

На правах рукописи

Николаева Дария Александровна

**БИОСИНТЕЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА РАЗНОЙ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ КУЛЬТУРОЙ *AZOTOBACTER*
CHROOCOSUM И ЕГО БИОДЕГРАДАЦИЯ**

03.00.04 - биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2004

Работа выполнена в группе биохимии азотфиксации
Института биохимии им. А.Н. Баха РАН

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Г.А. Бонарцева

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Е.П. Теофилова

кандидат биологических наук К.Ф. Шольц

Ведущая организация:

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет

Защита диссертации состоится 8 июня 2004 г.

в ___ часов на заседании диссертационного совета К 002.247.01 по
присуждению ученой степени кандидата наук в Институте биохимии им. А.Н.
Баха РАН по адресу: 119 071, Москва, Ленинский проспект, 33, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы
ББЛ РАН (119 071, Москва, Ленинский проспект, 33, корп.1)

Автореферат разослан 07.05.2004

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы Истощение нефтяных ресурсов и необходимость создания специальных полимерных материалов, совместимых с природой, послужили мощным стимулом для разработки принципиально новых полимеров - биоразлагаемых термопластиков, изучение которых является сравнительно молодой областью науки. Поли-3-гидроксибутират и его сополимеры, которые относятся к семейству микробных полигидроксиалканоатов (ПГА), синтезируются в клетках микроорганизмов как запасные вещества. По своим базовым показателям эти полимеры близки к синтетическим термопластикам (полипропилену и полиэтилену), но обладают рядом уникальных свойств, главными из которых являются биосовместимость и биodeградability. В отличие от обычных пластиков, ПГА не засоряют окружающую среду, а полностью разлагаются до CO₂ и воды. Перспективными областями использования ПГА являются: в промышленности - производство биоразлагаемых пластмасс, упаковок и материалов одноразового пользования; в сельском хозяйстве - создание систем медленного высвобождения удобрений и агрохимикатов; в медицине - изготовление рассасывающихся шовных нитей, хирургических пластин, пленок для покрытия ран, эндопротезов, матриц для лекарственных форм пролонгированного действия и др.

В связи с тем, что для разных целей требуется полимер с определенными технологическими характеристиками, которые, в первую очередь, определяются качественным составом мономеров и молекулярной массой полимера, необходимо уметь управлять процессом биосинтеза с целью получения полимера с заданными свойствами.

Цель и задачи работы Целью нашей работы было изучение влияния условий культивирования на величину молекулярной массы поли-3-гидроксибутирата синтезируемого штаммом-продуцентом *Azotobacter chroococcum* 7Б; получение сополимера поли-3-гидроксибутирата-3-гидроксивалерата; изучение влияния условий среды на скорость биодеструкции полученных биопластиков.

В связи с этим в работе были поставлены следующие задачи:

1. Проследить динамику изменения молекулярной массы поли-3-гидроксибутирата (ПГБ) в процессе биосинтеза;

2. Изучить влияние условий культивирования на молекулярную массу синтезируемого поли-3-гидроксибутирата;
3. Изучить условия синтеза сополимера поли-3-гидроксибутирата-3-гидроксивалерата (ПГБ-ГВ) культурой *A. chroococcum* 7Б;
4. Проследить скорость биодеструкции ПГБ разной молекулярной массы и изменение физико-механических характеристик полимера в процессе биодеструкции;
5. Изучить влияние молекулярной массы и состава полимера на скорость высвобождения модельного лекарственного вещества из полимерной матрицы.

Научная новизна и практическая ценность работы Впервые разработан способ получения поли-3-гидроксибутирата заданной молекулярной массы путем внесения в среду культивирования *Azotobacter chroococcum* 7Б определенных концентраций дополнительного источника углерода - ацетата натрия. Получен сополимер поли-3-гидроксибутират-3-гидроксивалерат с разным процентным содержанием гидроксивалерата при использовании валериановой и пропионовой кислот как дополнительных источников углерода. С помощью разработанных способов можно получать ПГА с разными физико-химическими и технологическими характеристиками. Впервые выделено и рекомендовано как тест-система для оценки биodeградельности ПГА сообщество микроорганизмов, способное разрушать ПГА в короткие сроки. Актуальным направлением в медицине является разработка лекарственных форм пролонгированного действия. С этой целью изготовлены модельные матричные системы пролонгированного действия на основе поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксибутирата-3-гидроксивалерата с включением модельного лекарственного вещества. Изучена кинетика высвобождения модельного лекарственного вещества из полимерной матрицы в зависимости от молекулярной массы и состава полимера.

Структура и объем диссертации Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы

(196 источников). Работа изложена на 132 страницах машинописного текста, включая 9 рисунков и 8 таблиц.

Апробация работы Материалы диссертации представлены на:

Workshop "Position of Environmentally Degradable Plastics in plastic waste management", 4-8 June 2001, Lodz, Poland;

Международной конференции "Биотехнология на рубеже двух тысячелетий", 12-15 сентября 2001, Саранск;

Международной конференции молодых ученых "От фундаментальной науки - к новым технологиям", 25-28 сентября 2001, Тверь;

7th FAO/SPEN - Workshop "Anaerobic digestion for sustainability in waste (water) treatment and re-use", 19-11 May 2002, Moscow;

2ом Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития", 10-14 ноября 2003, Москва.

Публикации По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ (4 статьи, 5 тезисов) и получен один патент.

Материалы и методы исследования

Объект исследования В работе использовали штаммы-продуценты ПГБ *Azotobacter chroococcum* 7Б и *Azotobacter chroococcum* 35, способные синтезировать до 80 % ПГБ от сухого веса клеток. Штаммы выделены из ризосферы пшеницы (дерново-подзолистая почва). Коллекционные штаммы *Azotobacter* поддерживали на среде Эшби. Для достижения сверхсинтеза поли-3-гидроксibuтирата в клетках культуру азотобактера выращивали на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде (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 - 40.

Выделение поли-3-гидроксibuтирата из бактериальной биомассы Процесс выделения и очистки полимера из биомассы *Azotobacter chroococcum* включал следующие стадии: - растворение ПГБ в хлороформе путем встряхивания на качалке при 37⁰ С в течение 12 часов; - отделение раствора ПГБ от клеточных остатков фильтрованием; - выделение ПГБ из раствора хлороформа осаждением

изопропиловым спиртом; - последующее многократное растворение ПГБ в хлороформе и осаждение изопропанолом; - высушивание при 60° С.

