

УДК 631.46:579.8

БИОСИНТЕЗ СОПОЛИМЕРА ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА-3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТА ШТАММОМ *Azotobacter chroococcum* 7Б

© 2010 г. В. Л. Мышкина, Е. А. Иванов, Д. А. Николаева, Т. К. Махина, А. П. Бонарцев, Е. В. Филатова, А. О. Ружицкий, Г. А. Бонарцева

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071

e-mail: bonar@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 25.05.2009 г.

Исследована способность штамма *Azotobacter chroococcum* 7Б, продуцента полигидроксибутирата (ПГБ), синтезировать его сополимер-поли-3-гидроксибутират-3-гидроксивалерат (ПГБ-ГВ). Впервые показано, что штамм *A. chroococcum* 7Б способен синтезировать ПГБ-ГВ с разным молярным процентом включения гидроксивалерата (ГВ) в полимерную цепь при росте на среде с сахарозой с добавлением карбоновых кислот в качестве предшественников звеньев ГВ в цепи ПГБ: валериановой (от 13.1 до 21.6 мол. %), пропионовой (3.1 мол. %) и гексановой (2.1 мол. %) кислот. Качественное и функциональное различие между ПГБ и ПГБ-ГВ показано на примере оценки кинетики выхода метилового красного из пленок, изготовленных на основе синтезированных полимеров. Максимальное включение ГВ в полимерную цепь (28.8 мол. %) отмечено при дополнительном внесении в питательную среду 0.1% пептона на фоне 20 мМ валерата. Полученные данные позволяют рассматривать штамм в качестве потенциального продуцента не только ПГБ, но и ПГБ-ГВ.

Интерес к бактериальному полимеру класса полигидроксиалканоатов (ПГА) — полигидроксибутирату (ПГБ) и его сополимерам определяется прежде всего тем, что по своим основным показателям эти полимеры близки к синтетическим термопластикам, но обладают такими уникальными свойствами как высокая биосовместимость с органами и тканями организма и способность к биодеградации с образованием нетоксичных продуктов. Охарактеризовано свыше 300 продуцентов ПГА, около 100 различных гидроксиалкановых кислот (помимо 3-гидроксимасляной кислоты) обнаружены в качестве компонентов ПГА [1], активно изучается влияние условий углеродного питания на синтез ПГА в связи с возможностью синтеза не только однокомпонентных, но и многокомпонентных ПГА, состоящих из коротко- и средне-цепочечных мономеров с длиной цепи от C4 до C16. ПГА, включающих в себя мономеры с длиной цепи больше, чем C16 не обнаружено. Показано, что основная роль в формировании состава ПГА принадлежит ко-субстрату — алкановым кислотам, а на количественный выход ПГА существенно влияют пептон и соединения фосфора [2–5].

Как правило, для получения сополимера путем микробиологического синтеза, в качестве основных либо дополнительных источников углерода используют органические кислоты или спирты с нечетным числом атомов углерода: в процессе метаболизма они превращаются в 5-углеродное соединение — валерил-КоА, который

используется на синтез 3-гидроксивалерата (ГВ) [6]. Так, метилотрофная бактерия *Methylobacterium extorquens* синтезирует сополимер ПГБ-ГВ при росте на метаноле с использованием пропанола, пропионата, пентанола и валерата в качестве ко-субстратов [7]. Однако некоторые микроорганизмы синтезируют только ПГБ, даже если их культивировать на источниках с нечетным числом атомов углерода. Например, большинство серных пурпурных бактерий не включают ГВ в состав полимера при использовании в качестве источников углерода пропионата, валерата и гептаноата [8].

Наиболее изучен на сегодняшний день и уже выпускается компанией “Monsanto” (США) под торговой маркой Биопол сополимер ПГБ-ГВ (продуцент — промышленный штамм *Ralstonia eutropha*). По литературным данным, бактерии рода *Azotobacter* также способны к синтезу сополимера ПГБ-ГВ [9, 10]. Для штамма *A. vinelandii* UWD основным источником ГВ в составе сополимера служит β-окисление n-алканоатов с нечетным числом атомов углерода, при этом в качестве основного источника углерода используется сахароза. Валериановая кислота включается в состав сополимера через путь β-окисления: валерил-КоА > 3-кетовалерил-КоА > D-3-гидрокси-валерил-КоА > ГВ, то есть 3-кетовалерил-КоА, промежуточный продукт β-окисления валериановой кислоты, не расщепляется далее на ацетил-КоА и пропионил-КоА, а направляется на синтез ПГА при участии ацетоацетил-КоА-редуктазы [10, 11]. *A. vinelandii* штамм UWD синтезирует со-

полимер ПГБ-ГВ при росте на валериановой, гептановой и нонановой кислотах, но включает лишь следовые (<1%) количества ГВ при росте на пропионовой кислоте. Другой вид азотобактера — *A. salinestrus* способен синтезировать ПГБ с молярным включением ГВ до 10% при выращивании только на сахарах, без добавления валериановой кислоты [12]. Недавно индийскими исследователями [13] выделен штамм *A. chroococcum*, штамм MAL-201, способный синтезировать сополимер с одновременным включением в сополимер ГВ и полиэтиленгликоля (ПГБ-ГВ-ПЭГ) при выращивании на среде с глюкозой при дополнительном введении натриевой соли валериановой кислоты и ПЭГ.

