

ПРИРОДНЫЕ
ПОЛИМЕРЫ

УДК 541.64:542.954

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ: НОВЫЕ АСПЕКТЫ¹

© 2017 г. Т. Г. Волова*, О. Н. Виноградова, Н. О. Жила, Е. Г. Киселев,
И. В. Петерсон, А. Д. Васильев, А. Г. Суковатый, Е. И. Шишачкая

*Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук
660036 Красноярск, Академгородок, 50, стр. 50*

**e-mail: volova45@mail.ru*

Поступила в редакцию 14.03.2016 г.

Принята в печать 16.05.2016 г.

Исследованы физико-химические свойства (степень кристалличности, температурные и молекулярно-массовые характеристики) ряда полигидроксиалканоев различного химического состава, синтезированные на комплексном углеродном субстрате бактериями *Cupriavidus eutrophus* B10646. Двух-, трех- и четырехкомпонентные сополимерные образцы различались набором и соотношением мономеров с различной длиной С-цепи: 3-гидроксипропаната (ЗГБ), 4-гидроксипропаната (4ГБ), 3-гидроксивалерата (ЗГВ), 3-гидроксигексаноата (ЗГГ), 3-гидрокси-4-метилвалерата (ЗГ4МВ), диэтиленгликоля (ДЭГ). Показана вариабельность величин средневесовой молекулярной массы M_w и полидисперсности в широких пределах без связи с составом сополимерных полигидроксиалканоев и сохранение термостабильности в интервале между температурой плавления и температурой термической дегградации от 100 до 120–140°C. Состав и соотношение мономеров оказывали наиболее выраженное влияние на степень кристалличности полигидроксиалканоев. Впервые показаны значительные отличия степени кристалличности у трех- и четырехкомпонентных полигидроксиалканоев. Величина степени кристалличности у сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) составила 9–22%; у сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) и П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГ4МВ) от 41 до 63%, что близко к величине степени кристалличности диблок-сополимеров П(ЗГБ)/ДЭГ 56–69%. Четырехкомпонентные сополимеры П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ) имели значения степени кристалличности на уровне 30–41%. Зарегистрирована гетерогенность по величине M_w у сополимеров П(ЗГБ)/ДЭГ и присутствие в полимере неравномерных по величине фракций: высокомолекулярного (M_w от 2700 до 4900 кДа) и низкомолекулярного полимера ($M_w = 46–167$ кДа). Для П(ЗГБ)/ДЭГ и П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГ4МВ) выявлено появление двух пиков в области плавления с разрывом между пиками от 4 до 20°C. Показано, что все типы сополимерных образцов, независимо от соотношения мономеров, имели в разной степени выраженное повышение значений удлинения при разрыве на фоне понижения напряжения при разрыве и модуля Юнга. В целом, многокомпонентные полигидроксиалканоев значительно различаются свойствами.

DOI: 10.7868/S2308112017010163

Полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот — полигидроксиалканоев (ПГА) синтезируются прокариотическими микроорганизмами в специфических условиях при несбалансированном росте в качестве эндогенного депо энергии и углерода [1]. Эти природные полимеры обладают спектром полезных свойств, среди которых наиболее значимыми являются способность разрушаться в биологических средах до безвредных для окружающей среды продуктов и высокая биологическая совместимость с клетками и тканями макроорганизмов. ПГА — биологический аналог синтетических полиолефинов, пред-

назначенный для их постепенной замены в различных сферах. Масштабы производства и стоимость этих полимеров определяют возможные области применения (сельское и коммунальное хозяйство, восстановительная медицина, фармакология). Термопластичные ПГА можно перерабатывать общепринятыми методами в изделия различного назначения, среди которых имплантаты и эндопротезы для восстановительной медицины, основа для депонирования и доставки биологически активных соединений, включая лекарственные препараты, биоразрушаемые упаковочные материалы, предметы быта и многое другое [2–4]. Новое направление применения ПГА, ориентированное на понижение неконтролируемого распространения и накопления в био-

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-26-00039).

сфере ксенобиотиков, – это конструирование долговременных и адресных препаратов нового поколения для защиты культурных растений от сорняков, вредителей и возбудителей болезней [5–7].

В зависимости от строения С-цепи мономеров, образующих ПГА, они подразделены на три группы полимеров: короткоцепочечные, образованные мономерами с длиной С-цепи от С3 до С5; среднецепочечные (С6–С16) и длинноцепочечные (С17 и выше) [8]. Перечень ПГА постоянно пополняется; сравнительно недавно предложено подразделить их дополнительно в зависимости от частоты встречаемости на две категории: “обычные” и “необычные” ПГА [9]. К “обычным” ПГА относят полимеры, которые синтезируют микроорганизмы внутриклеточно в качестве запасных макромолекул. Эта группа включает полимеры, состоящие из известных мономеров [(R)-3-гидроксипропионата, (R)-3-гидроксибутирата, (R)-3-гидрокси валерата, (R)-3-гидрокси гексаноата, (R)-3-гидрокси октаноата, (R)-3-гидрокси деканоата и (R)-3-гидрокси додеканоата] или из их комбинаций. Термин “необычные” ПГА объединяет широкий спектр высокомолекулярных соединений, среди них полимеры микробного происхождения, которые синтезируются либо из природных мономеров, несущих различные функциональные группы, либо из их химических производных, а также полимеры, полученные химическим синтезом, либо химической модификацией исходных микробных полимеров [9].

Сополимерные ПГА более перспективны, так как на их основе возможно получение материалов и изделий с различными, в том числе улучшенными, свойствами по сравнению с высококристаллическим гомополимером 3-гидроксимасляной кислоты. Интерес к возможности синтеза сополимерных ПГА велик, и к настоящему времени описано большое количество генетически модифицированных и в меньшей степени природных штаммов – продуцентов, обладающих такой способностью. Однако трудности регламентированного и воспроизводимого синтеза многокомпонентных полимеров сдерживают накопление знаний о влиянии состава мономерных звеньев в ПГА на физико-химические свойства последних.

