

БИОТЕХ

**ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА-СО-3-ОКСИВАЛЕРАТА-ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ,
ПОЛУЧЕННОГО МЕТОДОМ КОНТРОЛИРУЕМОГО
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО БИОСИНТЕЗА**

Бонарцев Антон Павлович

*вед. науч. сотр., Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
РФ, г. Москва*

E-mail: ant_bonar@mail.ru

Воинова Вера Владимировна

*ст. науч. сотр., Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
РФ, г. Москва*

E-mail: veravoinova@mail.ru

Акулина Елизавета Александровна

*мл. науч. сотр., Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
РФ, г. Москва*

E-mail: akoulinaliza@gmail.com

Дудун Андрей Андреевич

*аспирант, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Институт биохимии
им. А.Н. Баха,
РФ, г. Москва*

E-mail: dudunandrey@mail.ru

Жаркова Ирина Игоревна

*мл. науч. сотр., Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
РФ, г. Москва*

E-mail: iblkr@mail.ru

Жуйков Всеволод Александрович

*науч. сотр., Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Институт биохимии
им. А.Н. Баха,
РФ, г. Москва*

E-mail: vsevolod1905@yandex.ru

Меньших Ксения Андреевна

*магистрант, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
РФ, г. Москва*

E-mail: kamenshikh@gmail.com

Чеснокова Дарьяна Владимировна

*магистрант, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
РФ, г. Москва*

E-mail: daryana8@yandex.ru

Махина Татьяна Константиновна

науч. сотр., Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха, РФ, г. Москва
E-mail: <mailto:bonar@inbi.ras.ru>

Бонарцева Гарина Александровна

ст. науч. сотр., Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, Институт биохимии им. А.Н. Баха,
РФ, г. Москва
E-mail: bonar@inbi.ras.ru

Парий Игорь Олегович

инженер, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Национальный исследовательский Томский политехнический университет»
РФ, г. Томск
E-mail: igor-parij1995@mail.ru

Сурменев Роман Анатольевич

вед. науч. сотр., федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»
РФ, г. Томск
E-mail: rsurmenev@mail.ru

Сурменева Мария Александровна

ст. науч. сотр., федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»
РФ, г. Томск
E-mail: surmenevamaria@mail.ru

**PIEZOELECTRIC PROPERTIES
OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HEDROXYBUTYRATE)-CO-POLY(ETHYLENE
GLYCOL) PRODUCED BY CONTROLLED MICROBIOLOGICAL BIOSYNTHESIS**

Anton Bonartsev

leading researcher, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow

Vera Voinova

senior researcher, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow

Elizaveta Akoulina

junior researcher, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow

Andrey Dudun

Ph.D. student, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
A.N. Bach Institute of Biochemistry,
Russia, Moscow

Irina Zharkova

junior researcher, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow

Vsevolod Zhuikov

*researcher, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
A.N. Bach Institute of Biochemistry,
Russia, Moscow*

Ksenia Menshikh

*student, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow*

Dariana Chesnokova

*student, M.V.Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Russia, Moscow*

Tatiana Makhina

*researcher, Ph.D. student, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
A.N. Bach Institute of Biochemistry,
Russia, Moscow*

Garina Bonartseva

*senior researcher, Ph.D. student, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
A.N. Bach Institute of Biochemistry,
Russia, Moscow*

Igor Pariy

*engineer, National Research Tomsk Polytechnic University,
Russia, Tomsk*

Roman Surmenev

*leading researcher, National Research Tomsk Polytechnic University,
Russia, Tomsk*

Maria Surmeneva

*senior researcher, National Research Tomsk Polytechnic University,
Russia, Tomsk*

АННОТАЦИЯ

Методом контролируемого биосинтеза получен терполимер поли-3-оксибутират-3-оксивалерат-полиэтиленгликоль. Были получены пленки из этого полимера и исследованы его физико-термические и пьезоэлектрические свойства. Показано, что несмотря на существенный разброс в значениях среднеквадратичной шероховатости, влияющих на амплитуду пьезоэлектрических колебаний полимерных пленок, у образца пленки терполимера наблюдается более высокий пьезоотклик, чем у образца пленки из гомополимера ПОБ.