Определение содержания поли-3-гидроксibuтирата в клетках по Зевенхаузену

Суспензию клеток (20-100 мг сух. биом.) центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин. Затем клетки суспендировали в 10 мл воды и гомогенизировали, используя УЗ-обработку (30 сек). К 2 мл суспензии клеток добавляли 2N HCl и нагревали суспензию при 100° С в течение 2 часов на водяной бане; нерастворимый остаток (гранулы ПГБ) отделяли центрифугированием при 8000 g в течение 20 мин. К полученному остатку добавляли 5 мл хлороформа. Пробирки закрывали герметически и оставляли на ночь при 28°С на качалке. Затем содержимое пробирок центрифугировали и к 0.1 мл чистого хлороформного экстракта, предварительно высушенного воздушным потоком, добавляли 5 мл концентрированной серной кислоты; нагревали при 100°С на водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения количество кротоновой кислоты, образующейся в результате кислотного гидролиза ПГБ и последующей дегидратации гидроксимасляной кислоты, определяли на спектрофотометре СФ-2000: длина волны - 235 нм, кювета - 1 см, контроль - H₂SO₄ концентрированная (Zevenhuizen, 1981).

Определение молекулярной массы полимера Молекулярную массу полимера

определяли методом вискозиметрии. Измерения вязкости раствора ПГБ в хлороформе проводили при 30°С. Молекулярную массу вычисляли по уравнению Марка - Хаувинка - Куна, используя следующие коэффициенты $[\eta] = 7,7 \times 10^{-5} \times M^{0,82}$ (Akita et al., 1975).

Газохроматографические измерения Содержание летучих жирных кислот в

жидкой фазе почвенной суспензии определяли на хроматографе "Chrom 5" с пламенно-ионизационным детектором, в качестве сорбента использовали "Chromosorb-101". Пробу объемом 2 мкл вводили в стеклянную колонку длиной 1,2 м и диаметром 3 мм, температура колонки 170° С, газ-носитель - аргон.

N₂O в газовой фазе определяли на газовом хроматографе "Chrom 5" с детектором по теплопроводности (температура детектора 20° С), на колонке с сорбентом "Porapak Q" (длина колонки - 1,2 м, диаметр - 3 мм), газ-носитель - аргон.

Ядерно-магнитный резонанс Спектры ^1H -ЯМР 1-2% растворов ПГБ и П(ГБ-ГВ) в дейтерированном хлороформе сняты на спектрометре MSL-300 "Bruker". Рабочая частота - 300 МГц. Химические сдвиги отсчитывали от сигнала остаточных протонов CDCl_3 - 7,20 ppm. Количество накоплений NS = 40. Процентное содержание элементарных звеньев гидроксивалерата в сополимере П(ГБ-ГВ) рассчитывали по соотношению интегральной интенсивности сигнала метильной группы гидроксивалерата (0,89 ppm) к сумме интегральных интенсивностей сигналов метильной группы гидроксивалерата (0,89 ppm) и метильной группы гидроксибутирата (1,27 ppm) (Bloembergen et al., 1986).

Рентгеноструктурный анализ Степень кристалличности образцов полимера определяли методом рентгеноструктурного анализа на стандартном дифрактометре (Rigaku Denki, Япония) с использованием 18 кВт -генератора с вращающимся медным анодом. Для фильтрации излучения использовали никелевый фильтр. Степень кристалличности определяли по соотношению интегральных интенсивностей рассеяния кристаллической и аморфной фазы.

Механические испытания образцов пленок полимера Механические свойства пленок полимера (прочность, удлинение при разрыве, модуль упругости) определяли на универсальном динамометре Инстрон 1121. Высекали образцы пленок полимера в виде лопаток с длиной рабочей части 10 мм, шириной 3 мм и толщиной 0,03-0,04 мм. Испытания проводили при 20° С, скорость движения траверсы - 5 мм/мин.

Исследование биodeградации пленок из ПГБ Образцы пленки весом 40 мг помещали во флаконы с почвенной суспензией. Почвенная суспензия готовилась на основе 0,1 М калий-фосфатного буфера (соотношение почва-буфер 1:10). Нитраты (KNO_3) добавляли в концентрации 5 г/л. Для создания анаэробных условий флаконы закрывали резиновыми пробками и эвакуировали воздух с помощью масляного насоса. Затем флаконы заполняли аргоном и добавляли 5% ацетилена (ингибитор N_2O - редуктазы). В вариантах с микроаэрофильными условиями эвакуации воздуха не проводили, в закрытые резиновыми пробками флаконы добавляли 5% ацетилена. В аэробных вариантах флаконы закрывали ватными пробками. Инкубацию проводили при 28°С. Для определения потери

веса образца, пленки извлекали из почвенной суспензии, тщательно промывали 0,1М фосфатным буфером, высушивали 2 часа при 60°C и взвешивали.

Сообщество денитрифицирующих микроорганизмов, способных к разложению ПГБ выделяли следующим образом: кусочки пленки из ПГБ помещали во флаконы с почвенной суспензией, куда были добавлены нитраты (5 г/л). Во флаконах создавались микроаэрофильные условия. Через 60 дней оставшиеся фрагменты пленки извлекали из почвенной суспензии, отмывали в стерильной водопроводной воде и из полученной суспензии производили высев в жидкую среду для денитрифицирующих бактерий (среда Гильтая).

Изготовление пленок ПГА матричного типа с введением модельного лекарственного вещества

Для изготовления пленок использовали 4 образца полимера: 1) ПГБ с молекулярной массой 1200 kDa; 2) ПГБ 300 kDa; 3) П(ГБ-ГВ 2%) 880 kDa; 4) П(ГБ-ГВ 17%) 1448 kDa. Пленки изготавливали методом налива раствора полимера в хлороформе (1% w/v) в чашки Петри с последующим выпариванием растворителя при комнатной температуре. Раствор 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 0,02 мм. Кусочки пленки одинаковой формы весом 20 мг помещали в стеклянные флаконы, содержащие 30 мл калий-фосфатного буфера (рН 7.4). Флаконы помещали на качалку 250 об/мин при температуре 37°C. Динамику высвобождения изучали путем отбора проб раствора и измерения содержания метилового красного в растворе спектрофотометрически при длине волны 430 нм на спектрофотометре DU-650 "Beckman".

Результаты исследований и их обсуждение

Динамика изменения молекулярной массы ПГБ в процессе роста культуры

Соотношение реакций синтеза и распада ПГА в бактериальной клетке определяется потребностями клетки в каждый отдельный момент. Известно, что эти процессы могут происходить в одно и то же время (Doi et al., 1990; Taidi et

al., 1995). Из данных, представленных на рис. 1 следует, что рост и синтез ПГБ культурой *Azotobacter chroococcum* 7Б идут параллельно, достигая максимальных значений к 48 час. культивирования. Средневязкостная молекулярная масса полимера также постепенно увеличивается с увеличением содержания ПГБ в клетках и достигает максимума к 26 час. (1900 kDa), а затем, начиная с 30 час. начинает снижаться, хотя содержание ПГБ в клетках в это время продолжает расти. К концу ферментации (48 час.) значение средневязкостной молекулярной массы ПГБ составляет 1500 kDa (рис.2). Очевидно это связано с тем, что на определенной стадии аккумуляции ПГБ в клетке *A. chroococcum* 7Б включаются механизмы активации внутриклеточной деполимеразы, что приводит к снижению средневязкостной молекулярной массы. В дальнейшем, говоря о молекулярной массе поли-3-гидроксибутирата, мы будем иметь в виду молекулярную массу ПГБ, полученного в конце ферментации (48 час.).