Наличие коллекции продуктивных штаммов, обладающих способностью синтезировать ПГА на различных С-субстратах с высокими выходами, позволило нашему коллективу синтезировать линейку двухкомпонентных полимеров с различным соотношением звеньев сомономеров и изучить их свойства [10, 11].

Цель настоящей работы – сравнительное изучение физико-химических свойств многокомпонентных ПГА различного, в том числе нового и необычного химического состава.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для синтеза ПГА использовали продуктивный штамм *Cupriavidus eutrophus* B10646, депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов [12]. Штамм культивировали на стандартной солевой среде Шлегеля на глюкозе с применением набора С-субстратов предшественников (валерата калия, гамма-бутиролактона, гексаноата калия, 4-метилвалерата калия, диэтиленгликоля), которые регламентировано дозировали в культуру, находящуюся в режиме аккумуляции этих резервных макромолекул.

Исследованы 3- и 4-компонентные сополимеры, образованные мономерами 3-гидроксибутирата (ЗГБ), 3-гидрокси валерата (ЗГВ), 4-гидроксибутирата (4ГБ), 3-гидрокси гексаноата (ЗГГ), 3-гидрокси-4-метилвалерата (ЗГ4МВ) в различном соотношении, а также диблок-сополимеры 3-гидроксибутирата и диэтиленгликоля (ДЭГ).

Состав высокоочищенных образцов полимеров, выделенных из биомассы бактерий, определяли хроматографией предварительно полученных метиловых эфиров жирных кислот с применением хромато-масс-спектрометра GC-MS (7890/5975С, “Agilent Technologies”, США) и спектроскопией ЯМР ^1H растворов ПГА в CDCl_3 на ЯМР-спектрометре “Bruker AVANCE III 600” (Германия, 600.13 МГц; Красноярский региональный центр коллективного пользования Сибирского отделения РАН).

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение исходных образцов полимеров исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии “Agilent Technologies 1260 Infinity” (Германия) с использованием калибровочных стандартов “Agilent PS-N EasiVial”. Находили средневесовую молекулярную массу M_w , а также полидисперсность.

Для изучения физико-химических свойств ПГА использовали образцы в виде порошков. Термический анализ проводили с применением дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 (“Mettler Toledo”, Швейцария). Образцы массой 4.0 ± 0.2 мг помещали в алюминиевые тигли, нагревали со скоростью 5 град/мин до 200°C , далее охлаждали до -20°C , выдерживали в течение 20 мин и повторно нагревали до 320°C . Температуру стеклования T_g , кристаллизации $T_{кр}$, плавления $T_{пл}$ и термической дегградации $T_{дегр}$ находили по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения “StarE”. Рентгеновские эксперименты для определения степени кристалличности образцов выполняли на порошковом дифрактометре D8ADVANCE (“Bruker AXS”, Германия) с линейным детекто-

Таблица 1. Химический состав и свойства сополимерных ПГА с различным набором и соотношением мономеров

Образец, №	Состав ПГА, мол. %				M_w , кДа	Полидис-перс-ность	C_x , %	$T_{пл}$, °С	$T_{дегр}$, °С	$T_{кр}$, °С	T_c , °С
Гомополимер 3-гидроксипропаноата											
	100				920	2.52	76	178	295	92	–
3-Компонентные ПГА											
ЗГБ/ЗГВ/4ГБ											
1	55.2	18.5	26.3		669	3.8	21	171	282	70	–4
2	57.6	11.9	30.5		724	4.0	20	168	283	71	–5
3	59.4	7.2	33.4		450	3.0	22	161	275	70	–4
4	47.3	17.7	35.0		483	5	9	172	284	83	–
5	26.2	13.4	60.4		507	3.4	17	51/163	292	21	–
ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ											
6	84.6	1.8	13.6		924	4.1	63	172	270	51/60	0.9
7	66.4	23.4	10.2		540	3.5	60	176	271	52	1.3
ЗГБ/ЗГВ/ЗГ4МВ											
8	60.3	38.6	1.1		677	5.1	43	–	295	–	–2.2
9	68.5	24.9	6.6		592	3.5	49	142/158	295	65	1.1
10	87.7	8.2	4.1		462	5.0	41	144/159	278	62	3
4-Компонентные ПГА											
ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ											
11	68.5	18.6	11.1	1.8	429	6.2	30	170	287	84	–8.6
12	83.2	7.0	8.5	1.3	814	6.2	41	165	286	62	–3.2
13	85.2	7.4	5.3	2.1	562	4.7	36	167	285	75	–4.7

ром VANTEC. Для этого в непрерывном режиме снимали рентгенограммы с пошаговым запоминанием накопленной за 114 с интенсивностью (шаг 0.016° по 2θ), режим работы прибора $40 \text{ кВ} \times 40 \text{ мкА}$, интервал сканирования от 5° до 60° по 2θ . В промежутке от 48° до 60° наблюдали только равномерно понижающийся фон. В процессе измерений образцы вращались вокруг перпендикуляра к поверхности. Степень кристалличности определяли как величину отношения площади под рентгенограммой с вычтенным фоном к площади без вычитания аморфного фона. Для вычислений использовали программу Eva из программного приложения к дифрактометру.

Для измерения физико-механических характеристик были получены пленки из образцов ПГА различного химического состава, отобранные из всех исследованных групп. Пленки получали путем полива растворов ПГА. В работе использовали 2%-ные (масса/объем) растворы полимера в трихлорметане. Для этого в трихлорметан вносили навеску полимера, далее емкость с полимерным раствором помещали на 2–3 ч (до полного растворения) на магнитную мешалку “MR Hei-Standart” (“Heidolph”, Германия) под

обратный холодильник с нагреванием до $35\text{--}40^\circ\text{C}$. Гомогенный раствор полимера после фильтрации выливали в обезжиренные чашки Петри, которые накрывали стеклянным колпаком (для предотвращения движения воздуха) и размещали в ламинарном боксе (“Labconco”, США) в течение 48 ч с последующим досушиванием в вакуумном шкафу (“Labconco”, США) до полного испарения растворителя. Полученные пленки взвешивали на лабораторных весах. Толщину пленок измеряли с помощью электронного цифрового микрометра (“LEGIONER EDM-25-0.001”, Германия). Пленочные образцы в форме гантели длиной 50 мм, шириной 6.1 мм, толщиной 100 мкм исследовали при комнатной температуре с помощью электромеханической разрывной машины “Instron 5565” (Великобритания). Модуль Юнга (E , МПа), напряжение при разрыве (σ , МПа) и удлинение при разрыве (ϵ , %) рассчитали с помощью программного обеспечения “Bluehill 2” (“Elancourt”, Франция). Погрешность измерений не превышала 10%.