Введение ГВ в гомополимерную цепь ПГБ существенно улучшает физико-химические свойства сополимера. Температура плавления ПГБ-ГВ ниже, чем у ПГБ, что позволяет увеличить технологическое “окно перерабатываемости” — т.е. разницу между температурой плавления и температурой начала термического разложения; он более пластичен, растяжим и эластичен за счет снижения величины модуля Юнга с увеличением молярной доли ГВ в полимерной цепи ПГБ-ГВ, поэтому полимер может иметь более широкое практическое применение [14–18]. В последнее время ПГБ и его сополимеры привлекают большое внимание в качестве потенциальных материалов для создания полимерных систем с контролируемым выходом лекарственных веществ [19–21].

Цель работы — исследовать возможность биосинтеза сополимера ПГБ-ГВ штаммом *A. chroococcum* 7Б при его культивировании на среде с сахарозой при дополнительном внесении карбоновых кислот; определить молярный процент включения ГВ в полимерную цепь ПГБ-ГВ; оценить качественное и функциональное различие между синтезированными сополимером и гомополимером на примере сравнения кинетики высвобождения включенного в полимерную матрицу модельного лекарственного вещества.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Использовали штамм *A. chroococcum* 7Б — продуцент биоразлагаемого термопластика ПГБ, способный к сверхсинтезу ПГБ — до 80% от сухого веса клеток.

Условия выращивания. Штамм выделен из ризосферы пшеницы (дерново-подзолистая почва); поддерживался на среде Эшби (г/л): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.2, $NaCl$ — 0.2, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 0.006, $CaCO_3$ — 5.0, сахароза — 20, агар — 20. Все опыты проводили в лабораторных условиях. Для синтеза ПГБ-ГВ в клетках культуру выращивали в качалочных колбах (объем среды в колбе — 100 мл) при 30°C на среде Берка (г/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.4, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.01,

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 0.006, цитрат Na — 0.5, $CaCl_2$ — 0.1, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 1.05, KH_2PO_4 — 0.2, сахароза — 30. Пептон добавляли в концентрации 0.1%. В качестве предшественников звеньев ГВ в цепи ПГБ карбоновые кислоты (валериановую, пропионовую, гексановую, октановую, нонановую, додекановую) добавляли в питательную среду в концентрации 10 и 20 мМ в виде натриевой соли после 10 ч инкубации культуры [22], продолжительность опыта 48 ч.

Микроскопирование. Использовали световой микроскоп Биомед 1 (“Биомед”, Россия).

Оптическая плотность. Измерение проводили нефелометрическим методом на ФЭК 56 (Россия), кювета с длиной оптического пути 1 мм, светофильтр № 6.

Исследование состава полимера методом газожидкостной хроматографии ГЖХ. Во флаконах с закручивающейся крышкой объемом 8 мл растворяли 4 мг образца в 2 мл хлороформа, добавляли 2 мл 3%-ного раствора серной кислоты в метиловом спирте, перемешивали, выдерживали в термостате при 70°C в течение 3.5 ч, затем охлаждали до комнатной температуры, промывали водой до pH среды 7. Нижний слой отбирали в отдельную емкость и содержащиеся в растворе хлороформа метиловые эфиры анализировали на хроматографе Shimadzu 2010 (Япония) с масс селективным детектором QR 2010; колонка капиллярная MDN-1 (твердосвязанный метилсиликон), длина 30 м, диаметр — 0.25 мм. Режим хроматографирования: термостат 100°C, инжектор 200°C, деление потока 1 : 10, интерфейс 210°C, детектор 200°C, газ-носитель — гелий 0.8 мл/мин; градиент температур: 100°C 2 мин, затем 5 град/мин до 120°C и 20 град/мин до 260°C, далее изотерма 2 мин. Режим детектора — идентификация масс от 33 до 250 m/z.

Исследование состава полимера методом ядерно-магнитного резонанса (ЯМР). Спектры 1H -ЯМР 1–2%-ных растворов ПГБ и ПГБ-ГВ в дейтерированном хлороформе получены на спектрометре MSL-300 (“Bruker”, Германия). Рабочая частота — 300 МГц. Химические сдвиги отсчитывали от сигнала остаточных протонов $CDCl_3$ -7.20 ppm. Количество накоплений NS = 40. Процентное содержание элементарных звеньев ГВ в сополимере ПГБ-ГВ рассчитывали по соотношению интегральной интенсивности сигнала метильной группы ГВ (0.89 ppm) к сумме интегральных интенсивностей сигналов метильной группы ГВ и метильной группы гидроксibuтирата (1.27 ppm).

Изготовление пленок ПГА матричного типа с включением лекарственного вещества. Использовали 4 образца полимера: 1) ПГБ с мол. массой 1220 кДа; 2) ПГБ 340 кДа; 3) П(ГБ-ГВ 2.5%) 820 кДа; 4) П(ГБ-ГВ 17%) 1300 кДа. Пленки изготавливали методом налива раствора полимера в

Таблица 1. Образование сополимера ПГБ-ГВ *A. chroococcum* 7Б на среде с сахарозой при добавлении карбоновых кислот

Субстрат	Урожай биомассы, г/л среды	Общее содержание ПГА, % от веса сухих клеток	Содержание ГВ, мол. %	Молекулярная масса ПГА, кДа
Сахароза (С), 3%	7.9	81.3	0	1650
С + пропионовая кислота 20 мМ	2.3	63.9	3.1	914
С + валериановая кислота 10 мМ	4.5	75.8	13.1	1490
С + валериановая кислота 20 мМ	3.2	72.3	21.6	1300
С + гексановая кислота 10 мМ	3.5	67.7	2.1	не определяли
С + гептановая кислота 10 мМ	3.9	60.0	следы	»
С + октановая кислота 10 мМ	3.7	60.2	0	»
С + нонановая кислота 10 мМ	6.8	67.4	0	»
С + додекановая кислота 10 мМ	2.1	61.1	0	»
С + пропионовая кислота 10 мМ + + уксусная кислота 20 мМ	2.5	65.0	2.5	820