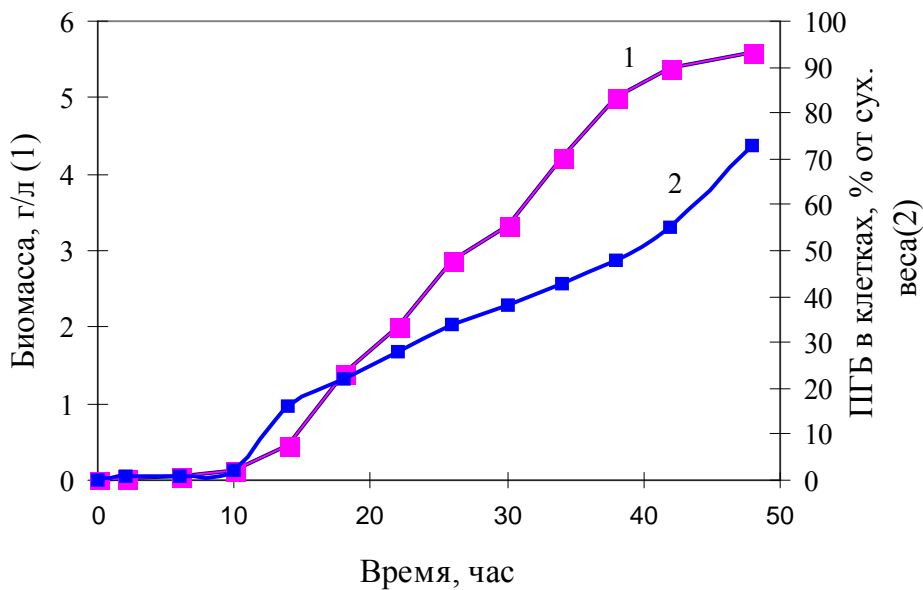


Рис.1 Рост культуры *Azotobacter chroococcum* 7Б (1) и синтез поли-3-гидроксибутирата (2)

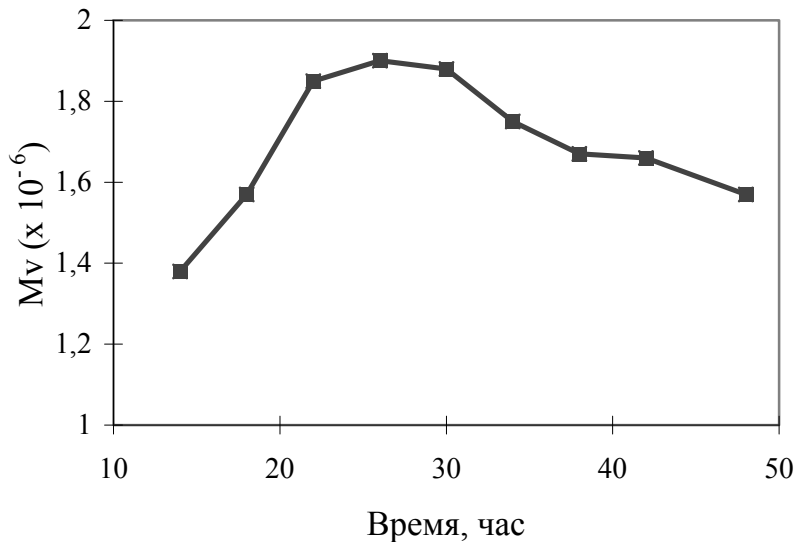


Рис. 2 Динамика изменения молекулярной массы поли-3-гидроксибутирата в процессе роста культуры *Azotobacter chroococcum* 7Б

Влияние условий культивирования на молекулярную массу синтезируемого ПГБ

В экспериментах по изучению влияния условий культивирования на молекулярную массу синтезируемого полимера варьировали следующие факторы

- концентрация дополнительного источника углерода,
- pH среды,
- температура,
- уровень аэрации

Ранее было замечено, что добавление органических кислот к сахаросодержащей среде снижает молекулярную массу синтезируемого полимера. Поэтому были поставлены эксперименты с варьированием концентрации ацетата натрия в среде культивирования. Опыты проводили с двумя штаммами бактерий рода *Azotobacter*. Результаты приведены в таблице 2 и 3. Увеличение концентрации ацетата Na в среде от 2 до 5 г/л на фоне основного источника углерода (сахароза - 40г/л) приводило к снижению молекулярной массы ПГБ, синтезированного клетками обоих штаммов *Azotobacter*: *A. chroococcum* 7Б и *A. chroococcum* 35.

Таблица 1. Влияние дополнительного источника углерода (ацетата натрия) на молекулярную массу ПГБ, синтезируемого *A. chroococcum* 7Б

Концентрация ацетата, г/л	Выход биом. г/л	Содержание ПГБ в клетке, % от с.в.	Выход ПГБ, г/л	Характеристическая вязкость, дл/г	Средне-вязкостная молекулярная масса, kDa
0	5,1	78,3	4,0	9,00	1515
2	5,1	79,5	4,1	6,93	1100
3	4,3	72,0	3,1	3,19	427
5	4,0	67,5	2,7	2,19	270

Таблица 2. Влияние дополнительного источника углерода (ацетата натрия) на молекулярную массу ПГБ, синтезируемого *A. chroococcum* 35

Концентрация ацетата, г/л	Выход биом. г/л	Содержание ПГБ в клетке, % от с.в.	Выход ПГБ, г/л	Характеристическая вязкость, дл/г	Средне-вязкостная молекулярная масса, kDa
0	3,1	76,1	2,4	7,49	1210
2	3,2	75,7	2,4	6,12	946
3	2,7	69,1	1,7	4,72	690
5	2,1	65,3	1,4	3,76	523

Вероятно, при повышении внутриклеточной концентрации ацетильных групп возрастает активность кетотиолазы и ацетоацетил КоА-редуктазы, вследствие чего повышается концентрация гидроксibuтирил-КоА, который является субстратом ПГБ-синтазы. При высоких концентрациях ацетата образуется большее количество центров полимеризации и большее количество начальных фрагментов полимерных цепей, что приводит к синтезу ПГБ с более низкой молекулярной массой (Suzuki et al., 1988).

Что касается влияния рН среды на степень полимеризации синтезируемого ПГБ, то полимер с наиболее высокой степенью полимеризации получен при оптимальном для роста культуры нейтральном рН среды (1485 kDa). Как при кислых так и при щелочных значениях рН молекулярная масса ПГБ снижалась. Таким образом, изменяя рН среды культивирования также можно получать ПГБ с разной молекулярной массой. Однако, такой способ не подходит для применения на практике, т.к. эти условия не являются оптимальными для роста культуры.

