теплопоглощения составил в обоих случаях около 20°C. Первый эндозэффект не связан с изменением массы ПГА и идентифицирован как плавление закристаллизованной части полимерных образцов. Второй эндо-

термический эффект зарегистрирован в области температур, в которой происходит полное термическое разложение полимера. При этом кривые ДТА, ТГ и ДТГ не обнаружили существенных особенностей, свидетельствующих о неоднородности образцов или наличия фракций с иными температурами плавления и разложения или с различиями в скорости термораспада, что может свидетельствовать о хорошей совместности компонентов композиции. С увеличением фракции гидроксигексаноата в изученном диапазоне оба параметра (температура плавления и температура разложения) уменьшались, соответственно, от 163 и 263 до 156 и 252°C (рис.3). Следует отметить, что зарегистрировано практически одинаковое уменьшение обоих показателей ( $T_{пл}$  и  $T_{разл.}$ ). Следовательно разрыв между температурой плавления и термической деградацией полимера не сократился, что весьма важно для переработки ПГА термическими методами.

Как и в прежних работах [6, 11], разброс данных по величине молекулярной массы  $M_v$  для исследованной серии многокомпонентных ПГА оказался весьма значительным и составил от 150 – 200 до 450 – 800 кДа. Связи между химической структурой ПГА, наличием какого-либо мономера и величиной  $M_v$  не выявлено. Молекулярная масса ПГА, как известно, является весьма переменным параметром, величина которого зависит от многих факторов, включая источник углеродного питания для бактерий, длительность культивирования, технику экстракции полимера.

Для выявления возможных структурных отличий ПГА разного состава привлечена ИК-спектроскопия. ИК-спектры серии образцов (таблица) были сняты в диапазоне 500 – 4500  $cm^{-1}$ . Полученные ИК-спектры поглощения пятикомпонентных ПГА с различным

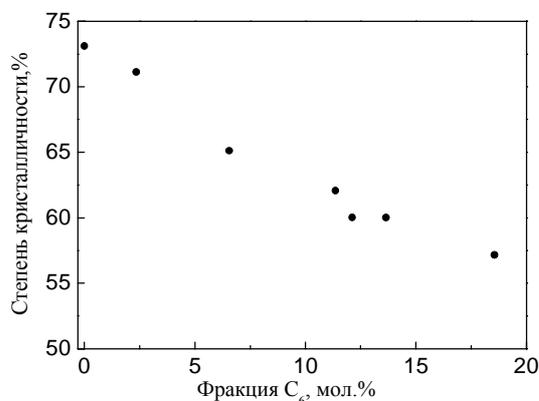


Рис.2 Зависимость степени кристалличности ПГА от величины фракции гидроксигексаноата.

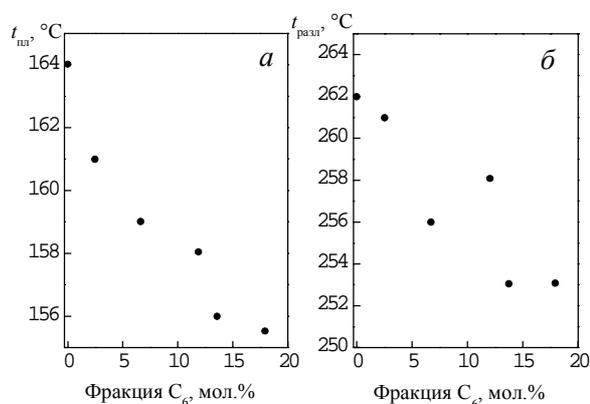


Рис.3 Зависимость температуры плавления (а) и температуры разложения (б) ПГА от величины фракции гидроксигексаноата.