ABSTRACT

The technique of controlled biosynthesis the terpolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-co-poly(ethylene glycol) was produced. The films from this polymer were obtained and their physico-thermal and piezoelectric properties were investigated. It was shown that despite a significant distribution in the mean-square roughness values, which affect the amplitude of the piezoelectric vibrations of polymer films, the terpolymer film sample has a higher piezoelectric response than the film sample from the PHB homopolymer.

Ключевые слова: поли-3-оксибутират, поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат, полиэтиленгликоль, кристалличность, пьезоэлектрический отклик, d_{33} коэффициент, пьезосиловая микроскопия.

Keywords: poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-co-poly(ethylene glycol), poly(ethylene glycol), crystallinity, piezoelectric response, d_{33} coefficient, piezoresponse force microscopy.

Введение.

Поли-3-оксибутират (ПОБ) является основным представителем класса природных полиэфиров - (ПОА). ПОБ является биоразлагаемым полимером и обладает высокой биосовместимостью, что позволяет использовать его для изготовления полимерных

медицинских изделий и лекарственных форм. ПОБ и его сополимеры получают биотехнологическим путем, который позволяет задавать и контролировать в процессе биосинтеза физико-химические свойства биополимеров в узких пределах, а также достичь высокой степени их чистоты. ПОБ является частич-

но кристаллическим полимером, что в значительной мере определяет его основные физико-химические свойства, а также нано- и микроструктуру изготавливаемых на его основе изделий [1,17]. Кроме того, ПОБ является пьезоэлектриком [5], хотя при этом имеет низкий пьезоэлектрический отклик по сравнению с поливинилиденфторидом или пьезокерамикой [15,16]. Благодаря этим качествам ПГБ успешно применяется для восстановления костной, кожной и нервной тканей [4,13]. Для увеличения пьезоэлектрического отклика разработаны гибриды на основе органических полимеров, например ПОБ и полианилина (ПОБ/ПАНИ) [5], композиты с пьезоэлектрической керамикой - цирконатом-титанатом свинца (ПОБ/ЦТС) [12].

К сожалению, некоторые физико-химические свойства гомополимера ПОБ: высокая гидрофобность, низкая пластичность, высокая степень кристалличности могут ограничивать его биомедицинское применение. Например, эти свойства могут препятствовать использованию ПОБ для разработки протезов кровеносных сосудов [1]. Для улучшения физико-химических свойств этого биополимера были применены различные подходы: получение композитов, химическая сшивка с другими полимерами. Одним из наиболее перспективных для получения полимеров медицинского назначения является метод контролируемого биосинтеза, когда химическая структура полимера, а значит, и его физико-химические свойства задаются в процессе его биотехнологического получения. Оказалось возможным регулировать молекулярную массу полимера и получать различные сополимеры ПОБ путем добавления в культуральную среду штамма-продуцента этого биополимера дополнительных источников углерода. углеродного питания. С помощью этого метода можно получать даже сополимеры ПОБ не только с остатками других 3-гидроксикарбоновых кислот, но и с синтетическими полимерами, такими как полиэтиленгликоль [3].

Целью данной работы являлось сравнение пьезоэлектрических свойств гомополимера ПОБ и его терполимера - поли-3-оксибутират-3-оксивалерат-полиэтиленгликоля, полученного биотехнологическим путем.

Методы.