С целью изучения влияния температуры на степень полимеризации синтезируемого ПГБ был поставлен опыт по культивированию *Azotobacter chroococcum* 7Б при разных температурах от 20°C до 37°C. Показано, что в пределах диапазона 30 - 37°C температура культивирования практически не влияет как на общее содержание ПГБ в клетке, так и на молекулярную массу синтезируемого ПГБ (73,4% ПГБ, 1670 kDa и 75,2% ПГБ, 1450 kDa соответственно), однако рост *A. chroococcum* 7Б при высокой температуре подавляется.

Еще один возможный способ регулировать молекулярную массу синтезируемого полимера - изменение уровня аэрации в процессе роста культуры. Учитывая, что *Azotobacter chroococcum* является облигатным аэробом, в первые 12 часов роста во всех вариантах поддерживался высокий уровень аэрации, что давало возможность получить количество биомассы, достаточное для дальнейших анализов. Через 12 часов роста условия аэрации изменяли по вариантам. При снижении уровня аэрации на второй стадии культивирования молекулярная масса возростала от 1480 до 2215 kDa. Очевидно, это связано с тем, что высокое внутриклеточное соотношение восстановленных и окисленных

пиридиннуклеотидов (НАДН/НАД⁺), возникающее при лимитировании по кислороду, ингибирует ферменты катаболизма глюкозы и цикла Кребса, снижая скорость окисления ацетил-КоА через ЦТК и направляя его на синтез ПГБ.

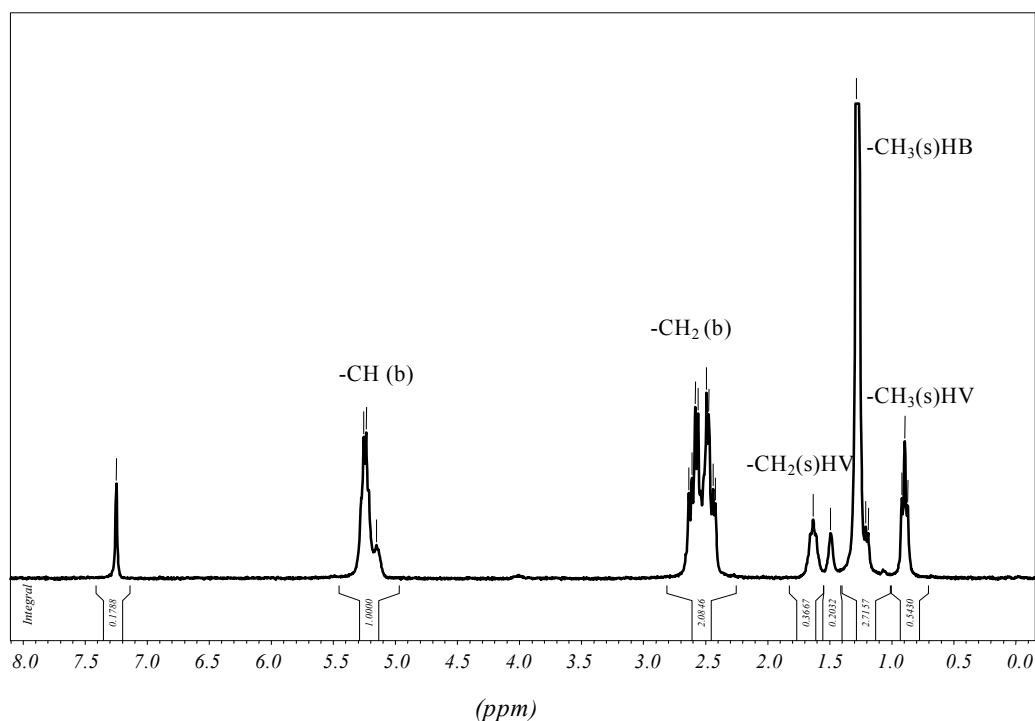
Таким образом, путем варьирования таких факторов как рН среды, уровень аэрации и концентрация ацетата может быть получен ПГБ определенной молекулярной массы в диапазоне от 270 до 2215 kDa.

Получение сополимера поли-3-гидроксibuтирата-3-гидроксивалерата при использовании в качестве продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б

Кроме 3-гидроксимасляной кислоты, около 100 различных гидроксиалкановых кислот обнаружено в качестве компонентов ПГА (Steinbuchel, Valentin, 1995). Коммерческую ценность представляют в основном поли-3-гидроксibuтират и его сополимер с 3-гидроксивалератом (ПГБ-ГВ). Введение 3-гидроксивалерата (3-ГВ) в ПГБ существенно улучшает физико-химические свойства сополимера. ПГБ-ГВ обладает большей прочностью и эластичностью (уменьшается модуль Юнга с увеличением фракции 3-ГВ в ПГБ-ГВ) по сравнению с гомополимером ПГБ (Anderson, Dawes, 1990). Как правило, для получения сополимера путем микробиологического синтеза, в качестве либо основных, либо дополнительных источников углерода используют органические кислоты или спирты с нечетным числом атомов углерода (Gross, 1994).

С целью получения термопластиков с различными физико-химическими свойствами была поставлена задача исследовать возможность получения сополимера поли-3-гидроксibuтирата-3-гидроксивалерата на штамме *Azotobacter chroococcum* 7Б. В качестве предшественников звеньев гидроксивалерата в цепи ПГБ использовали валериановую и пропионовую кислоты. При выращивании культуры на сахарозе с добавлением валериановой кислоты был получен сополимер с содержанием ГВ 17% (в молярном соотношении). Необходимо отметить, что добавление валериановой кислоты приводит к ингибированию роста культуры, так урожай биомассы составлял 3,2 г/л при концентрации валерата 20 mM, тогда как в контрольном варианте при росте культуры на сахарозе урожай биомассы составлял 5,6 г/л. В отличие от валериановой кислоты пропионат у *A. chroococcum* 7Б не вызывает включения большого количества гидроксивалерата в состав сополимера. Так, при

концентрации пропионовой кислоты 20 mM в состав полимера включается лишь небольшое количество гидроксивалерата (2,5%). На рис. 3, 4 и 5 представлены спектры ^1H -ЯМР сополимера П(ГБ-ГВ 17%), П(ГБ-ГВ 2,5%) и гомополимера ПГБ соответственно. На рис. 3 и 4 в спектре присутствует сигнал метильной группы 3-гидроксивалерата при величине химического сдвига 0,89 ppm, тогда как в спектре гомополимера ПГБ (рис. 5) этот сигнал отсутствует. Таким образом, нами получен сополимер поли-3-гидоксибутират-3-гидроксивалерат с содержанием гидроксивалерата 17 % и 2,5% при использовании валериановой и пропионовой кислот в качестве дополнительных источников углерода.



HB – hydroxybutyrate; HV – hydroxyvalerate;

(s) – боковая цепь; (b) – основная цепь полимера

Рис. 3 Спектр ^1H -ЯМР сополимера ПГБ-ГВ с содержанием гидроксивалерата 17%.