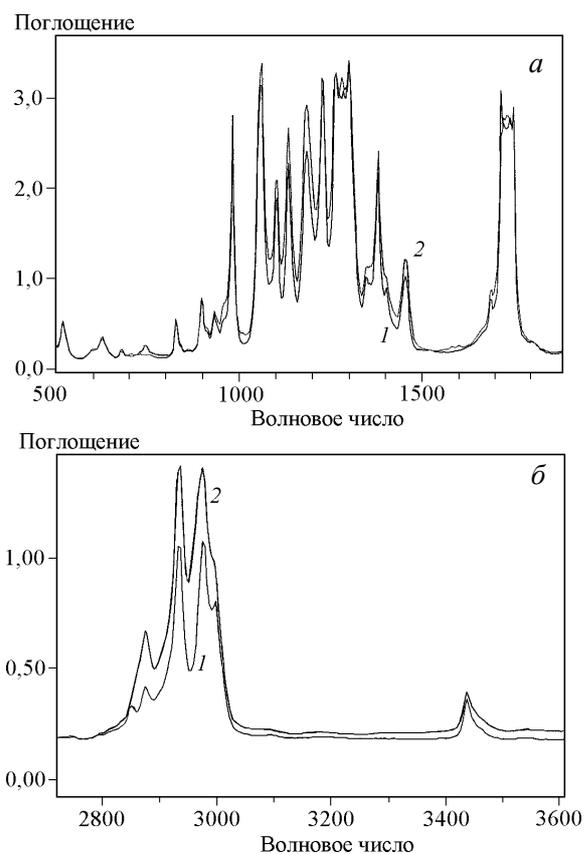


Рис.4 ИК-спектры полигидроксибутирата (1) и многокомпонентного образца ПГА с 18 мол.% гидроксигексаноата (2) в диапазоне  $500 - 1800 \text{ см}^{-1}$  (а) и  $2700 - 3600 \text{ см}^{-1}$  (б).

соотношением коротко- и среднецепочечных мономеров в сопоставлении с гомогенным полигидроксибутиратом вплоть до мелких деталей, совпали между собой и содержали полосы поглощения, соответствующие колебаниям основных структурных звеньев ПГА, кроме полос поглощения колебаний концевых С-ОН и СООН-групп. Во всех спектрах зарегистрированы полосы поглощения ассиметричных валентных колебаний  $\text{CH}_3$ - и  $\text{CH}_2$ -групп ( $2994, 2974, 2936 \text{ см}^{-1}$ ); валентные симметричные колебания  $\text{CH}$ - и  $\text{CH}_2$ -групп ( $2874, 2878 \text{ см}^{-1}$ ), а также валентные колебания карбонильных групп  $\text{C}=\text{O}$  ( $1700 - 1760 \text{ см}^{-1}$ ). Некоторые отличия выявлены при сравнении спектров полигидроксибутирата с пятикомпонентным ПГА с максимальным включением гидроксигексаноата (18 мол.%). На рисунке 4 для детализации приведены спектры в виде фрагментов, растянутых по оси волновых чисел в диапазонах  $500 - 1800 \text{ см}^{-1}$  (рис.4а) и  $2800 - 3000 \text{ см}^{-1}$  (рис.4б). Наиболее характерным отличием в ИК-спектрах многокомпонентного ПГА с 18 мол.% гидроксигексаноата от 100 %-го полигидроксибутирата является увеличение интенсивности полос поглощения в коротковолновой области спектра ( $2800 - 3000 \text{ см}^{-1}$ ). Эта особенность, скорее всего, связана с возрастанием доли валентных колебаний  $\text{C}-\text{H}$  и  $\text{C}-\text{H}_2$ -групп в образцах ПГА с макровключением гидроксигексаноата.

кисаноата от 100 %-го полигидроксибутирата является увеличение интенсивности полос поглощения в коротковолновой области спектра ( $2800 - 3000 \text{ см}^{-1}$ ). Эта особенность, скорее всего, связана с возрастанием доли валентных колебаний  $\text{C}-\text{H}$  и  $\text{C}-\text{H}_2$ -групп в образцах ПГА с макровключением гидроксигексаноата.