Для биосинтеза сополимера ПОБ был использован штамм *Azotobacter chroococcum* 7Б - азотфиксирующая несимбиотическая бактерия, способная накапливать полимер до 80% от веса сухих клеток. Штамм был выделен из ризосферы пшеницы (дерново-подзолистой почвы) и поддерживается на среде Эшби, содержащей 0.2 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.2 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 г/л NaCl, 0.006 г/л $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 5.0 г/л $CaCO_3$, 20 г/л сахарозы, and 20 г/л агара. Для биосинтеза ПОБ культуру выращивали в колбах с 200 мл среды при 30°C в микробиологической качалке Innova 43 (New Brunswick Scientific, США) при перемешивании со скоростью 250 об/мин в среде Берка, содержащей 0.4 г/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 г/л $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.006 г/л $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.5 г/л

цитрата натрия, 0.1 г/л $CaCl_2$, 1.05 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.2 г/л KH_2PO_4 , and 17 г/л (50 mM) сахарозы в качестве основного источника углерода. Для биосинтеза сополимера ПОБ в культуральную среду был добавлен дополнительные источники углерода: как предшественник 3-оксивалерата в полимерной цепи сополимера добавляли валерат натрия в концентрации 20 mM через 12 часов после начала культивирования и полиэтиленгликоль в концентрации 150 mM согласно полученным ранее данным [3]. Продолжительность эксперимента составлял 72 ч. Оптическую плотность в ходе роста культуры контролировали методом нефелометрии. Для наблюдения и контроля роста культуры и накопления в клетках полимера использовали световой микроскоп Биомед-1 (Biomed, Russia). Измеряли следующие параметры биосинтеза сополимеров: урожай биомассы (г/л среды) и общее содержание полимера в клетках (вес.% от сухого веса клеток), которые определяли согласно ранее разработанным методикам [3].

Процесс выделения и очистки полимера из биомассы штамма-продуцента включал стадии выделения полимера экстракцией хлороформом, фильтрование, осаждение полимера изопропиловым спиртом, очистку полимера путем нескольких циклов растворения-осаждения и высушивание согласно [3].

Спектры 1H ЯМР 1% (вес./об.) растворов полимеров в дейтерированном хлороформе были сняты на спектрометре MSL-300 300 МГц (Bruker, Германия) с экспериментальными параметрами: температура 313 К, релаксационная задержка 2.5 с, ширина спектрального окна – 10000 Гц. Химические сдвиги (в миллионных долях) выставлены по сигналу остаточных протонов $CDCl_3$ (7.24 м.д. по ТМС). Количество накоплений NS – 40 [3].

Процентное содержание мономеров 3-оксивалерата (ЗОВ) в сополимере ПОБВ рассчитывали по соотношению интегральных интенсивностей сигнала метильной группы 3-оксивалерата (0.89 м.д.) и суммарных сигналов метильной группы 3-оксивалерата (0.89 м.д.) и метильной группы 3-оксибутирата (1.27 м.д.). Процентное содержание элементарных звеньев ЭГ в сополимере ПОБВ-ПЭГ рассчитывали по соотношению суммы интегральных интенсивностей сигнала группы ЭГ– CH_2 – (3,61; 3,70; 3,66; 3,73; 4,24 м.д.) к сумме интегральных интенсивностей сигналов метильных групп 3-оксибутирата, 3-оксивалерата и ПЭГ (1,27 м.д.) [3].

Для определения молекулярной массы (ММ) полимера использовали метод капиллярной вискозиметрии, после чего по уравнению Марка-Хаувинка-Куна вычисляли ее значение. Физико-термические свойства полимера изучали при помощи метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), который позволял определить как температуры плавления и кристаллизации, так и теплоты плавления и кристаллизации. Температуру начала и максимума пика кристаллизации или плавления обозначали как $T_{пл.}^0$, $T_{пл.}^{пик}$. и $T_{кр.}^{пик}$, соответственно. Кристалличность ПОА (X_c) рассчитывали согласно:

$$X_c = \Delta H_m(ПОА) / \Delta H_m(ПОБ) \times 100\%,$$

где $\Delta H_m^0(\text{ПОВ})$ – теоретическое значение термодинамической энтальпии плавления, которая составляет 146.6 Дж/г у 100% кристаллического ПОВ, а $\Delta H_m(\text{ПОА})$ – экспериментальная энтальпия плавления для исследуемого образца ПОА [3].