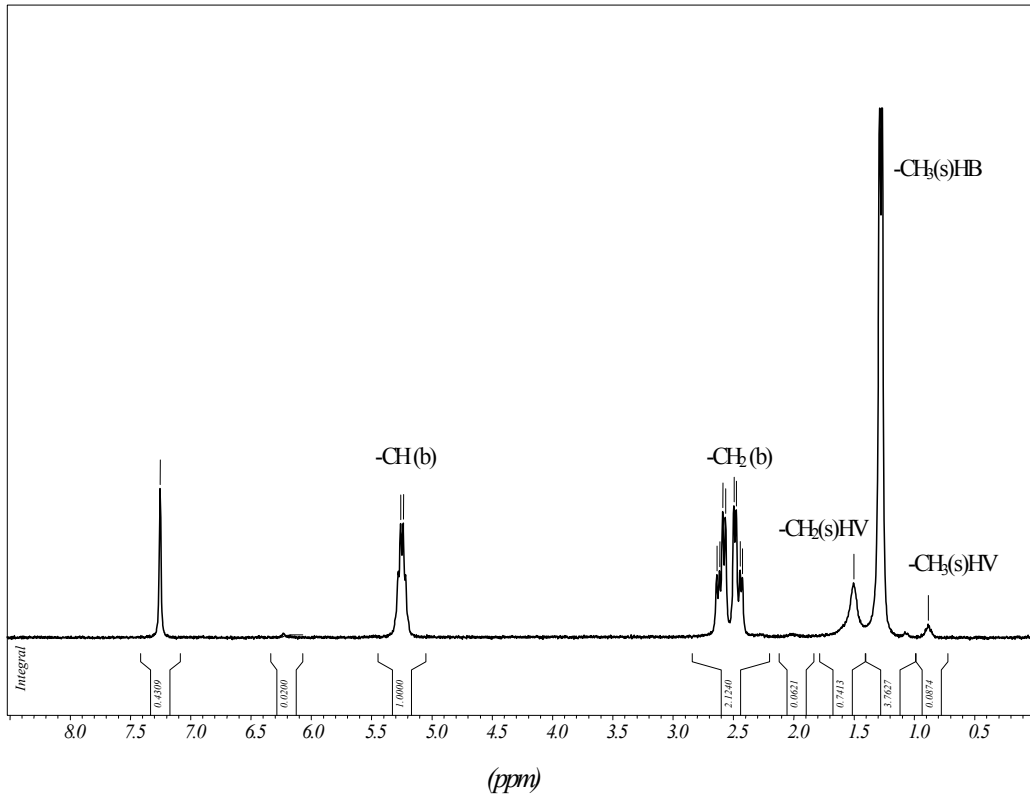


Рис. 4 Спектр ^1H -ЯМР сополимера ПГБ-ГВ с содержанием гидроксивалерата 2,5 %

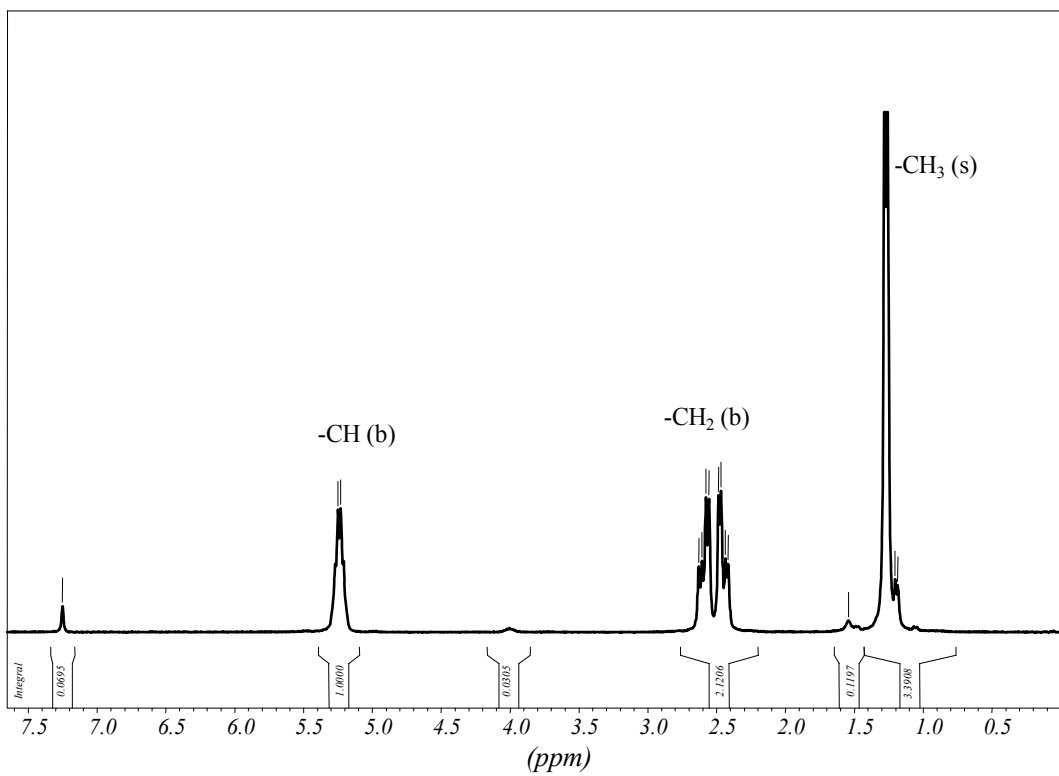


Рис. 5 Спектр ^1H -ЯМР гомополимера ПГБ.

Биодеструкция ПГБ разной молекулярной массы

Наряду с биосинтезом полимера целью работы было исследование биодegradации образцов ПГБ разной молекулярной массы. Необходимо отметить, что большинство работ по биодеструкции посвящено изучению этого процесса в аэробных условиях, работ по анаэробной деградации полимера крайне мало. Мы в своей работе исследовали этот процесс в разных условиях аэрации в присутствии и отсутствии нитрата.

