
СТРАНИЧКА МОЛОДОГО УЧЕНОГО

УДК 579.66

Синтез биodeградируемых биополимеров с улучшенными эксплуатационными свойствамиО. Н. ВИНОГРАДОВА^{1,2}, Д. А. СЫРВАЧЕВА²¹*Институт биофизики Сибирского отделения РАН, Академгородок, 50, стр. 50, Красноярск 660036 (Россия)*²*Сибирский федеральный университет, проспект Свободный, 79, Красноярск 660041 (Россия)**E-mail: SyrvachevaDA@yandex.ru*

(Поступила 07.04.14; после доработки 22.04.14)

Аннотация

Показана актуальность исследований, ориентированных на создание экологически чистых, биоразрушаемых в природной среде полимерных материалов, в том числе биополимеров природного происхождения – полигидроксиалканоатов. Получены коротко- и среднецепочечные образцы полигидроксиалканоатов новой химической структуры с различным сочетанием фракций 3- и 4-гидроксибутирата или 3-гидроксигексаноата. Исследованы физико-химические и механические свойства сополимерных образцов полигидроксиалканоатов.

Ключевые слова: разрушаемые биополимеры, полигидроксиалканоаты, ПГА, сополимеры, 3-гидроксибутират, 4-гидроксибутират, 3-гидроксигексаноат, химический состав, свойства

ВВЕДЕНИЕ

Производство и потребление химических веществ, получаемых из невозобновляемых природных ресурсов, сопровождается увеличением объемов не утилизируемых отходов, что противоречит принципам охраны окружающей среды [1]. Объемы выпуска неразрушаемых синтетических пластмасс достигают почти 300 млн т/год, и основная их часть скапливается на свалках [2]. Под полигоны и свалки отходов отчуждаются плодородные земли; полиэтиленовый мусор выводит из строя канализационные и дренажные системы городов, загрязняет водоемы, представ-

ляя серьезную угрозу для качества воды и биоты Мирового океана [3, 4]. Один из путей снижения антропогенного давления на экосистемы – замена синтетических полимеров новыми материалами, которые подвержены биологической деградации и разлагаются в естественной среде до безвредных для окружающей среды продуктов, вовлекаясь в глобальные круговоротные циклы [5].

В этом плане перспективны биоразрушаемые полимеры монокарбоновых кислот, среди которых по объемам производства и масштабам применения лидируют полилактиды и полигликолиды. На втором месте по значимости и активности изучения стоят полигид-

роксиалканоаты (ПГА) – семейство полимеров микробиологического происхождения, которые по прочности и термоустойчивости превосходят полилактиды [6–9].

Среди ПГА наиболее полно изучен гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты (поли-3-гидроксibuтират, П(ЗГБ)) – высококристаллический термопласт (степень кристалличности выше 70 %). Недостаток П(ЗГБ) заключается в том, что он не кристаллизуется упорядоченно, его сложно перерабатывать, а изделия из него характеризуются низкой ударной прочностью, жесткостью и “старятся” во времени [9, 10]. Сополимерные ПГА более перспективны, однако их получение невозможно без фундаментальных знаний о закономерностях структурно-функциональной организации клеточного цикла синтеза ПГА и зависимости физико-химических и механических свойств полимеров от химического состава.

Биополимеры ПГА, обладающие свойствами эластомеров, помимо 3-гидроксibuтирата (ЗГБ) содержат мономеры 4-гидроксibuтирата (4ГБ) и 3-гидроксигексаноата (ЗГГ). Однако для синтеза этих сополимеров необходимы субстраты-предшественники (γ -бутиролактон, соли гексановой кислоты), токсичные для большинства микроорганизмов. В этой связи для синтеза сополимеров П(ЗГБ/4ГБ) и П(ЗГБ/ЗГГ) необходимы специализированные штаммы-продуценты и особые условия их выращивания. Сотрудники Института биофизики СО РАН и Сибирского федерального университета (Красноярск) исследовали и реализовали технологии синтеза сополимерных ПГА различной химической структуры, в том числе с содержанием мономеров 4ГБ и ЗГГ не более 20–25 мол. % [11, 12].