хлороформе (1% вес/объем) в чашки Петри с последующим выпариванием растворителя при комнатной температуре. Раствор модельного лекарственного вещества – метилового красного в хлороформе смешивали с раствором полимера перед отливом пленок. Содержание метилового красного в пленках ПГБ и ПГБ-ГВ составляло 4% w/w. Толщина пленок 20 мкм. Кусочки пленки одинаковой формы весом 20 мг помещали в стеклянные флаконы, содержащие 30 мл 0.1 М фосфатного буфера (рН 7.4). Флаконы помещали на качалку 250 об/мин при 37°C. Для регистрации высвобождения метилового красного в динамике отбирали пробы раствора и измеряли содержание метилового красного спектрофотометрически при 430 нм на спектрофотометре DU-650 (“Beckman”, США).

Получение высокоочищенного ПГБ и ПГБ-ГВ из бактериальной массы. Процесс выделения и очистки полимера из биомассы *Azotobacter chroococcum* включал следующие стадии: 1) выделение ПГБ и ПГБ-ГВ экстракцией хлороформом при встряхивания на качалке в течение 12 ч при 37°C; 2) отделение раствора ПГБ и ПГБ-ГВ от клеточных остатков фильтрованием; 3) выделение ПГБ и ПГБ-ГВ из раствора хлороформа осаждением изопропиловым спиртом; 4) последующее многократное растворение в хлороформе и осаждение изопропанолом; 5) высушивание при 60°C.

Определение молекулярной массы ПГБ и ПГБ-ГВ. Использовали капиллярный стеклянный вискозиметр Уббелоде (диаметр капилляра 0.56 мм) [23]. Для измерения вязкости в вискозиметр заливали 10 мл раствора и помещали строго верти-

кально в термостат. Вязкость определяли при $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$. До измерения времени истечения раствор термостатировали 15–20 мин. Среднее время истечения раствора ПГБ и ПГБ-ГВ в хлороформе определяли 4–6-кратно. При определении характеристической вязкости измерения проводили для 4–5 концентраций раствора. Различные концентрации ПГБ и ПГБ-ГВ получали путем разбавления исходного раствора наибольшей концентрации хлороформом. Концентрация исследуемых образцов находилась в пределах 50–200 мг/100 мл хлороформа. Время истечения растворов составляло от 40 до 115 с. Удельную вязкость рассчитывали по формуле: $\eta_{\text{уд}} = (t - t_0)/t_0$, где: t_0 – время истечения растворителя, с; t – время истечения раствора полимера, с.

Мол. массу вычисляли по уравнению Марка–Хаувинка–Куна [24].

Для определения характеристической вязкости $[\eta]$ экспериментально полученные числовые значения отражали в системе координат, откладывая по оси абсцисс концентрацию раствора полимера C , по оси ординат – значения приведенной вязкости ($\eta_{\text{уд}}/C$). Экстраполируя полученную прямую на ось ординат, получали значение $[\eta]$, точность определения составляла ~1%. Точность определения мол. массы, вычисленной по уравнению Марка–Хаувинка–Куна, составляла 2–5%.

Количество опытов – 5. Повторность в каждом из вариантов опыта трехкратная. В таблицах приведены средние данные.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние карбоновых кислот на рост и содержание ПГБ и ПГБ-ГВ в клетках. Результаты по включению ГВ в ПГБ-ГВ получены с использованием двух методов: ГЖХ и ^1H -ЯМР. В табл. 1 представлены результаты по биосинтезу ПГБ-ГВ культурой *A. chroococcum* 7Б при ее выращивании на среде с сахарозой в качестве основного источника углерода и ряда карбоновых кислот в качестве дополнительного источника углерода для синтеза сополимера. Данные получены методом ГЖХ. Включение ГВ в состав сополимера наблюдалось при использовании валериановой, пропионовой и гексановой кислот. Наилучшие результаты получены при выращивании культуры на среде с сахарозой при добавлении 20 мМ и 10 мМ валериановой кислоты. В этих вариантах был получен сополимер ПГБ-ГВ с высоким содержанием ГВ-21.6 и 13.1 мол. % соответственно. Однако необходимо отметить, что добавление валериановой кислоты приводило к ингибированию роста культуры. Так, если в контрольном варианте при росте культуры на сахарозе урожай биомассы был 7.9 г/л, то при добавлении 20 и 10 мМ валериановой кислоты урожай биомассы значительно снижался и составил 3.2 и 4.5 г/л соответственно. При добавлении в питательную среду пропионовой и гексановой кислот также наблюдали синтез ПГБ-ГВ, однако молярный % включения ГВ в ПГБ был значительно ниже: при добавлении пропионовой кислоты в концентрации 20 мМ – 3.1, а при добавлении гексановой кислоты в концентрации 10 мМ – 2.1 мол. %. Мол. масса синтезированного сополимера ПГБ-ГВ была ниже, чем гомополимера ПГБ, что вероятно, связано с добавлением к ростовой сахаросодержащей среде органических кислот. Из табл. 1 видно, что при добавлении валериановой кислоты в концентрациях 10 и 20 мМ, 20 мМ пропионовой кислоты, совместном внесении 10 мМ пропионовой и 20 мМ уксусной кислот мол. масса ПГБ-ГВ составляла 1490, 1300, 914 и 820 кДа соответственно. Ранее нами [25, 26] было отмечено снижение мол. массы гомополимера ПГБ при росте *A. chroococcum* 7Б на фоне дополнительного внесения органических кислот в среду, содержащую сахар и на среде с мелассой, содержащей примеси органических кислот.