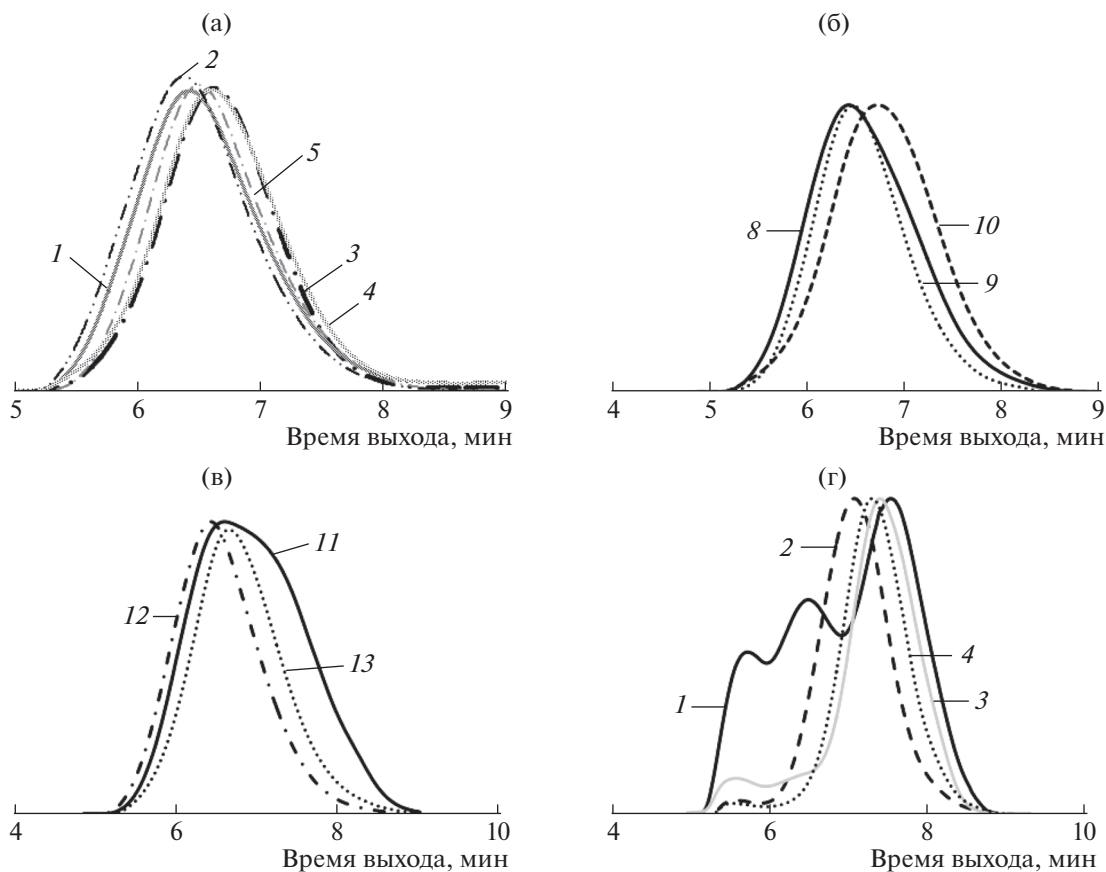


Рис. 1. Хроматограммы образцов ПГА: а – П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ); б – П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГ4МВ); в – П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ); г – П(ЗГБ)–ДЭГ. Здесь и на рис. 2, 3 цифры соответствуют обозначениям в табл. 1 (а–в) и 2 (г) для каждого типа ПГА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В специализированных условиях выращивания микроорганизмов–продуцентов синтезирована серия многокомпонентных полигидроксиалканатов, образованных мономерами с различной длиной С-цепи (коротко- и среднецепочечными).

Кристалличность является одной из важнейших характеристик полимерных материалов, определяя их структуру, термомеханические свойства, процессы перерабатываемости и характеристики получаемых изделий. Исходя из тенденции, ориентированной на поиск ПГА, обладающих пониженной степенью кристалличности, а также на основании имеющегося опыта, свидетельствующего о том, что наибольшее влияние на соотношение аморфной и упорядоченной фаз оказывают мономеры 4ГБ и ЗГГ, получены и исследованы сополимеры, содержащие микроблоки этих мономеров.

Набор 3-компонентных ПГА был представлен следующими составами: сополимеры ЗГБ, ЗГВ и 4ГБ; сополимеры ЗГБ, ЗГВ и ЗГГ; сополимеры ЗГБ, ЗГВ и ЗГ4МВ.

Впервые синтезированные 4-компонентные ПГА, содержащие мономеры ЗГБ, ЗГВ, 4ГВ и ЗГГ. В качестве необычных исследованы диблок-сополимеры ЗГБ и ДЭГ.