Цель работы – изучение механических и физико-химических свойств сополимеров П(ЗГБ/4ГБ) и П(ЗГБ/ЗГГ), синтезированных мутантным штаммом *Cupriavidus eutrophus* B10646, который обладает способностью синтезировать ПГА с высокими выходами и толерантностью к субстратам-предшественникам этих полимеров [13].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследован штамм водородокисляющих бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 [14], который культивировали в строго стерильном

периодическом режиме на термостатируемой качалке New Brunswic (США) в стеклянных колбах вместимостью 1.0–2.0 л, с коэффициентом заполнения 0.5 в минеральной солевой среде Шлегеля, г/л: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 9.1, KH_2PO_4 1.5, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025. Источником железа служил раствор железа лимонно-кислого (5 г/л), который добавляли из расчета 5 мл/л. Микроэлементы вводили в среду по прописи Хоагланда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов имел следующий состав, г/л: H_3BO_3 0.228, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 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, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05, NiCl 0.008. В гетеротрофных условиях выращивания бактерий использовали фруктозу или масляную кислоту. Применяли разработанный ранее режим культивирования бактерий с лимитированием роста по азоту на первом этапе (0.4–0.5 г/л NH_4Cl), в безазотной среде – на втором, при pH 7.0 и 30 °C [15]. Для стимулирования образования мономеров 4ГБ или ЗГГ и синтеза сополимеров П(ЗГБ/4ГБ) или П(ЗГБ/ЗГГ) в состав среды в качестве предшественника мономеров 4ГБ вносили γ -бутиролактон (Fluka, Германия), в качестве предшественника мономеров ЗГГ – соли 3-гексановой кислоты (Sigma, США). Длительность культивирования бактерий в отдельных экспериментах достигала 168 ч. Подачу γ -бутиролактона или гексаноата натрия в культуру варьировали как по количеству, так и по концентрации добавок.

Концентрацию фруктозы в среде определяли резорциновым методом [16]. Урожай биомассы регистрировали по массе сухого вещества и оптическим показателям культуры. Содержание сополимера в клетках определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза биомассы на хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 5975C (Agilent, США); в качестве внутреннего стандарта использовали бензойную кислоту.

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение ПГА исследовали с использованием хроматографа для гельпроницающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия) с использованием калибровочных стандартов Agilent PS-N

EasiVial. Определяли средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность ($ПД = M_w/M_n$).

Рентгеноструктурный анализ и определение степени кристалличности образцов ПГА выполнены с использованием рентгеноспектрометра D8 Advance Bruker (Германия) (графитовый монохроматор на отраженном пучке).

Термические свойства биополимеров исследованы методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с помощью прибора Mettler Toledo (Швейцария).

Механические свойства пленок определены с помощью электромеханической разрывной машины Instron 5565 (Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием специализированного режима периодического выращивания бактерий при стабилизации в культуре бактерий концентрации γ -бутиролактона или гексаната натрия в пределах ПДК, установленных для штамма, синтезирована линейка сополимеров с различным соотношением ЗГБ и второго мономера (4ГБ или ЗГГ) (табл. 1).

По ряду показателей в зависимости от типа второго мономера и его содержания сополимеры отличались от гомогенного П(ЗГБ).

Видно, что степень кристалличности сополимерных образцов ПГА значительно ниже в сравнении с гомогенным П(ЗГБ). С увеличе-

нием доли мономеров ЗГГ до 56.0 мол. % или 4ГБ до 48.3 мол. % степень кристалличности снижалась до 44 или до 17 % соответственно. Значения средневесовой молекулярной массы для сополимеров составляли от 309 до 732 кДа, что ниже по сравнению с таковой для П(ЗГБ) (920 кДа). Температурные параметры сополимеров П(ЗГБ/4ГБ) и П(ЗГБ/ЗГГ) оказались незначительно меньше (см. табл. 1).

Для исследования механических свойств сополимеров изготовлены плотные гладкие пленки из 1.5 % раствора полимера с различным соотношением мономеров 4ГБ и ЗГГ. Пленочные образцы ПГА имели более высокие показатели удлинения при разрыве по сравнению с пленками, изготовленными из высококристаллического П(ЗГБ). Наиболее критично на этот показатель влияло наличие в составе ПГА мономеров 4ГБ: в среднем удлинение при разрыве для П(ЗГБ/4ГБ) превышало 43 %, а для образцов с П(ЗГГ) оно составляло 13 %. Модуль Юнга для всех сополимерных образцов значительно ниже, чем для П(ЗГБ) (2071.2). Выявлена зависимость модуля Юнга и напряжения при разрыве от состава сополимеров. С увеличением содержания мономеров ЗГГ в сополимерах модуль Юнга уменьшался с 1390 до 311 МПа, а напряжение при разрыве – с 19.5 до 6.6 МПа. В то же время для образцов, содержащих мономер 4ГБ, получена иная зависимость. При высоком содержании в сополимерах мономеров 4ГБ (36.3 и 48.3 мол. %) их механические