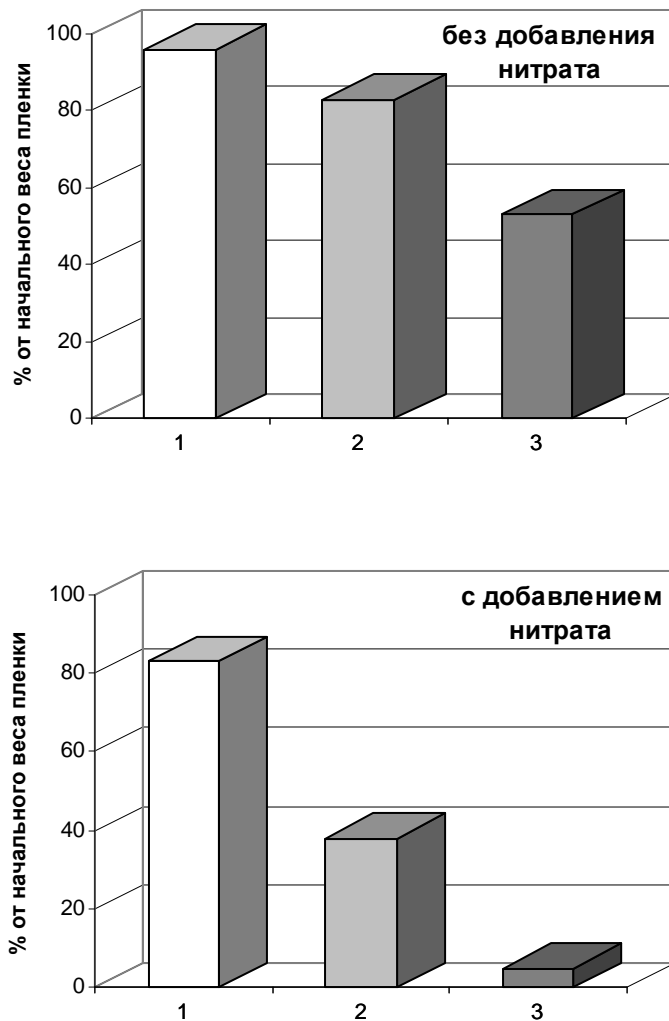


Рис.6 Степень биодegradации пленок ПГБ в зависимости от содержания нитратов в среде и концентрации кислорода в газовой фазе (продолжительность эксперимента - 2 месяца)

- 1 - анаэробные условия
- 2 - микроаэрофильные условия
- 3 - аэробные условия

Известно, что нитрат может быть использован микробным сообществом не только как источник азота для роста микроорганизмов, но и как альтернативный кислороду акцептор электронов при аноксии (Tiedje, 1988). Сначала опыты проводились в модельных условиях почвенного сообщества. Показано, что добавление нитрата заметно повышает скорость биодegradации пленок ПГБ при всех заданных уровнях кислорода в газовой фазе (рис. 6). Максимальная скорость биодеструкции наблюдалась в аэробных условиях с добавлением нитратов.

Таблица 3. Динамика восстановления NO_3^- в N_2O в процессе биоразложения ПГБ

N п/п	Варианты	Содержание N_2O в газовой фазе мкмоль/ флакон		
		20 дней	30 дней	60 дней
1	O_2 0% NO_3^- 5 г/л пленка ПГБ	82,3	114,4	128,5
	O_2 0% NO_3^- 5 г/л Контроль без пленки	28,1	40,2	56,2
2	O_2 10% NO_3^- 5 г/л пленка ПГБ	178,7	271,0	259,0
	O_2 10% NO_3^- 5 г/л Контроль без пленки	8,0	16,1	12,0
3	O_2 20% NO_3^- 5 г/л пленка ПГБ	не опр	не опр	не опр
	O_2 20% NO_3^- 5 г/л Контроль без пленки	не опр	не опр	не опр

Получены результаты, свидетельствующие о сопряжении двух процессов - дегградации ПГБ и восстановления нитратов. Из таблицы 3 видно, что микроаэрофильные условия более благоприятны для биодеградации ПГБ и развития денитрификаторов, чем анаэробные (количество выделившегося N_2O в анаэробном варианте в два раза ниже по сравнению с вариантом, где содержание кислорода составляло 10%).

Было изучено изменение молекулярной массы, степени кристалличности и механических свойств полимерной пленки в процессе биодеградации. Показано, что в процессе биодеградации пленки в почвенной суспензии молекулярная масса ПГБ снижалась во всех вариантах опыта по сравнению с контрольной пленкой, не подвергавшейся биодеградации. В аэробных условиях с добавлением нитрата (табл.4, вариант 6), где визуально наблюдаемая степень биодеградации была наибольшей, значение средневязкостной молекулярной массы полимера на 60-е сутки после начала опыта составляло 780 kDa, что почти вдвое меньше, чем молекулярная масса полимера, не подвергшегося биодеструкции. Можно отметить прямую корреляцию между степенью биодеградации пленки и снижением молекулярной массы полимера (рис.6 и табл.4). Так, при одинаковом уровне содержания кислорода в газовой фазе в вариантах с добавлением нитрата пленка не только быстрее теряет в весе, но и молекулярная масса полимера снижается быстрее по сравнению с вариантами без внесения нитрата. Интересно отметить, что низким значениям молекулярной массы полимера в вариантах 4 и 6 (табл.4) соответствуют наиболее высокие значения степени кристалличности (75,2 и 76,2% соответственно). Так как структура полимера предполагает наличие аморфных и кристаллических областей, а аморфные области подвергаются гидролизу и микробной дегградации в первую очередь (Spyros et al., 1997), очевидно, что при последовательном разрушении аморфных областей повышается степень кристалличности.

Таблица 4. Изменение молекулярной массы, степени кристалличности и механических характеристик пленок ПГБ в процессе биодеструкции (продолжительность эксперимента - 60 дней)

№ п/п	Варианты	Степень биодеструкции (% от начального веса пленки)	Молекулярная масса, kDa	Степень кристалличности %	Напряжение при разрыве, мПа	Удлинение при разрыве, %	Модуль упругости, мПа
	Исходная пленка	100	1 490	72,9	31,3	4,0	1660
1	O ₂ 0%	96	1 310	73,9	36,6	3,2	2010
2	O ₂ 0% +NO ₃	83	1 330	74,1	31,2	3,4	1965
3	O ₂ 10%	83	1 080	74,2	26,0	3,7	1695
4	O ₂ 10% +NO ₃	38	980	75,2	12,1	3,0	840
5	O ₂ 20%	53	1 110	73,9	13,2	3,8	825
6	O ₂ 20% +NO ₃	5	780	76,3	не опр*	не опр*	не опр*

*пленка разрушена практически полностью

На элективной среде для денитрификаторов была получена накопительная культура микроорганизмов, способных утилизировать ПГБ пленку за короткий срок (3 -7 дней) в микроаэрофильных условиях. Показано, что доминирующими видами в этой накопительной культуре были бактерии рода *Pseudomonas*.

В процессе биодegradации полимера в накопительной культуре также наблюдалась корреляция снижения веса пленки и снижения молекулярной массы ПГБ. Показано, что скорость биодеструкции зависит от исходной молекулярной массы полимера. Пленка ПГБ молекулярной массы 1540 kDa весом 6 мг полностью разрушалась за 7 суток. Пленка того же веса, но из ПГБ молекулярной массы 890 kDa разрушалась за 4 суток. Средневязкостная молекулярная масса последовательно снижалась у обоих исследованных полимеров: у более высокомолекулярного - от 1540 до 580 kDa, у полимера с меньшей молекулярной массой - от 890 до 612 kDa (рис. 7, 8). Как видно из представленных результатов, биодеструкция менее высокомолекулярного полимера начинается практически сразу - через сутки (через 48 час. наблюдается 27% потеря веса пленки, средневязкостная молекулярная масса снижается от 890 до 727 kDa), тогда как деградация высокомолекулярного полимера начинается только на 3 сутки (через 48 час. отмечена только 5% потеря веса пленки, молекулярная масса практически не меняется).