Свойства 3-компонентных ПГА

При исследовании молекулярно-массовых характеристик трехкомпонентных полимеров [П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ)] получены результаты, сопоставимые с определенными ранее для гомо- и 2-компонентных ПГА [11], показавших значительную вариабельность значений M_w и полидисперсности без наличия четкой связи между содержанием тех или иных мономеров в полимере и этими показателями. Зарегистрированные значения M_w для образцов П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) с различным соотношением мономеров лежали в интервале от 450 до 724 кДа (табл. 1). Приведенные в качестве примера хроматограммы распределения молекулярных масс полимеров этого типа (рис. 1а) свидетельствуют о вариабельности значения полидисперсности (от 3 до 4). При этом получен-

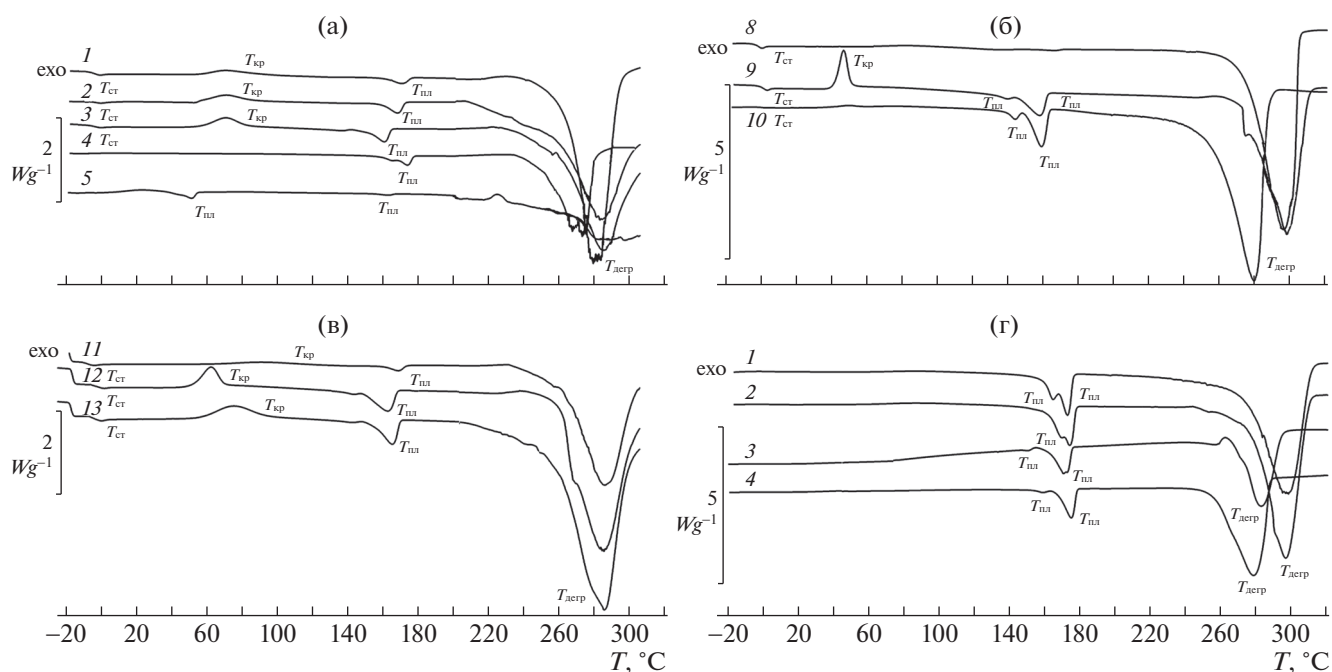


Рис. 2. Термограммы П(3ГБ/3ГВ/4ГБ) (а), П(3ГБ/3ГВ/3Г4МВ) (б), П(3ГБ/3ГВ/4ГБ/3ГГ) (в) и П(3ГБ)—ДЭГ (г).

ные значения полидисперсности превосходят эту величину у П(3ГБ).

Значения температуры последовательных фазовых переходов, определенные методом ДСК для 3-компонентных ПГА, приведены на рис. 2а и в табл. 1, из чего следует, что у большинства образцов П(3ГБ/3ГВ/4ГБ) значения, $T_{кр}$, $T_{пл}$ и $T_{дегр}$ имели более низкие показатели по сравнению с гомополимером П(3ГБ), у которого диапазон температуры кристаллизации 90–110°C пик 92°C, плавления 160–185°C, собственно пик $T_{пл}$ 178°C; а диапазон термического разложения лежит в интервале 275–280°C с узким пиком при 295°C. Для сополимеров П(3ГБ/3ГВ/4ГБ) температура плавления также ниже пика плавления гомогенного П(3ГБ), и эти изменения имели тенденцию к уменьшению с увеличением содержания звеньев мономеров 3ГВ и 4ГБ в полимере на фоне сокращения содержания 3ГБ. Самые низкие значения $T_{пл}$ зарегистрированы для образцов, содержащих от 7 до 13 мол. % звеньев 3ГВ и от 30 до 60 мол. % 4ГБ. Минимальные значения $T_{дегр}$ характерны для образца 3, содержащего 33 мол. % 4ГБ. Для других образцов (рис. 2а, образцы 1, 2 и 4, 5) отмечены более высокие значения температуры деградации, что, вероятно, может быть обусловлено образованием продуктов полураспада ПГА с их последующей деструкцией. Несмотря на выявленные отличия термических характеристик, заключающиеся в некотором понижении значений $T_{пл}$ и $T_{дегр}$, у всех исследованных образцов сохранялся разрыв между этими параметрами, близкий

к 110–130°C, значит, исследованные типы трехкомпонентных ПГА, независимо от набора и содержания звеньев сомономеров в них, сохраняли одно из важных свойств ПГА – термопластичность. Для всех образцов (кроме образца 4) не зафиксировано пиков кристаллизации при охлаждении. Кристаллизация образцов 1–3, 5 проходила при повторном нагревании (рис. 2а). У образцов 4, 5 как и у П(3ГБ) не зафиксировано стеклования. Стеклование образцов 1–3 произошло при температуре от –4 до –5°C.