ТАБЛИЦА 1

Состав, физико-химические и механические свойства сополимеров П(ЗГБ/4ГБ) и П(ЗГБ/ЗГГ) с различным соотношением мономеров

Состав ПГА, мол. %			$T_{пл}$	$T_{дегр}$	C_x	M_w	ПД	Модуль Юнга,	Напряжение	Удлинение
ЗГБ	4ГБ	ЗГГ	°С	°С	%	кДа		МПа	при разрыве, МПа	при разрыве, %
100	0	0	178	295	76	920	2.52	2071.20	16.70	2.50
63.7	36.3	0	169	288	21	435	3.37	13.28	1.74	43.49
51.7	48.3	0	168	289	17	525	3.50	14.60	1.29	38.49
46.5	53.5	0	170	289	36	732	4.28	94.81	4.89	41.47
70.0	0	30.0	173	283	58	578	5.66	1390.00	19.50	3.00
57.5	0	42.5	175	281	54	309	3.86	940.00	18.00	5.00
45.0	0	56.0	172	280	44	697	4.17	311.00	6.60	13.00

Примечание. $T_{пл}$ – температура плавления сополимера; $T_{дегр}$ – температура термической деградации; C_x – степень кристалличности образцов ПГА; M_w – средневесовая молекулярная масса; ПД – полидисперсность.

характеристики близки, в то же время при увеличении содержания 4ГБ до 53,5 мол. % возрастали модуль Юнга и напряжение при разрыве.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые синтезированы и исследованы сополимерные ПГА. Установлено, что, изменяя набор и соотношение мономеров, можно получать сополимеры с улучшенными физико-химическими и механическими характеристиками, которые более пригодны для переработки в изделия для биомедицины по сравнению с 3ГБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Kijchavengkul T., Auras R. // *Polym. Int.* 2008. Vol. 57. P. 793–804.
- 2 Киселев Е. Г., Шишацкий О. Н. // *Химия уст. разв.* 2012. № 20, Т. 6 С. 727–730.
- 3 Moore C., Moore S., Leecaster M., Weisberg S. // *Mar. Pollut. Bull.* 2001. Vol. 42. P. 1297–1300.
- 4 Tanabe S., Watanabe M., Minh T., Kunisue T., Nakanishi S. // *Environ. Sci. Technol.* 2004. Vol. 38. P. 403–413.
- 5 Chanprateep S. // *J. Biosci. Bioeng.* 2010. Vol. 110. P. 621–632.
- 6 Chen G-Q. *Industrial Production of PHA. Microbiol. Monogr. Plastics from Bacteria. Natural Functions and applications* / G-Q. Chen, A. Steinbüchel (Eds.). Springer, 2010. P. 121–132.
URL: <http://www.slideshare.net/coleman2/plastics-from-bacteria-natural-functions-and-applications-microbiology-monographs-volume-14>.
- 7 Sudesh K., Abe H. *Practical Guide to Microbial. Polyhydroxyalkanoates*. UK: Smithers Rapra Technology, 2010. P. 160.
- 8 Volova T. G. *Polyhydroxyalkanoates – Plastic Materials of the 21st Century: Production, Properties, Application*. NY: Nova Sci. Publ. Inc., 2004. P. 383.
- 9 Volova T. G., Shishatskaya E. I., Sinskey A. J. *Degradable Polymers: Production, Properties and Applications*. USA: Nova Sci. Publ. Inc., 2013. P. 380.
- 10 Laycock B., Halley P., Pratt S., Werker A., Lant P. // *Prog. Polym. Sci.* 2013. Vol. 38. P. 536–583.
- 11 Volova T. G., Kalacheva G. S., Steinbüchel A. // *Macromol. Symp.* 2008. Vol. 269. P. 1–7.
- 12 Волова Т. Г., Жила Н. О., Калачева Г. С., Соколенко В. А., Сински Э. Дж. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2011. Т. 47. С. 544–550.
- 13 Пат. 2439143 РФ, 2010.
- 14 Пат. 2053292 РФ, 1992.
- 15 Волова Т. Г., Калачева Г. С., Константинова В. М., Пузырь А. П. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 1992. Т. 28, № 2. С. 221–229.
- 16 Ермаков А. И., Арасимович В. В., Смирнова-Иконникова М. И., Ярош Н. П., Луковникова Г. А. // *Методы биохимического исследования растений*. Л.: Колос. 1972. 456 с.