## Выводы

1. На базе природного штамма *Wautersia eutropha* B5786 в модифицированном режиме ферментации с регламентированной подачей в культуру в качестве ко-субстрата солей алкановых кислот впервые получено семейство многокомпонентных ПГА, образованных коротко- и среднецепочечными мономерами (ПГА<sub>КЦ+СЦ</sub>) с длиной С-цепи от  $\text{C}_4$  до  $\text{C}_8$ .

2. С ростом молярной фракции среднецепочечного мономера гидроксигексаноата в ПГА<sub>КЦ+СЦ</sub> от 2,5 до 18,0 мол.% зарегистрировано снижение степени кристалличности от 72 до 57 % и температуры плавления и температуры разложения от 165 и 265 до 156 и 252 °С, соответственно.

3. Влияние гидроксигексаноата на исследованные физико-химические свойства ПГА аналогичны влиянию гидроксивалерата; с ростом фракции этих среднецепочечных мономеров в ПГА кристалличность полимеров снижается при сохранении термостабильности, что повышает технологические свойства материала.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Американского фонда гражданских исследований и развития (CRDF) и Министерства образования РФ (грант № P1M0002), РФФИ (грант № 05-04-08024офи-а), Программы Президиума РАН "Фундаментальные науки — медицине" и Программы междисциплинарных интеграционных проектов СО РАН (проект № 24).*

## Литература

1. Sudesh K., Abe H., Doi Y. Prog. Polym. Sci., 2000, v.33, p.1503 - 1555.
2. Volova T.G. Microbial polyhydroxyalkanoates — plastic materials of the 21<sup>st</sup> century (biosynthesis, properties, applications). Nova Science Pub. Inc. NY, USA, 2004, 283 p.
3. Steinbüchel A., Valentin H.E. FEMS Microbiol Lett., 1995, v.128, p.219 - 228.
4. Lee S.Y., Chang H.N. Can J. Microbiol., 1995, v.41, Suppl 1, p.207 - 215.

5. Hartmann R., Hany R., Pletscher I.K. et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, v.93, no.3, p.737 – 746
6. Qiu Y., Han J., Chen G. *Appl. Genetics and Mol. Biotechnol.*, 2006, v.69, p.537 – 542.
7. Zhang S., Kolvek S., Goodwin S., Lenz R.W. *Biomacromol.*, 2004, v.5, p.40 – 48.
8. Vanechoutte M., Kampf P., De Baere T. et al. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, v.54 (Pt 2), p.317 – 327.
9. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Плотников В.Ф., *Микробиология*. 1998, т.67, с.512 – 517.
10. Lu X., Wu Q., Zhang W. et al. *Biothechnol. Prog.*, 2004, v.20, p.1332 – 1336.
11. Loo C.Y., Lee W.H., Tsuge T. et al. *Biotechnol. Lett.*, 2005, v.18, p.1405 – 1410.
12. Qiu Y., Han J., Chen G. *Appl. Genetics and Mol. Biotechnol.*, 2006, v.69, p.537 – 542.
13. Noda I., Green Ph., Satkowski M. et al. *Biomacromol.*, 2005, v.6, p.580 – 586.
14. Delamarre S.C., Batt C.A. *Appl Microbial Biotechnol.*, 2006, v.15, p.1 – 12
15. Волова Т.Г., Плотников В.Ф., Шишацкая Е.И. и др. *Перспективные материалы*, 2004, №3, с.42 – 48.
16. Волова Т.Г., Плотников В.Ф., Шишацкая Е.И. и др. *Биофизика*, 2004, т.49, №6, с.1038 – 1046.

**Волова Татьяна Григорьевна** — Институт биофизики СО РАН, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по науке, заведующая лабораторией. Специалист в области микробной физиологии и биотехнологии (биосинтез, получение и изучение целевых продуктов, включая биополимеры).

**Мионов Петр Викторович** — Сибирский государственный технологический университет, доктор химических наук, профессор. Специалист в области физико-химических свойств биологических макромолекул (ИК-спектроскопия, термический анализ).

**Васильев Александр Дмитриевич** — Институт физики им. Л.В.Киренского СО РАН, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник. Специалист в области исследования физико-химических свойств материалов (рентгеноструктурный анализ).