Известно, что деструкция деполимеразой полимерной цепи по "экзо" типу, т.е. последовательное отщепление концевых групп, идет с большей скоростью, и, следовательно, вносит основной вклад в изменение средней молекулярной массы полимера, чем деструкция по "эндо" типу, т.е. случайный разрыв полимерных цепей в месте связывания фермента. Однако, атака полимерной цепи по "эндо" типу играет важную роль при инициации процесса биодegradации, так как изначально лишь небольшое число полимерных цепей ориентированы так, что их концы доступны действию фермента (Hocking et al., 1996). Возможно, сокращение периода биодеструкции для более низкомолекулярного полимера, в массе своей имеющего большее число концевых групп, связано с тем, что деструкция полимерных цепей с концов по "экзо" типу у него происходит активнее, чем у высокомолекулярного полимера.

Выделенное сообщество может быть использовано как тест-система при оценке биodeградеability ПГА и изделий из них.

Вес пленки, %

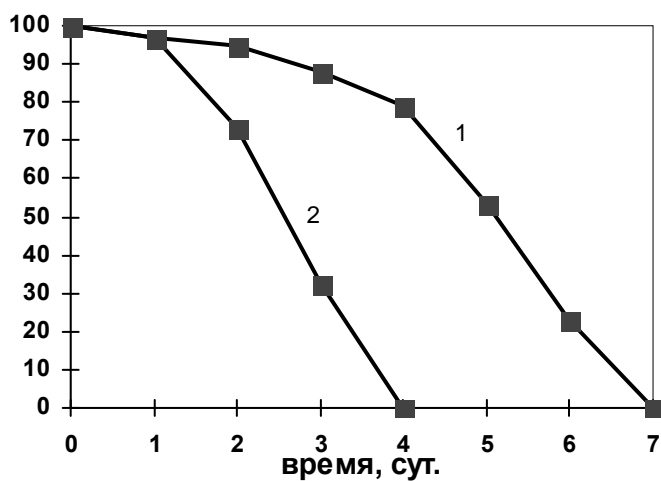


Рис. 7 Скорость биодеструкции пленки ПГБ 1540 kDa (1) и ПГБ 890 kDa (2) в накопительной культуре денитрифицирующих бактерий.

Молекулярная масса

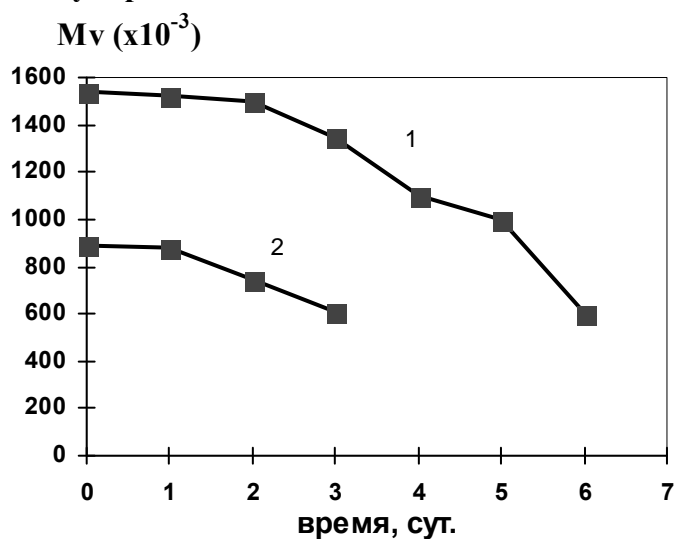


Рис. 8 Изменение молекулярной массы образцов полимера в накопительной культуре денитрифицирующих бактерий: 1 - ПГБ 1540 kDa; 2 - ПГБ 890 kDa.

Кинетика высвобождения модельного лекарственного вещества из полимерной матрицы

Наиболее перспективной областью применения полигидроксиалканоатов является медицина, в частности, ПГА могут быть использованы в качестве матричного материала для изготовления лекарственных форм пролонгированного действия. Нами были изготовлены модельные пленочные матричные системы пролонгированного действия на основе поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксибутирата-3-гидроксивалерата с включением модельного лекарственного вещества (метилового красного).

Метиловый красный (2-[[4 -(диамино)фенил]азо]-бензойная кислота) был выбран как модельное лекарственное вещество по следующим причинам:

- 1) метиловый красный хорошо растворим в хлороформе;
- 2) по своим физико-химическим характеристикам может служить моделью умеренно липофильного лекарственного вещества;
- 3) выход метилового красного из полимерной матрицы легко может быть определен спектрофотометрически.

Прослежена кинетика высвобождения модельного лекарственного вещества из пленок во внешнюю среду *in vitro* в буферной системе в зависимости от молекулярной массы и химического состава полимерной матрицы. Массоперенос модельного лекарственного вещества из пленок поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксибутирата-3-гидроксивалерата в раствор был двухфазным. Первоначально высокая скорость высвобождения затем снижалась (пологий участок кривой на рис. 9). Так как гидролиз ПГБ и ПГБ-ГВ происходит достаточно медленно (Routon et al., 1988), эрозия полимерной матрицы вследствие гидролиза, по-видимому, не влияет на выход модельного лекарственного вещества во внешнюю среду в рассматриваемые здесь сроки. Высвобождение лекарственного вещества из полимерной матрицы происходит путем диффузии через водные каналы или формирующуюся сеть пор (Siegel et al., 1989).