Наиболее выраженное влияние состав сополимеров в П(3ГБ/3ГВ/4ГБ) оказывал на степень кристалличности C_x (табл. 1; рис. 3а). Самое низкое значение степени кристалличности (9%) получено для сополимеров, в которых суммарное содержание звеньев 4ГБ и 3ГВ было выше 50 мол. %, содержание 3ГБ соответственно ниже 50 мол. % (табл. 1, образец 4). На примере исследованных трехкомпонентных ПГА, образованных мономерами 3ГБ, 3ГВ и 4ГБ, показана возможность получения материала с различной степенью кристалличности, включая образцы с величиной C_x ниже 10%, практически, близких к аморфны. Сопоставление полученных результатов с литературными данными затруднительно в связи с ограниченностью и неоднозначностью информации о физико-химических свойствах сополимеров этого типа, несмотря на то что имеется представительная серия публикаций [13–17]. В этих работах в основном исследованы молекулярно-массовые характеристики образцов П(3ГБ/3ГВ/4ГБ), в ко-

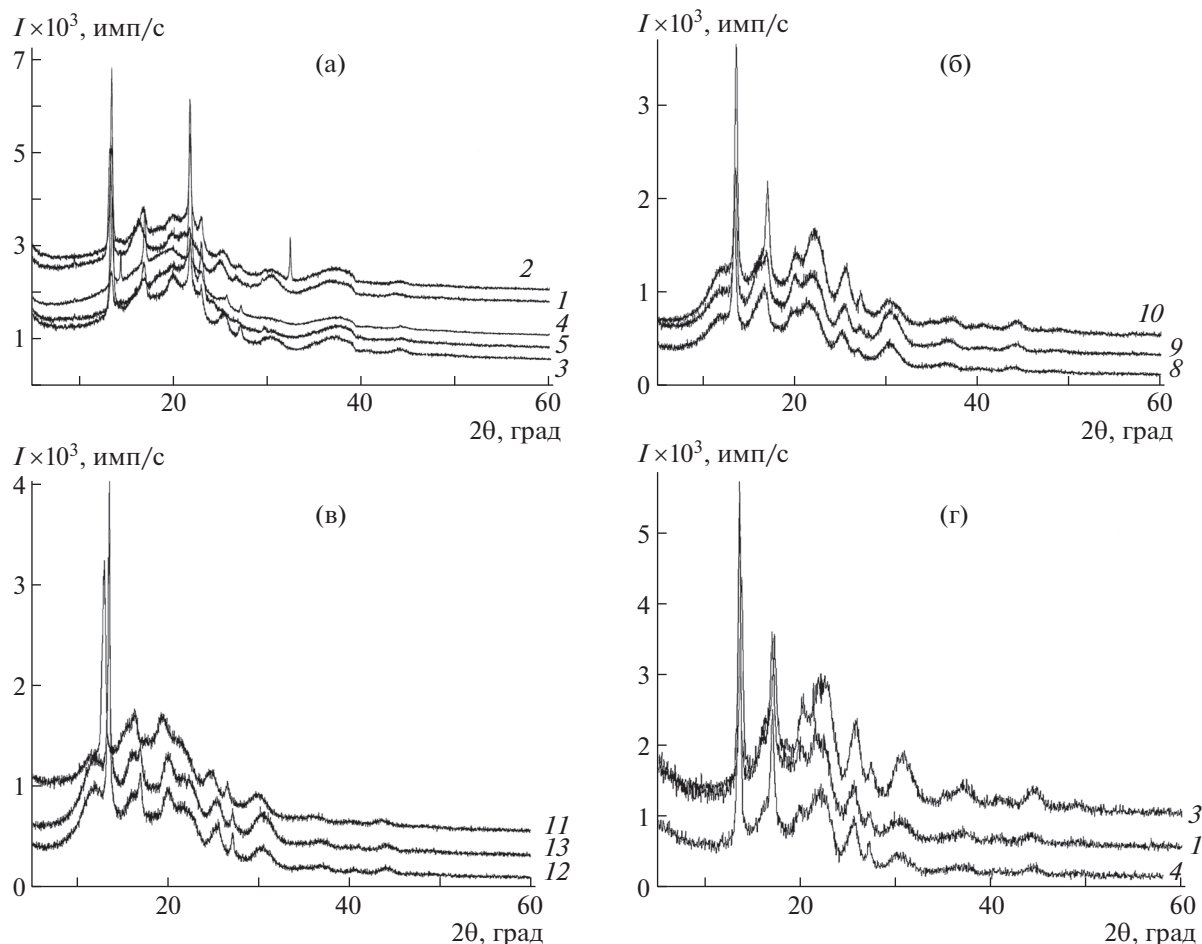


Рис. 3. Рентгенограммы П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) (а), П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГ4МВ) (б), П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ) (в) и П(ЗГБ)–ДЭГ (г).

торых содержание звеньев ЗГВ и 4ГБ варьировалось в очень широких пределах от единиц до десятков мол. %. Полученные значения M_w и полидисперсности зарегистрированы соответственно от 177 до 1100 кДа и 1.13 до 6.46 без наличия связи с соотношением мономеров и содержанием фракций мономеров ЗГВ и 4ГБ. В меньшей степени в этих работах исследованы температурные характеристики образцов П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ); однако их анализ свидетельствует о значительном разбросе данных по $T_{пл}$ от 54–100°C [2] до 140°C [15]. Данных о степени кристалличности трехкомпонентных ПГА этого типа в указанных публикациях не выявлено.

Исследование 3-компонентных ПГА состава П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ), у которых помимо звеньев ЗГБ и ЗГВ в составе присутствовали звенья ЗГГ, дало аналогичную, но менее выраженную картину изменений величины C_x (табл. 1). Относительно сополимеров этого типа следует отметить трудности синтеза таких образцов и достижения высокого содержания в них звеньев ЗГГ. Это связано с большей токсичностью для микроорганизмов не-

обходимого в качестве субстрата-предшественника гексаноата, а также и с тем, что последний метаболизируется в цикле β -окисления жирных кислот на более короткие фрагменты (C4+C2), понижая тем самым количество субстрата для образования и включения в полимерную цепь мономеров ЗГГ. Полученные значения степени кристалличности для образцов П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ) с содержанием звеньев ЗГГ порядка 10–13 мол. % и звеньев ЗГВ 1.8–23.4 мол. % зарегистрированы на уровне 60–63%. Относительно молекулярно-массовых характеристик ПГА этого типа, также отмечены значительные колебания значений M_w и полидисперсности от 540 до 924 и 3.5–4.1 соответственно. Значения $T_{пл}$ и $T_{дегр}$ составили 172–176 и 270–271°C. Образец 6 имел два значения критической температуры, часть образца кристаллизовалась при охлаждении, а при последующем нагревании происходила докристаллизация. Анализ литературы выявил серию работ по исследованию свойств 3-компонентных ПГА с аналогичным набором мономеров, в которых содержание звеньев ЗГГ составляло менее 10 мол. % [18,