Данные по включению ГВ в состав ПГБ у азотобактера и изменению мол. массы сополимера отмечены рядом исследователей [2, 4, 10, 13]. Наиболее близка к полученным нами результатам работа [10], в которой отмечено, что добавление к среде культивирования *A. vinelandii* UWD 10, 20 и 30 мМ валерата, как и в наших исследованиях, приводило к формированию полимера с высоким содержанием ГВ – 18, 22 и 25 мол. % соответственно и ингибированию роста культуры с воз-

растанием концентрации валерата в среде. При росте штамма *A. vinelandii* UWD на пропионовой кислоте ГВ также включался в полимерную цепь, образуя ПГБ-ГВ. Молярный процент включения ГВ как и в наших исследованиях был низок – меньше 1%. Наиболее известные продуценты ПОА – *Ralstonia eutropha* и *Alcaligenes latus* на среде с пропионатом также синтезировали сополимер с меньшим процентным содержанием ГВ в полимерной цепи, чем на среде с валератом. Путь синтеза ПГБ-ГВ в присутствии пропионата происходит при участии 3-кетотиолазы путем конденсации ацетил-КоА и пропионил-КоА с образованием 3-кетовалерил-КоА, восстанавливаемого затем в 3-гидроксивалерил-КоА, который, в свою очередь, является субстратом ПГА-полимеразы [27–29]. Все полученные нами образцы сополимера ПГБ-ГВ были дополнительно проверены на включение ГВ в ПГБ методом ^1H -ЯМР. Проведенные исследования подтвердили вхождение валериановой кислоты в ПГБ. Результаты включения ГВ в ПГБ, полученные методом ^1H -ЯМР, практически не отличались от результатов по молярному % включению ГВ в ПГБ-ГВ, полученных методом ГЖХ. На рис. 1 и 2 представлены спектры ^1H -ЯМР образцов сополимера с максимальным включением ГВ в ПГБ-ГВ 17 мол. % (вариант с внесением 20 мМ валерата) и минимальным включением ГВ в ПГБ-ГВ 2.5% (вариант с внесением 20 мМ пропионата), а также гомополимера ПГБ (вариант с сахарозой). На рис. 1 (а, б) в спектре присутствовал сигнал метильной группы 3-ГВ при величине химического сдвига 0.89 ppm, тогда как в спектре гомополимера ПГБ (рис. 1в) этот сигнал отсутствовал. На рис. 2 (а, б, в) представлены результаты наличия ГВ в цепи полимера тех же вариантов, но при использовании метода ГЖХ. В варианте с внесением 20 мМ валерата вхождение ГВ в ПГБ составляло 21.6 мол. %, а при внесении 20 мМ пропионата – 3.1 мол. %. В контрольном варианте чистого ПГБ пик, соответствующий валерату, отсутствовал.

Таким образом, при добавлении в среду культивирования валериановой пропионовой и гексановой кислот может быть получен сополимер ПГБ-ГВ с разным молярным процентным включением ГВ в полимерную цепь. Свойства полученных нами сополимеров с разным содержанием ГВ (мол. %) в ПГБ, по литературным данным [16, 26], находятся в широком диапазоне термомеханических свойств: температура плавления 145 (20 мол. % ГВ) – 170°C (3 мол. % ГВ), модуль Юнга 1.2 (20 мол. % ГВ) – 2.9 ГПа (3 мол. % ГВ), кристалличность 50 (20 мол. % ГВ) – 69 (3 мол. % ГВ), прочность на растяжение 32 (20 мол. % ГВ) – 38 МПа (3 мол. % ГВ) по сравнению с чистым ПГБ (температура плавления 179°C, модуль Юнга