Ранее было показано, что кинетика высвобождения лекарственного

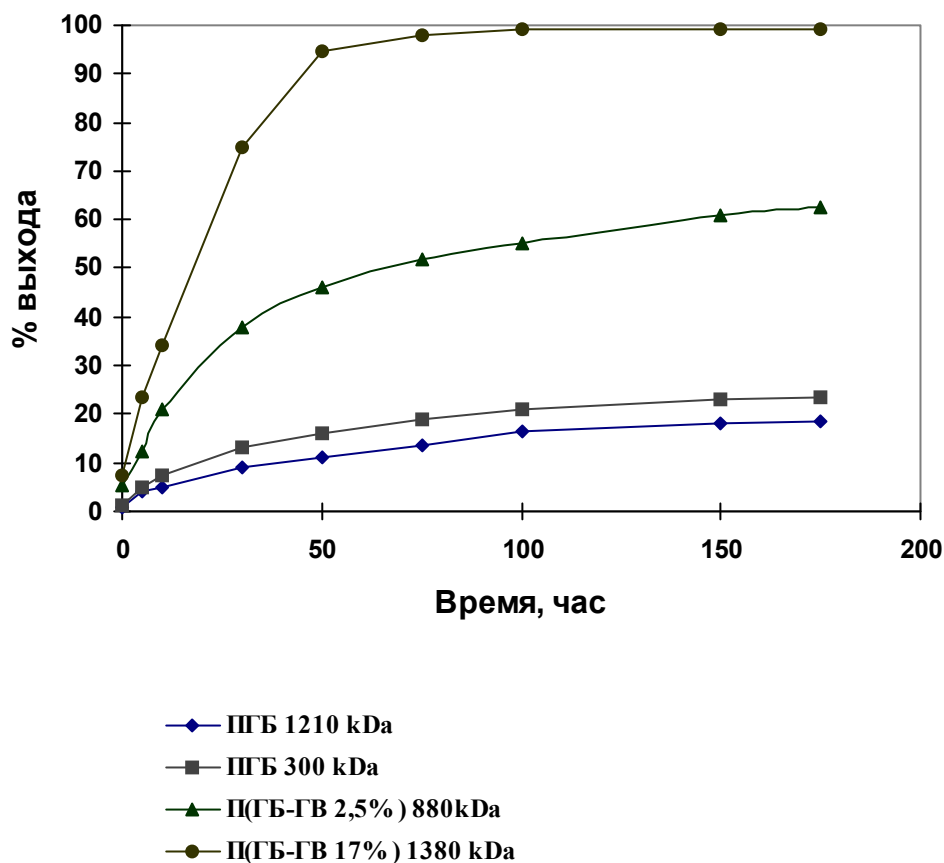


Рис.9 Кинетика высвобождения модельного лекарственного вещества (метилового красного) из полимерной матрицы в зависимости от молекулярной массы и состава полимера.

вещества из пленки во внешнюю среду зависит от внутренней морфологии полимера (Akhtar et al., 1991). Поли-3-гидроксibuтират и его сополимеры кристаллизуются из расплава и раствора, образуя структуру, состоящую из сферолитов. Сферолиты не являются единичными кристаллами, они представляют собой комплекс ламелей, расходящихся от центрального ядра. Морфология полимера на уровне сферолитов является сложной функцией таких характеристик полимера как молекулярная масса, температура кристаллизации и состав (для сополимеров).

Из рис. 9 видно, что состав полимера в большей степени влияет на скорость высвобождения метилового красного, чем молекулярная масса чистого ПГБ. Важно отметить, что даже при небольшом количестве гидроксивалерата в составе сополимера (2,5%), 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 (Luizier, 1992) и уменьшению размера сферолитов (Barham, 1990), вследствие чего вода быстрее проникает внутрь полимерной матрицы по аморфным участкам, т.е. увеличивается скорость набухания полимера.

Таким образом, показано, что кинетика высвобождения модельного лекарственного вещества во внешнюю среду зависит от состава сополимера и от молекулярной массы гомополимера, при этом наличие в составе полимера звеньев гидроксивалерата значительно увеличивает скорость высвобождения модельного лекарственного вещества во внешнюю среду по сравнению со скоростью высвобождения из образцов гомополимера ПГБ.

Выводы:

1. Показана возможность варьирования степени полимеризации ПГБ путем изменения условий культивирования: рН среды, температуры, уровня аэрации, внесения в среду культивирования дополнительного источника углерода - органических кислот.
2. Разработан и запатентован способ получения ПГБ заданной молекулярной массы при внесении в среду определенной концентрации дополнительного источника углерода - ацетата натрия.
3. Показано, что ПГБ легко подвергается биодеструкции сообществами почвенных микроорганизмов. Впервые выделено сообщество микроорганизмов, которое может быть рекомендовано как тест-система для оценки биodeградации ПГА.
4. Получен сополимер поли-3-гидроксibuтират-3-гидроксивалерат с разным процентным содержанием гидроксивалерата при использовании валериановой и пропионовой кислот как дополнительных источников углерода.
5. Показано, что скорость высвобождения модельного лекарственного вещества из полимерной матрицы в большей степени зависит от мономерного состава полимерной цепи и в меньшей степени от молекулярной массы полимера.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Ребров А.В., Герасин В.А., Махина Т.К. Биодegradация поли- β -оксибутирата в модельных условиях почвенного сообщества: влияние условий среды на скорость процесса и физико-механические характеристики полимера// Микробиология. 2002. т. 71, № 2, стр. 258-263.
2. Мокеева В.Л., Чекунова Л.Н., Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Герасин В.А., Бонарцева Г.А.. Биодеструкция поли- β -гидроксибутирата микроскопическими грибами: испытания полимера на грибостойкость и фунгицидные свойства// Микология и фитопатология, 2002. т.36, № 5, стр. 59-63.
3. Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Kevbrina M.V., Kallistova A., Gerasin V.A., Iordanskii A.L. and Nozhevnikova A.N. Aerobic and Anaerobic Microbial Degradation of Poly- β -Hydroxybutyrate Produced by *Azotobacter chroococcum*// Applied Biochemistry and Biotechnology, 2003, v. 109, Iss. 1-3, pp. 285-302.
4. Фурина Е.К., Николаева Д.А., Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Львов Н.П. Восстановление нитратов культурами *Azotobacter indicum* и *Azotobacter chroococcum*// Прикладная биохимия и микробиология, 2002, т.38(6), стр. 649-652.
5. Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Загреба Е.Д., Николаева Д.А. Способ получения полиоксибутирата заданной молекулярной массы. Патент на изобретение № 2201453 от 18 октября 2001 г.
6. Bonartseva G.A., Myshkina V.L. and Nikolaeva D.A. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate of different molecular weight by *Azotobacter chroococcum* 7Б and its biodegradation under model conditions of soil microbial community // Proc. of workshop "Position of Environmentally Degradable Plastics in plastic waste management", Lodz, Poland, 4-8 June 2001, p. 20.
7. Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Николаева Д.А. Биосинтез поли-3-гидроксибутирата разной молекулярной массы культурой *A. chroococcum* 7Б и его биодegradация в модельных условиях почвенного сообщества // Тез. Международной научной конференции "Биотехнология на рубеже двух тысячелетий", Саранск 12-15 сентября 2001, Изд-во Мордовского университета, стр. 219-220.
8. Николаева Д.А. Влияние аэрации на молекулярную массу поли-3-гидроксибутирата, синтезируемого *Azotobacter chroococcum* // Тез. международной конференции молодых ученых, Тверь, 25-28 сентября 2001, стр. 135-136.
9. Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Gerasin V.A., and Makhina T.K. Biodegradable plastic poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* on food industry waste // Proc. of 7th FAO/SPEN - Workshop "Anaerobic digestion for sustainability in waste (water) treatment and re-use", Moscow, 19-11 May 2002, pp. 378-385.
10. Бонарцева Г.А., Иорданский А.Л., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Фурина Е.К. Получение и перспективы применения полиоксиалканоатов – экологически чистых биоразлагаемых термопластичных биополимеров// Материалы 2го Московского международного конгресса “Биотехнология: состояние и перспективы развития”, 10-14 ноября 2003, Москва, ч.1, стр. 261.