19], до 15 мол. % [20] и до 28–33 мол. % [21] при изменении содержания мономеров ЗГВ и ЗГБ от единиц до 60–80 мол. %. В этих работах отсутствуют данные о степени кристалличности, и показаны широкие границы для значений M_w (от 400–600 до 1600 и 2500 кДа) и разброс значений $T_{пл}$ от 58–90 до 120–142°C.

Третий тип исследованных 3-компонентных полимеров [П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГ4МВ)] содержал помимо ЗГБ и ЗГВ звенья ЗГ4МВ (табл. 1). Это относительно малоизученный тип ПГА, свойства которого начали исследовать сравнительно недавно [22–24]. В настоящей работе изучали образцы сополимеров этого типа с относительно невысоким содержанием звеньев ЗГ4МВ (от 1.1 до 6.6 мол. %), имеющих в качестве второго мономера ЗГВ в количестве от 8.2 до 38.6 мол. % и доминирующие концентрации мономеров ЗГБ, имели значения C_x (от 41 до 49%). Это выше в 2.0–2.5 раза значений C_x , полученных в работе [22] на образцах с аналогичным набором мономеров, но содержащих большее количество звеньев ЗГ4МВ (от 4 до 12 мол. %). Полученные результаты позволяют считать, что звенья ЗГ4МВ, аналогично ЗГВ, 4ГБ и ЗГГ, при включении в С-цепь ЗГБ вызывают понижение C_x . Зарегистрированные и варьирующие значения M_w и полидисперсности (табл. 1; рис. 1б) близки результатам других авторов.

Новые данные получены при исследовании температурных характеристик П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГ4МВ) (рис. 2б, табл. 1). На представленных термограммах в зоне плавления четко зафиксировано наличие двух пиков, различающихся по величине на 15–16°C. Этот эффект не был обнаружен авторами работ, исследующих аналогичные полимеры. Однако в работе [23] наличие двух пиков в области плавления зафиксировано у 2-компонентных образцов П(ЗГБ/ЗГ4МВ) с содержанием звеньев ЗГ4МВ от 2–7 до 13–16 мол. %. Второе отличие в термическом поведении П(ЗГБ/ЗГВ/ЗГ4МВ) заключается в обнаруженном значительном (порядка 140–150°C) разрыве между $T_{пл}$ и $T_{дегр}$ у образца 9 с содержанием звеньев ЗГВ и ЗГ4МВ 24.9 и 6.6 мол. % соответственно (табл. 1), это значительно выше известных и полученных ранее данных для различных ПГА. У образца с содержанием ЗГ4МВ 1.1 мол. % и ЗГВ 38.6 мол. % (табл. 1, рис. 2б) не зафиксировано пиков плавления и кристаллизации при наличии пика $T_{дегр}$ (295°C). Образец 9 кристаллизовался при последующем нагревании; кристаллизация образца 10 происходила при охлаждении. Аналогичный эффект был получен в работе [25] при исследовании 3-компонентных полимеров иного состава – П(ЗГБ/4ГБ/ЗГГ). По всей видимости, это связано с тем, что при включении в решетку ЗГБ иных мо-

номеров сдерживается процесс кристаллизации, что подтверждается отсутствием пика $T_{пл}$.

Свойства 4-компонентных ПГА

4-компонентные ПГА – [П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ)] образованы мономерами ЗГБ, ЗГВ, 4ГБ и ЗГГ; в этих сополимерах доминирующими были звенья ЗГБ, а суммарное содержание звеньев трех других мономеров минимально составило 16.8 мол. %, максимально – 31.5 мол. %. Трудности биосинтеза многокомпонентных ПГА и возможность повышения содержания в них звеньев, отличных от ЗГБ, связаны с необходимостью внесения в состав культивационной среды, помимо основного углеродного субстрата, субстратов-предшественников, необходимых для образования целевых звеньев. Несмотря на установленные нами ранее зависимости удельных значений скорости синтеза ПГА изучаемыми бактериальными штаммами от предельно допустимых для них концентраций субстратов предшественников (валерата калия, γ -бутиролактона, гексаноата калия, 4-метилвалерата калия и других), необходимость одновременного их внесения в культуру негативно отражалась на продукционных показателях процесса биосинтеза, общем выходе и химическом составе ПГА. Несмотря на относительно невысокое содержание мономеров ЗГВ, 4ГБ, ЗГГ, для синтезированных образцов П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ) характерны пониженные значения C_x (30–41%), разброс значений M_w (от 429 до 814 кДа) и зафиксированные высокие значения полидисперсности (4.7–6.2), свидетельствующие о неоднородности фракций полимера (табл. 1; рис. 1в). Разрыв между $T_{пл}$ и $T_{дегр}$ у разных образцов сохранялся и составлял 117–125°C (табл. 1; рис. 2в). Образец 11 кристаллизовался при охлаждении. Для этого образца зафиксирована самая низкая температура стеклования. В литературе не обнаружено данных о свойствах ПГА состава П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ/ЗГГ). Опубликованные результаты исследования 4-компонентных ПГА с иным набором мономеров – ЗГБ/ЗГВ/3-гидроксигексакандеоат/3-гидроксиоктандеоат [26], ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ/3-гидроксиоктандеоат [27, 28] содержат фрагментарные данные по величине M_w и $T_{пл}$ отдельных образцов. Только в работе [29] определены значения C_x практически на одинаковом уровне 14–15% для двух образцов сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ/3-гидрокси-метилвалерат (ЗГМВ)/3-гидрокси-метилбутират (ЗГМБ)). В этих образцах суммарное содержание звеньев ЗГВ, ЗГМВ, ЗГМБ значительно отличалось, составляя в одном образце 90, а во втором 54 мол. % [29].