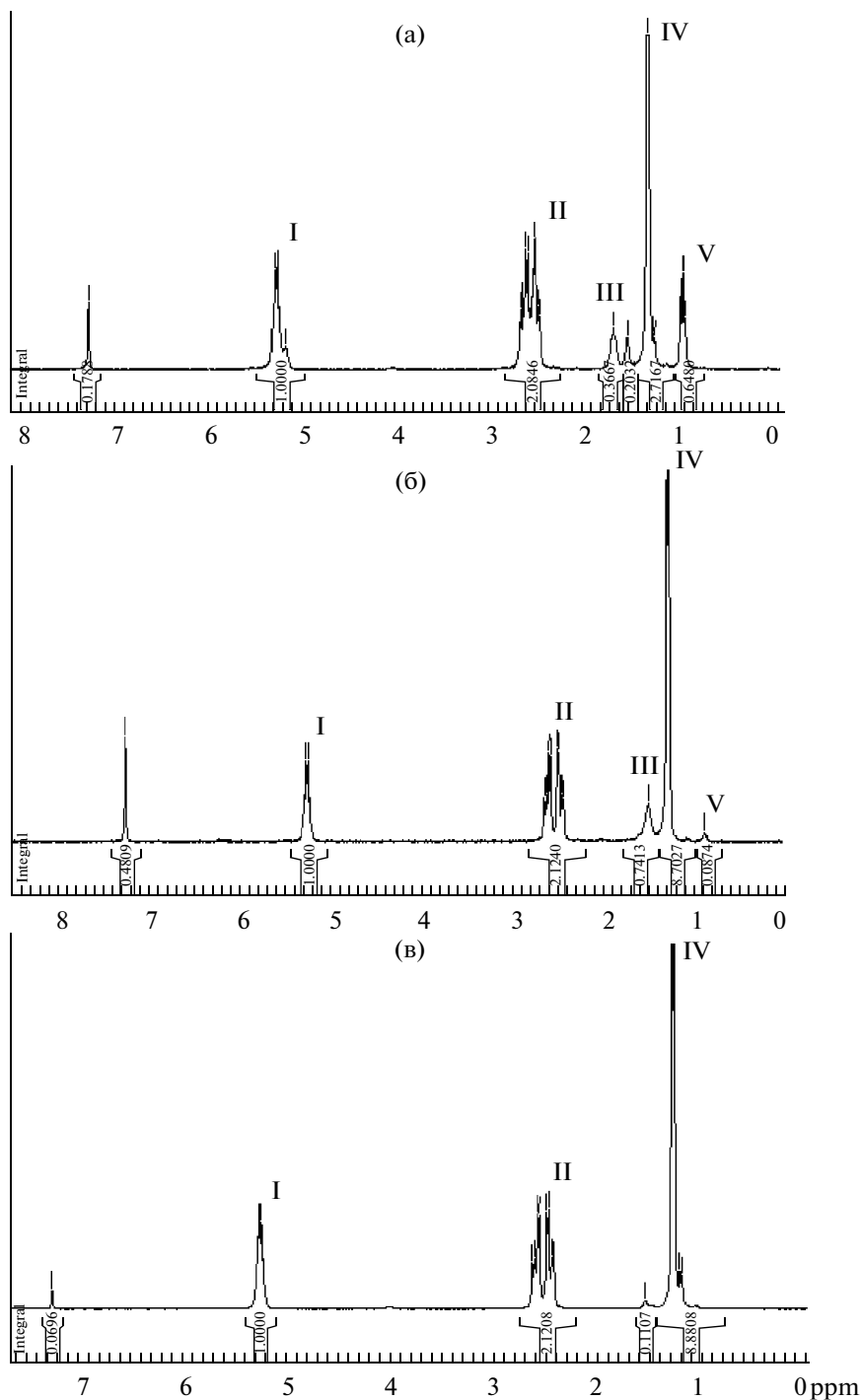


Рис. 1. Спектры ¹H-ЯМР сополимера ПГБ-ГВ с содержанием ГВ 17% (а); ГВ 2.5% (б) и гомополимера ПГБ (в), I – СН (б), II – СН₂(б), III – СН₂(с)ГВ, IV – СН₃(с)ГВ, V – СН₃(с)ГВ, s – боковая цепь; b – основная цепь полимера.

3.5 ГПа, кристалличность 70%, прочность на растяжение 40 МПа.

Влияние пептона на рост и содержание ПГБ и ПГБ-ГВ в клетках. Чтобы снизить ингибирующий эффект вносимых карбоновых кислот на рост бактерий при биосинтезе сополимера ПГБ-ГВ (табл. 1), нами были поставлены эксперимен-

ты с добавлением в ростовую среду пептона, т.к. по литературным данным дополнительное внесение пептона в ростовую среду может активизировать рост азотобактера и существенно повышать содержание полимера в клетках [2].

В табл. 2 приведены результаты роста *A. chroococcum* 7Б, и содержания ПГБ и ПГБ-ГВ в клетках