Для получения данных о пьезоэлектрическом отклике использовалась пьезосиловая микроскопия (ПСМ) (Ntegra Spectra II with SNA-2 head, NT-MDT BV, Нидерланды). Для этого образцы каждой груп-

пы исследовались в трех разных участках поверхности. Сканирование проводилось кантилевером серии NSG01/Pt на частоте 100 КГц в области 50×50 мкм² при 3-9 В (рис. 1).

Результаты и обсуждение.

Физико-химические свойства ПОВ и его сополимера, полученного биотехнологическим путем, представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Физико-химические свойства пленок ПОА

Образец	Содержание 3-ОВ/ЕГ моль%	ММ, $\times 10^3$ г/моль	$T_{кр. пик}, ^\circ\text{C}$	$T_{пл.}^0 / T_{пл. пик}, ^\circ\text{C}$	$X_c, \%$
ПОВ	0,0/0,0	364	87	159/176	65
ПОВВ	5,9/0,0	820	81	155/167	51
ПОВВ-ПЭГ	7,5/0,2	290	75	153/175	60

Таким образом, полученный сополимер ПОВВ-ПЭГ обладает немного меньшими значениями степени кристалличности по сравнению с гомополимером ПОВ, но большими, чем у ПОВВ, хотя ПОВВ

обладает гораздо большей молекулярной массой, что надо учитывать при сравнении свойств полимеров.