Таблица 2. Свойства сополимеров П(ЗГБ)–ДЭГ

Сополимер, №	Содержание звеньев ДЭГ, мол. %	M_w , кДа (содержание фракции, мас.%)	Полидисперсность	C_x , %	$T_{пл}$, °С	$T_{дегр}$, °С	$T_{кр}$, °С
1	0.2	46 (55%)	2.0	69	164–172	295	84
		465 (33%)	1.2				
		3726 (12%)	1.1				
2	0.4	167 (87%)	2.9	67	169–173	295	72
		2700 (13%)	1.3				
3	0.8	67 (96%)	2.2	56	150–170	257–282	69
		4859 (4%)	1.2				
4	3.0	72 (95%)	2.6	58	162–172	276	78
		4205 (5%)	1.2				

Примечание. Приведены значения температуры для фракции с максимальным содержанием.

Свойства диблок-сополимеров ПГА–ДЭГ

Еще один тип исследованных ПГА – это диблок-сополимеры П(ЗГБ)/ДЭГ (табл. 2). Эти сополимеры относят к “необычным” ПГА. Известна серия работ, посвященных изучению микробиологического синтеза сополимеров П(ЗГБ) и полиэтиленгликоля разной молекулярной массы. В связи с тем, что ПЭГ используют для улучшения свойств материалов и изделий медико-биологического назначения, возникло предположение, что включение ПЭГ в цепь П(ЗГБ) может влиять на свойства полимера и улучшить технологические свойства изделий [30]. Установлено, что при наличии в культивационной среде ПЭГ возможен микробиологический синтез диблок-сополимера ПГА–ПЭГ, где карбоксильный конец (–COOH) цепей ПГА ковалентно связан эфирной связью с цепью ПЭГ. Это явление было названо “REGylation” [30]. Так как ПЭГ блокирует удлинение С-цепи, синтез сополимеров этого типа с высокими выходами и значительным содержанием ПЭГ в ПГА проблематичен. Выполненный анализ публикаций показал наличие информации о физико-химических свойствах образцов при крайней ограниченности данных о количественном содержании в них ПЭГ, что не позволяет судить о влиянии состава ПГА–ПЭГ и соотношения в нем мономеров на свойства.

Получены и исследованы образцы П(ЗГБ)–ДЭГ с содержанием звеньев ДЭГ от 0.2 до 3.0 мол. %. При исследовании молекулярно-массовых характеристик (рис. 1г) выявлено, что сополимеры по величине M_w неоднородны. Так, сополимеры, в которых доля звеньев ДЭГ составляла 0.4, 0.8 и 3.0 мол. % (табл. 2, образцы 2–4), содержали две фракции – низкомолекулярного полимера (M_w 167, 67 и 72 кДа соответственно) и высокомолекулярного (2700, 4900 и 4200 кДа). При этом соотношение этих двух фракций в полимере было

неравномерным, фракция низкомолекулярного полимера доминировала, составляя 87–96%. Полученные данные сопоставимы с результатами других авторов, которые также зафиксировали неоднородность ПГА этого типа по величине M_w [31]. В работе [32] описаны образцы, синтезированные *A. latus* DSM 1122 и *A. eutrophus* ATCC 17699 при росте на среде, содержащей ПЭГ-200, в которых одна фракция полимера имела значение M_w 390–670 и 1150–1290 кДа, а вторая – 25–36 и 85–189 кДа соответственно. Впервые обнаружено наличие в сополимерах П(ЗГБ)–ДЭГ трех фракций с различными значениями M_w : низкомолекулярного (46 кДа); среднемолекулярного (465 кДа) и высокомолекулярного (3700 кДа) (табл. 2). Соотношение трех фракций в полимере также было неравномерным.

Неоднородность П(ЗГБ)–ДЭГ подтверждена исследованием температурных характеристик методом ДСК (табл. 2; рис. 2г). На термограммах всех исследованных образцов П(ЗГБ)–ДЭГ зарегистрировано наличие двух близко лежащих пиков в области плавления, разрыв между которыми минимально составил 4°С, максимально 20°С. У образца с долей звеньев ДЭГ 0.8 мол. %, помимо двух пиков в области плавления, зарегистрированы два пика в области термической деградации с разрывом в 25°С (257 и 282°С). Кристаллизация всех образцов проходила при охлаждении в области температуры от 69 до 84°С. Температура стеклования образцов не зафиксирована.

Результаты структурного анализа образцов П(ЗГБ)–ДЭГ показывают, что включение звеньев ДЭГ в цепь П(ЗГБ) понижает C_x , т.е. при REGylation цепи П(ЗГБ) имеет место аморфизация полимера. Тенденция понижения величины C_x просматривается по мере увеличения содержания звеньев ДЭГ в сополимере. Понижение C_x

Таблица 3. Физико-механические характеристики сополимерных ПГА

Сополимер*, №	Напряжение при разрыве, МПа	Модуль Юнга, МПа	Удлинение при разрыве, %
П(ЗГБ)	16.7	2071	2.5
1	8.1	239	231
5	10.1	37	371
6	9.4	257	390
8	9.0	258	13
9	12.8	721	31
11	6.9	107	98
12	12.7	432	206
ЗГБ/ДЭГ	6.3	503	2

*Номера сополимеров даны по табл. 1.

у сополимерных образцов П(ЗГБ)—ДЭГ отмечено в работах [33, 34].