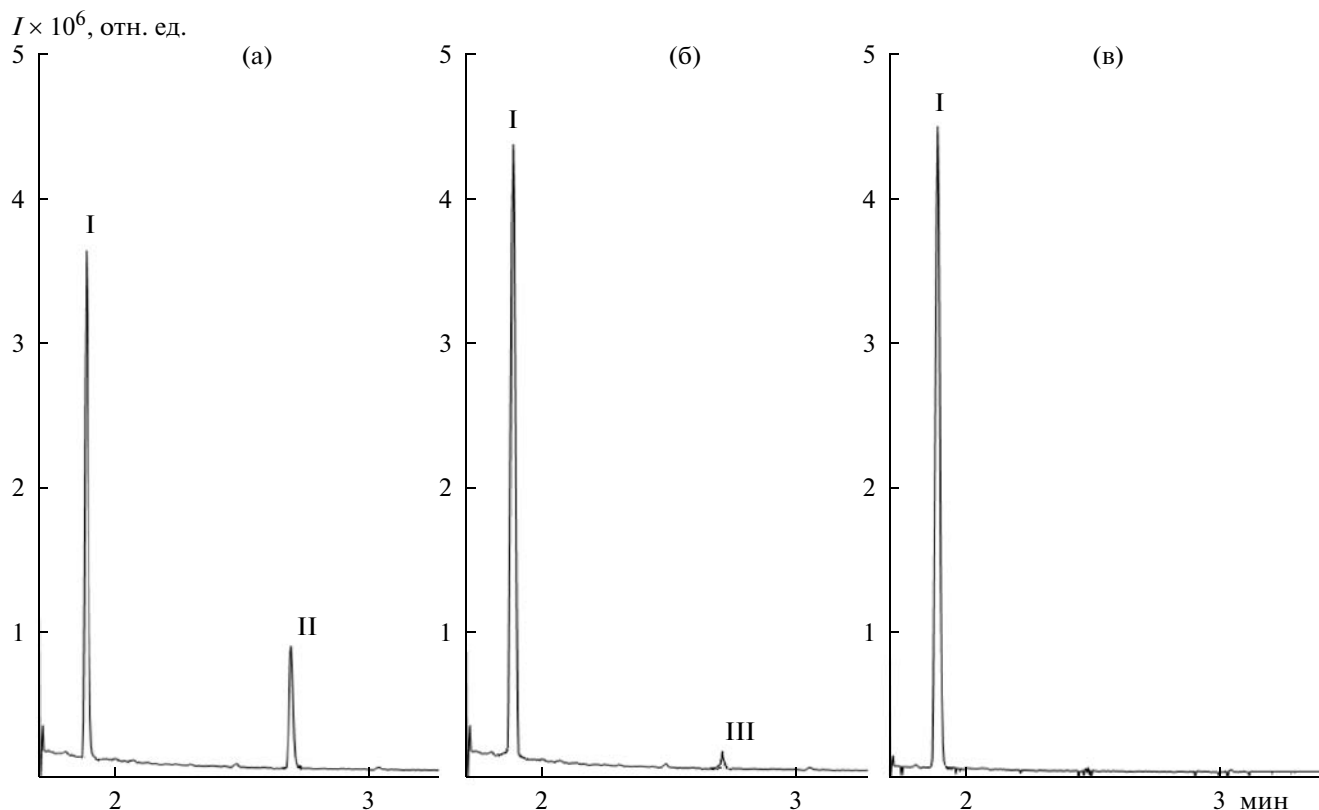


Рис. 2. Хроматограммы, характеризующие химический состав исследуемого биополимера. I – ПГБ, II – ПГБ-ГВ с включением ГВ – 21.6 мол. % (а); III – ПГБ-ГВ с включением ГВ – 3.1 мол. % (б); пик, соответствующий ГВ отсутствует (в).

при дополнительном внесении 0.1%-ного пептона в питательную среду с сахарозой и карбоновыми кислотами. Дополнительное внесение пептона не сказывалось на увеличении урожая клеток азотобактера и общий выход полимера, хотя наблюдался ярко выраженный плеоморфизм клеток (рис. 3). По всей видимости это связано с физиолого-биохимическими особенностями данного

штамма. Однако дополнительное внесение пептона влияло на содержание ГВ в ПГБ: мол. % ГВ в ПГБ в вариантах с 10 мМ валерата возрастал более, чем вдвое – 27.0 ГВ в ПГБ против 11.0 мол. % ГВ в ПГБ на среде без добавления пептона. Тенденция возрастания ГВ в ПГБ сохранялась и при дополнительном внесении пептона на фоне 20 мМ валерата (с 22.6 – без внесения пептона до

Таблица 2. Образование сополимера ПГБ-ГВ штаммом *A. chroococcum* 7Б на среде с сахарозой при добавлении карбоновых кислот с 0.1%-ным пептоном

Субстрат	Без пептона			С пептоном		
	урожай биомассы г/л среды	общее содержание ПГА, % от веса сухих клеток	содержание ГВ, мол. %	урожай биомассы, г/л среды	общее содержание ПГА, % от веса сухих клеток	содержание ГВ, мол. %
Сахароза, 3%	7.5	81.0	0	7.0	80.0	0
С + пропионовая кислота, 20 мМ	2.5	60.4	2.9	3.9	59.8	2.5
С + валериановая кислота, 10 мМ	5.2	70.0	11.0	5.0	75.0	27.0
С + валериановая кислота, 20 мМ	3.7	72.0	22.6	3.2	72.5	28.8
С + гексановая кислота, 10 мМ	3.9	65.3	0	3.5	68.8	0
С + октановая кислота, 10 мМ	3.2	61.0	0	3.5	64.2	0
С + додекановая кислота, 10 мМ	2.9	59.0	0	2.2	60.0	0
С + пропионовая кислота, 10 мМ + уксусная кислота, 20 мМ	3.3	67.0	2.1	4.3	67.7	2.3

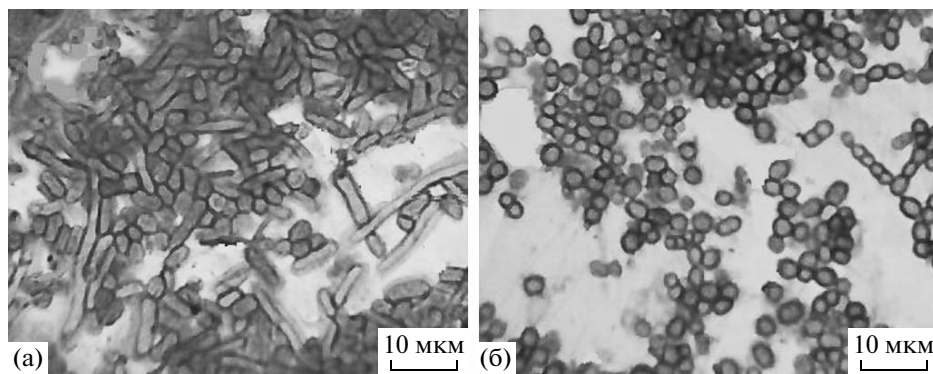


Рис. 3. Культура *A. chroococcum* 7Б через 48 ч выращивания на среде Берка с сахарозой и пептоном (а) и без пептона (б).

28.8 мол. % — с пептоном); однако 20 мМ валериановая кислота на фоне пептона, равно как и без него, заметно ингибировала рост культуры.