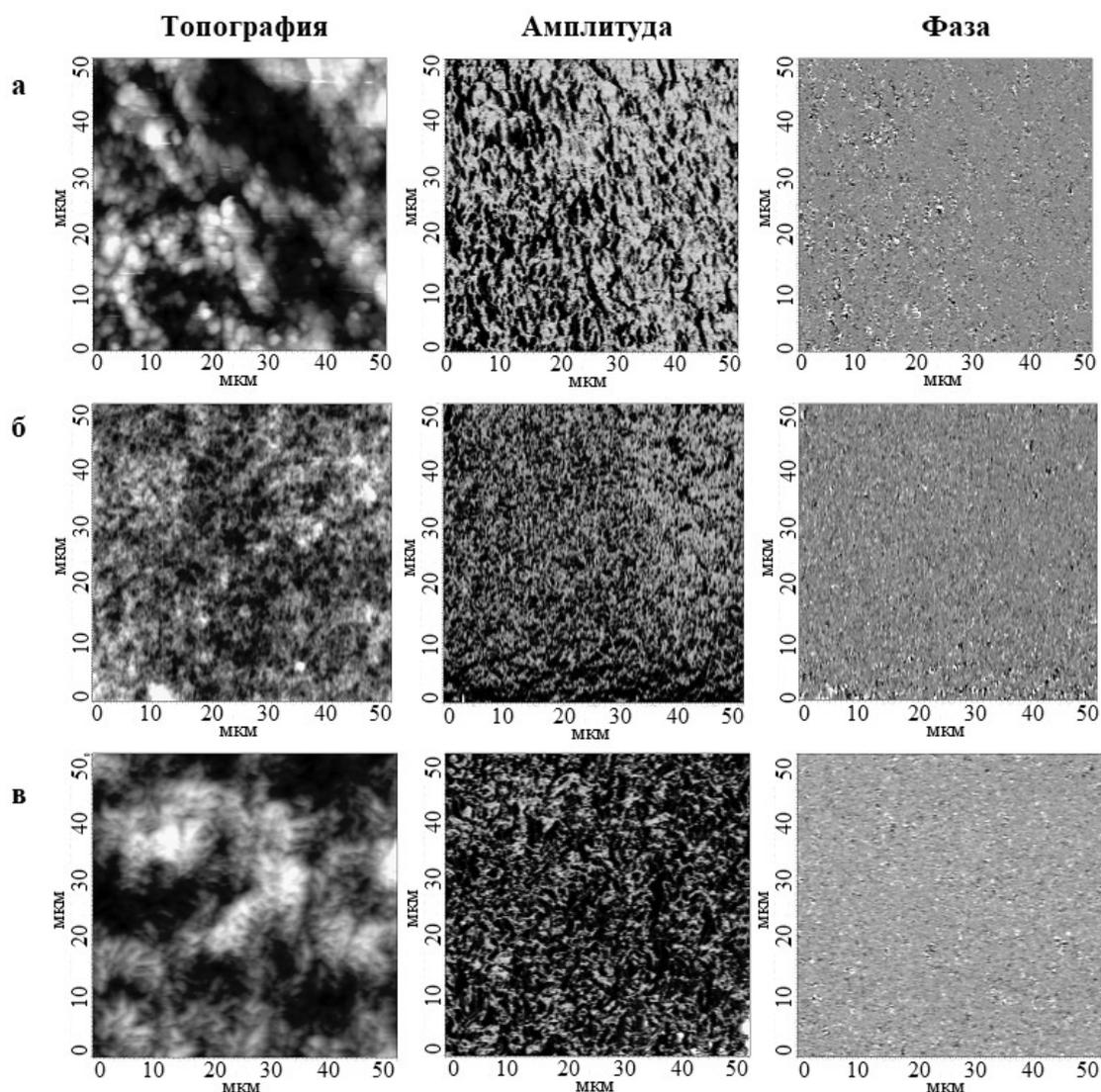


Рисунок 1. ПСМ изображения топографии, амплитуды и фазы образцов: а) ПОВ, б) ПОВВ, в) ПОВВ-ПЭГ

Для расчёта d_{33} коэффициента использовалась методика, описанная в работе [8]. ПСМ является надежным и эффективным методом исследования в случае достаточно жестких образцов (в этом случае система имеет высокую добротность). На амплитуду

также могут оказывать влияние другие физические эффекты (например, электростатические силы, взаимодействие между наконечником и образцом и т.д.) [7,9]. Рассчитанные d_{33} коэффициенты приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Пьезоэлектрический отклик и среднеквадратичная шероховатость (R_q) образцов

Образец	Толщина пленки, мкм	d_{33} , пм/В	Шероховатость, нм
ПОБ	250	1,90 ±0,03	203,6 ±8,3
ПОБВ	281	1,47 ±0,10	302,1 ±14,4
ПОБВ-ПЭГ	270	2,82 ±0,17	200,0 ±42,5

Из таблицы 2 видно, что пьезоэлектрический отклик у терполимера ПОБВ-ПЭГ примерно в 1,5 раза выше, чем у гомополимера и почти в 2 раза, чем у сополимера ПОБВ. Однако, данные образцы имеют существенный разброс в значениях среднеквадратичной шероховатости. Известно, что шероховатость оказывает отрицательное влияние на сегнетоэлектрические свойства, такие как ток утечки, гистерезис, остаточная поляризация и величина коэрцитивной силы, что, в конечном итоге, влияет на пьезоэлектрический отклик [2,6,10,11]. Также стоит отметить, что степень кристалличности, рассчитанная согласно данным ДСК, не коррелирует с полученным значением пьезоэлектрического коэффициента, который обнаружен в случае ПОБВ-ПЭГ, однако, пьезоэлектрический отклик зависит от целого ряда факторов [14].