Результаты измерения физико-механических характеристик пленок, изготовленных из ПГА различного химического состава, представлены в табл. 3. Все сополимерные образцы ПГА, за исключением диблок-сополимеров П(ЗГБ)—ДЭГ, независимо от количества и соотношения звеньев мономеров, имели в разной степени выраженное повышение значений удлинения при разрыве на фоне понижения напряжений при разрыве и модуля Юнга. Увеличение эластичности в большей степени характерно для 3-компонентных образцов, содержащих, помимо мономеров ЗГБ и 3ГВ, мономер 4ГБ или 3ГГ. Понижение показателей механической прочности имело место у всех сополимерных образцов. Наиболее значительное падение модуля Юнга (до 37.51 МПа) зарегистрировано для 3-компонентного образца П(ЗГБ/3ГВ/4ГБ) с максимальным содержанием звеньев 4ГБ (60.4 мол. %), это в 55 раз ниже, чем у П(ЗГБ). Для остальных сополимерных образцов этот показатель уменьшился по сравнению с П(ЗГБ) (2071.20 МПа) в меньшей степени (до 106.71—721.0 МПа). Изменения напряжений при разрыве имели аналогичную динамику.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sudesh K., Abe H., Doi Y.* // Prog. Polym. Sci. 2000. V. 25. P. 1503.
2. *Chanprateep S.* // J. Biosci. Bioeng. 2010. V. 110. P. 621.
3. *Chen G.-Q.* Industrial production of PHA / Ed. by G.-Q. Chen, A. Steinbüchel. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. P. 121.
4. *Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sinskey A.J.* Degradable Polymers: Production, Properties and Applications. New York: Nova Science Publ., 2013.
5. *Fernández-Pérez M.* // J. Environ. Sci. Health. B. 2007. V. 42. P. 857.
6. *Volova T.G., Zhila N.O., Vinogradova O.N., Nikolaeva E.D., Kiselev E.G., Shumilova A.A., Shershneva A.M., Shishatskaya E.I.* // J. Env. Sci. Health. B. 2016. V. 51. P. 113.
7. *Volova T.G., Zhila N.O., Vinogradova O.N., Shumilova A.A., Prudnikova S.V., Shishatskaya E.I.* // Environ. Sci. Pollut. Res. 2016. Doi: doi 10.1007/s11356-015-5739-1
8. *Steinbüchel A., Valentin H.E.* // FEMS Microbiol. Lett. 1995. V. 128. P. 219.
9. *Olivera E.R., Arcos M., Naharro G., Luengo J.M.* Unusual PHA biosynthesis / Ed. by G.-Q. Chen, A. Steinbüchel. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2010. P. 133.
10. *Volova T.G., Kalacheva G.S., Steinbüchel A.* // Macromol. Symp. 2008. V. 269. P. 1.
11. *Volova T.G., Zhila N.O., Shishatskaya E.I., Mironov P.V., Vasil'ev A.D., Sukovatyi A.G., Sinskey A.J.* // Polymer Science. A. 2013. V. 55. № 7. P. 427.
12. *Волова Т.Г., Шушацкая Е.И.* Пат. 2439143 Россия. 2012.
13. *Madden L., Anderson A.J., Asrar J., Garrett P.* // Polymer. 2000. V. 41. P. 3499.
14. *Chanprateep S., Kulpreecha S.* // J. Biosci. Bioeng. 2006. V. 101. P. 51.
15. *Koller M., Hesse P., Bona R., Kutschera C., Atlić A., Braunegg G.* // Macromol. Symp. 2007. V. 253. P. 33.
16. *Azira T.M.F., Nursolehah A.A., Norhayati Y., Majid M.I.A., Amirul A.A.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 27. P. 2287.
17. *Ramachandran H., Iqbal N.Md., Sipaut C.S., Abdullah A. A.-A.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. V. 164. P. 867.
18. *Bhubalan K., Lee W.-H., Loo C.-Y., Yamamoto T., Tsuge T., Doi Y., Sudesh K.* // Polym. Degrad. Stab. 2008. V. 93. P. 17.
19. *Bhubalan K., Rathi D.-N., Abe H., Iwata T., Sudesh K.* // Polym. Degrad. Stab. 2010. V. 95. P. 1436.
20. *Zhao W., Chen G.-Q.* // Proc. Biochem. 2007. V. 42. P. 1342.
21. *Zhang H.-F., Ma L., Wang Z.-H., Chen G.-Q.* // Biotechnol. Bioeng. 2009. V. 104. P. 582.

22. *Dai Y., Yuan Z., Jack K., Keller J.* // J. Biotechnol. 2007. V. 129. P. 489.
23. *Tanadchangsang N., Kitagawa A., Yamamoto T., Abe H., Tsuge T.* // Biomacromolecules. 2009. V. 10. P. 2866.
24. *Saika A., Watanabe Y., Sudesh K., Abe H., Tsuge T.* // AMB Express. 2011. V. 1. P. 1.
25. *Xie W.P., Chen G.-Q.* // Biochem. Eng. J. 2008. V. 38. P. 384.
26. *Singh A.K., Mallick N.* // Lett. Appl. Microbiol. 2008. V. 46. P. 350.
27. *Green P.R., Kemper J., Schechtman L., Guo L., Satkowski M., Fiedler S., Steinbüchel A., Rehm B.H.A.* // Biomacromolecules. 2002. V. 3. P. 208.
28. *Rathinasabapathy A., Ramsay B.A., Ramsay J.A., Pérez-Guevara F.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 30. P. 1409.
29. *Dai Y., Lambert L., Yuan Z., Keller J.* // J. Biotechnol. 2008. V. 134. P. 137.
30. *Foster L.J.R.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 75. P. 1241.
31. *Sanguanchaipaiwong V.* // Thes. "Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoate Based Natural-Synthetic Hybrid Copolymers". Sydney: School of Biotechnology and Biomolecular Sci. Univ. of New South Wales Sydney, 2007.
32. *Ashby R.D., Shi F., Gross R.A.* // Biotechnol. Bioeng. 1999. V. 62. P. 106.
33. *Sanguanchaipaiwong V., Gabelish C.L., Hook J., Scholz C., Foster L.J.R.* // Biomacromolecules. 2004. V. 5. P. 643.
34. *Chan R.T.H., Russell R.A., Marçal H., Lee T.H., Holden P.J., Foster L.J.R.* // Biomacromolecules. 2014. V. 15. P. 339.