Кинетика высвобождения модельного лекарственного вещества из полимерной матрицы. Чтобы оценить функциональное различие между синтезированными сополимером и гомополимером были поставлены эксперименты по кинетике высвобождения модельного лекарственного вещества из полимерной матрицы пленочных биополимерных систем. Были изготовлены модельные пленочные матричные системы пролонгированного действия с включением модельного лекарственного вещества (метилового красного) на основе гомополимера ПГБ с мол. массой 1220, 340 кДа; на основе сополимера (ПГБ-ГВ 17 мол. %) с мол. массой 1300 кДа и на основе сополимера (ПГБ-ГВ 2.5 мол. %) с мол. массой 820 кДа. Метилловый красный (2-[[4-(диамино)фенил]азо]-бензойная кислота) был выбран как модельное лекарственное вещество по следующим причинам: он хорошо растворим в хлороформе; по физико-химическим характеристикам может служить моделью умеренно липофильного лекарственного вещества; выход метилового красного из полимерной матрицы может быть легко определен спектрофотометрически при 430 нм.

Прослежена кинетика высвобождения модельного лекарственного вещества (метилового красного, 4% w/w) из пленок во внешнюю среду *in vitro* в буферной системе в зависимости от молекулярной массы и химического состава полимерной матрицы. Массоперенос этого вещества из пленок ПГБ и ПГБ-ГВ в раствор был двухфазным. Первоначально высокая скорость высвобождения затем снижалась — пологий участок кривой на рис. 4. Так как гидролиз ПГБ и ПГБ-ГВ происходит достаточно медленно [30], эрозия полимерной матрицы вследствие гидролиза, по-видимому, не влияет на выход модельного лекарственного вещества во внешнюю среду в рассмотренные здесь сроки. Не исключено, что высвобождение ле-

карственного вещества из полимерной матрицы происходит путем диффузии через водные каналы или формирующуюся сеть пор [31].

Из рис. 4 видно, что через 150 ч из пленки ПГБ 340 кДа перешло в раствор 19% метилового красного, а из пленки ПГБ 1220 кДа — 14%, т.е. разница составляет 5%. В то же время из пленки ПГБ-ГВ 2.5 мол. % 820 кДа перешло в раствор 57% метилового красного, а из пленки ПГБ-ГВ 17 мол. % 1300 кДа почти 100%. Из этого можно сделать вывод, что состав полимера в большей степени влияет на скорость высвобождения модельного лекарственного вещества, чем молекулярная масса чистого ПГБ. Интересно, что даже при небольшом количестве ГВ в составе сополимера (2.5 мол. %), скорость высвобождения метилового красного в раствор заметно возрастает по сравнению со скоростью высвобождения из гомополимера ПГБ. Возможно, это связано с тем, что введение сомономера в гомополимер приводит к снижению степени кристалличности [32] и уменьшению размера сферолитов [33], вследствие

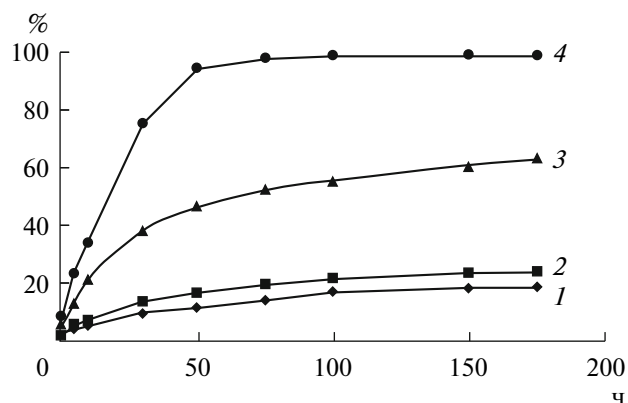


Рис. 4. Кинетика высвобождения метилового красного из полимерной матрицы в зависимости от мол. массы (кДа) и состава полимера (% выхода). 1 — ПГБ, 1220; 2 — ПГБ, 340; 3 — П(ГБ-ГВ 2.5%), 820; 4 — П(ГБ-ГВ 17%), 1300 кДа.

чего вода быстрее проникает внутрь полимерной матрицы по аморфным участкам, т.е. увеличивается скорость набухания полимера.