Таким образом, методом контролируемого биосинтеза с использованием штамма-продуцента *A. chroococcum* 7B был получен терполимер ПОБВ-ПЭГ, содержащий 7,5 моль% 3-оксивалерата и 0,2% полиэтиленгликоля, как было показано методом спектроскопии ¹H ЯМР. Полученные из терполимера пленки были исследованы методом ДСК и установлено, что температура кристаллизации и плавления, а также кристалличность пленок ПОБВ-ПЭГ немного снижена по сравнению с пленками из гомополимера ПОБ. По результатам ПСМ можно сделать вывод, что, несмотря на существенный разброс значений шероховатости (по R_q), амплитуда пьезоэлектрических колебаний образца ПОБВ-ПЭГ и его пьезоотклик выше, чем у образца из гомополимера ПОБ.

Список литературы:

1. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Решетов И.В., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. Применение полиоксикалакатов в медицине и природные функции поли-3-оксибутирата // Acta Naturae. – 2019. – V. 11. – N. 41 – P. 4-16.
2. Andreeva N. Using atomic-force microscopy techniques for an analysis of ferroelectric and magnetic properties of bismuth-doped terbium manganite at low temperatures. – 2013. – V. 2. – P. 137-144.
3. Bonartsev A.P. et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by *Azotobacter chroococcum* 7B: a precursor feeding strategy // Preparative Biochemistry and Biotechnology. – 2017. V. – 47. N. – 2. – P. 173-184.
4. Cao H., Liu T., Chew S.Y. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2009. – V. 61. – N. 12. – P. 1055-1064.
5. Chernozem R.V., Surmeneva M.A., Surmenev R.A. Hybrid biodegradable scaffolds of piezoelectric polyhydroxybutyrate and conductive polyaniline: Piezocharge constants and electric potential study // Mater. Lett. – 2018. – V. 220. – P. 257–260.
6. Choi S.H. et al. Study on electrical properties of flattered MOCVD PZT films by CMP process // Integr. Ferroelectr. – 2005. – V. 75. – N. 1. – P. 215-223.
7. Denning D., Guyonnet J., Rodriguez B.J. Applications of piezoresponse force microscopy in materials research: from inorganic ferroelectrics to biopiezoelectrics and beyond // Int. Mater. Rev. – 2016. – V. 61. – N. 1. – P. 46-70.
8. Fortunato et al. Phase inversion in PVDF films with enhanced piezoresponse through spin-coating and quenching // Polymers (Basel). – 2019. – V. 11. – N. 7. – P. 1096.
9. Genchi G.G. et al. Ultrasound-activated piezoelectric P(VDF-TrFE)/boron nitride nanotube composite films promote differentiation of human SaOS-2 osteoblast-like cells // Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. 2018. Vol. 14, № 7. P. 2421–2432.
10. Gilbert S.R. et al. Preparation of Pb(Zr,Ti)O₃ thin films by metalorganic chemical vapor deposition for low voltage ferroelectric memory // J. Appl. Phys. – 2003. – V. 93. – N. 3. – P. 1713-1717.
11. Lang S.B., Chan H.L.W. Frontiers of ferroelectricity: a special issue of the Journal of materials science. New York: Springer, 2007. 288 p.

12. Malmonge J.A. et al. Piezo and dielectric properties of PHB-PZT composite // *Polym. Compos.* – 2009. – V. 30. – N. 9. – P. 1333–1337.
13. Nagiah N. et al. Development and characterization of coaxially electrospun gelatin coated poly (3-hydroxybutyric acid) thin films as potential scaffolds for skin regeneration // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2013. – V. 33. N. 7. – P. 4444–4452.
14. Pariy I.O. et al. Piezoelectric response in hybrid micropillar arrays of poly(vinylidene fluoride) and reduced graphene oxide // *Polymers (Basel)*. – 2019. – V. 11. – N. 6. – P. 1065.
15. Ramadan K.S., Sameoto D., Evoy S. A review of piezoelectric polymers as functional materials for electromechanical transducers // *Smart Mater. Struct.* – 2014. – V. 23. – N. 3. – P. 33001.
16. Ribeiro C. et al. Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. – 2015. – V. 136. – P. 46–55.
17. Suwantong O. et al. In vitro biocompatibility of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2007. – V. 40. – N. 3. – P. 217–223.