Таким образом, впервые показано, что штамм *A. chroococum* 7Б способен синтезировать сополимер ПГБ-ГВ с содержанием ГВ в полимерной цепи в диапазоне 2.1–21.6 мол. % при высоком выходе полимера (67.7–75.8%) и биомассы (2.2–4.5 г/л) при использовании валериановой, пропионовой и гексановой кислот в качестве дополнительных источников углерода. Показано не только качественное (мол. % включения ГВ в ПГБ), но и функциональное различие между синтезированными гомополимером и его сополимером ПГБ-ГВ на примере кинетики высвобождения модельного лекарственного вещества. Установлено, что кинетика высвобождения метилового красного во внешнюю среду зависит от состава сополимера и от молекулярной массы гомополимера, при этом наличие в составе полимера звеньев ГВ значительно увеличивает скорость высвобождения модельного лекарственного вещества. Дополнительное внесение пептона (0.1%) в среду с 10 мМ валерата может увеличивать включение ГВ в ПГБ (27.0 мол. %) при хорошем росте культуры (5.0 г/л). Полученные результаты позволяют рассматривать данный штамм в качестве потенциального продуцента не только ПГБ, но и ПГБ-ГВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта № 02.512.12.2004 от 10 июня 2008 г. Федерального агентства по науке и инновациям РФ, Государственного контракта П2429 от 19 ноября 2009 г. и Государственного контракта П2266 от 13 ноября 2009 г. Федеральному агентству по образованию РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Steinbuechel A., Wiese S.A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992. V. 37. № 1. P. 691–697.
2. Page W.J. // FEMS Microbiol. Rev. 1992. V. 103. P. 149–158.
3. Steinbuechel A., Valentin H.E. // FEMS Microbiol. Lett. 1995. V. 128. № 3. P. 219–228.
4. Savenkova L., Gerberg Z., Kizhlo E., Stegantseva E. // Process Biochemistry. 1999. V. 34. P. 109–114.
5. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Кожевников И.В., Штайнбюхель А. // Микробиология. 2007. Т. 76. № 6. С. 797–804.
6. Gross R.A. // Biomedical Polymers: Designed-to-Degrade Systems / Ed. S. Shalaby. N.-Y.: Hanser Publishers. 1994. P. 173–188.
7. Короткова Н.А., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. // Микробиология. 1999. Т. 68. № 3. С. 347–355.
8. Liebergesell M., Hustede E., Timm A., Steinbuechel A., Fuller R.C., Lenz R.W., Schlegel H.G. // Arch. Microbiol. 1991. V. 155. № 5. P. 415–421.
9. Manchak J., Page W.J. // Microbiology. 1994. V. 140. P. 953–963.
10. Page W.J., Manchak J. // Can. J. Microbiol. 1995. V. 41. Suppl. 1. P. 106–114.
11. Braunnegg G., Lefebvre G., Genser K.F. // J. Biotechnol. 1998. V. 65. P. 127–161.
12. Page W.J., Bhanthumnavin N., Manchak J., Ruman M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48. P. 88–93.
13. Saha S.P., Patra A., Paul A.K. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 33. № 5. P. 377–383.
14. Steinbuechel A., Hustede E., Liebersigell M., Timm A., Pieper U., Valentin H. // FEMS Microbiol. Rev. 1991. V. 103. P. 217–230.
15. Anderson A.J., Williams D.R., Taidi B., Dawes E.A., Ewing D.F. // FEMS Microbiol. Rev. 1992. V. 103. P. 93–102.
16. Byrom D. // FEMS Microbiol. Rev. 1992. V. 103. P. 247–250.
17. De Koning G. // Can. J. Microbiol. 1995. V. 41. P. 303–309.
18. Sudesh K., Abe H., Doi Y. // Prog. Polym. Sci. 2000. V. 25. P. 1503–1555.
19. Atkins T.W., Peacock S.J. // J. Microencapsulation. 1997. V. 14. P. 35–49.
20. Kassab A.C., Xu K., Denkbass E.B., Dou Y., Zhao S., Piskin E. // J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 1997. V. 8. P. 947–961.
21. Sendil D., Gursel I., Wise D.L., Hasirci V. // J. Controlled Release. 1999. V. 59. P. 207–217.
22. Бонарцева Г.А., Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Попов В.О. // Патент РФ. 2001. № 2201453.
23. Рафигов С.Р., Будтов В.П., Монаков Ю.Б. Введение в физико-химию растворов полимеров. М.: Наука, 1978. 328 с.
24. Akita S., Einada Y., Miyaki Y., Fugita H. // Macromolecules. 1976. V. 9. P. 774–780.
25. Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Загреба Е.Д., Николаева Д.А. // Патент РФ. 2007. № 2307159.
26. Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 5. С. 533–538.
27. Doi Y., Kunioka M., Nakamura Y., Soga K. // Macromolecules. 1987. V. 20. P. 2988–2991.
28. Doi Y., Tamaki A., Kunioka M., Soga K. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. V. 28. P. 330–334.
29. Ramsay B.A., Lomaliza K., Chavarie C., Dube B., Bataille P., Ramsay J.A. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. P. 2093–2098.
30. Pouton C.W., Akhtar S. // Adv. Drug Deliv. Rev. 1996. V. 18. P. 133–162.
31. Siegel R.A., Kost J., Langer R. // J. Controlled Release. 1989. V. 8. P. 223–229.
32. Luizier W.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 839–842.
33. Barcham P.J. // Novel Biosynthetic Biodegradable Polymers of Industrial Interest from Microorganisms / E.A. Dawes. Dordrecht.: Kluwer Acad. Publ., 1990. P. 81–96.

Biosynthesis of Poly-3-Hydroxybutyrate–3-Hydroxyvalerate Copolymer by *Azotobacter chroococcum* Strain 7B

V. L. Myshkina, E. A. Ivanov, D. A. Nikolaeva, T. K. Makhina, A. P. Bonartsev,
E. V. Filatova, A. O. Ruzhitsky, and G. A. Bonartseva

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia
e-mail: bonar@inbi.ras.ru

Received May 25, 2009

Abstract—The ability of *Azotobacter chroococcum* strain 7B, producer of polyhydroxybutyrate (PHB), to synthesize its copolymer poly-3-hydroxybutyrate–3-hydroxyvalerate (PHB–HV) was studied. It was demonstrated, for the first time, that *A. chroococcum* strain 7B was able to synthesize PHB–HV with various molar rates of HV in the polymer chain when cultivated on medium with sucrose and carboxylic acids as precursors of HV elements in the PHB chain, namely, valeric (13.1–21.6 mol %), propanoic (3.1 mol %), and hexanoic (2.1 mol %) acids. Qualitative and functional differences between PHB and PHB–HV were demonstrated by example of the release kinetic of methyl red from films made of synthesized polymers. Maximal HV incorporation into the polymer chain (28.8 mol %) was recorded when the nutrient medium was supplemented with 0.1% peptone on the background of 20 mM valerate. These results suggest that the studied strain can be regarded as a potential producer of not only PHB but also PHB–HV.