

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 $\Delta H_m^0(\text{ПОБ})$ – теоретическое значение термодинамической энтальпии плавления, которая составляет 146.6 Дж/г у 100% кристаллического ПОБ, 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 ПОБ 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	$T_{\text{кр. пик}}, ^\circ\text{C}$	$T_{\text{пл.}}^0 / T_{\text{пл. пик}}, ^\circ\text{C}$	$X_c, \%$
ПОБ	0,0/0,0	364	87	159/176	65
ПОБВ	5,9/0,0	820	81	155/167	51
ПОБВ-ПЭГ	7,5/0,2	290	75	153/175	60

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

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

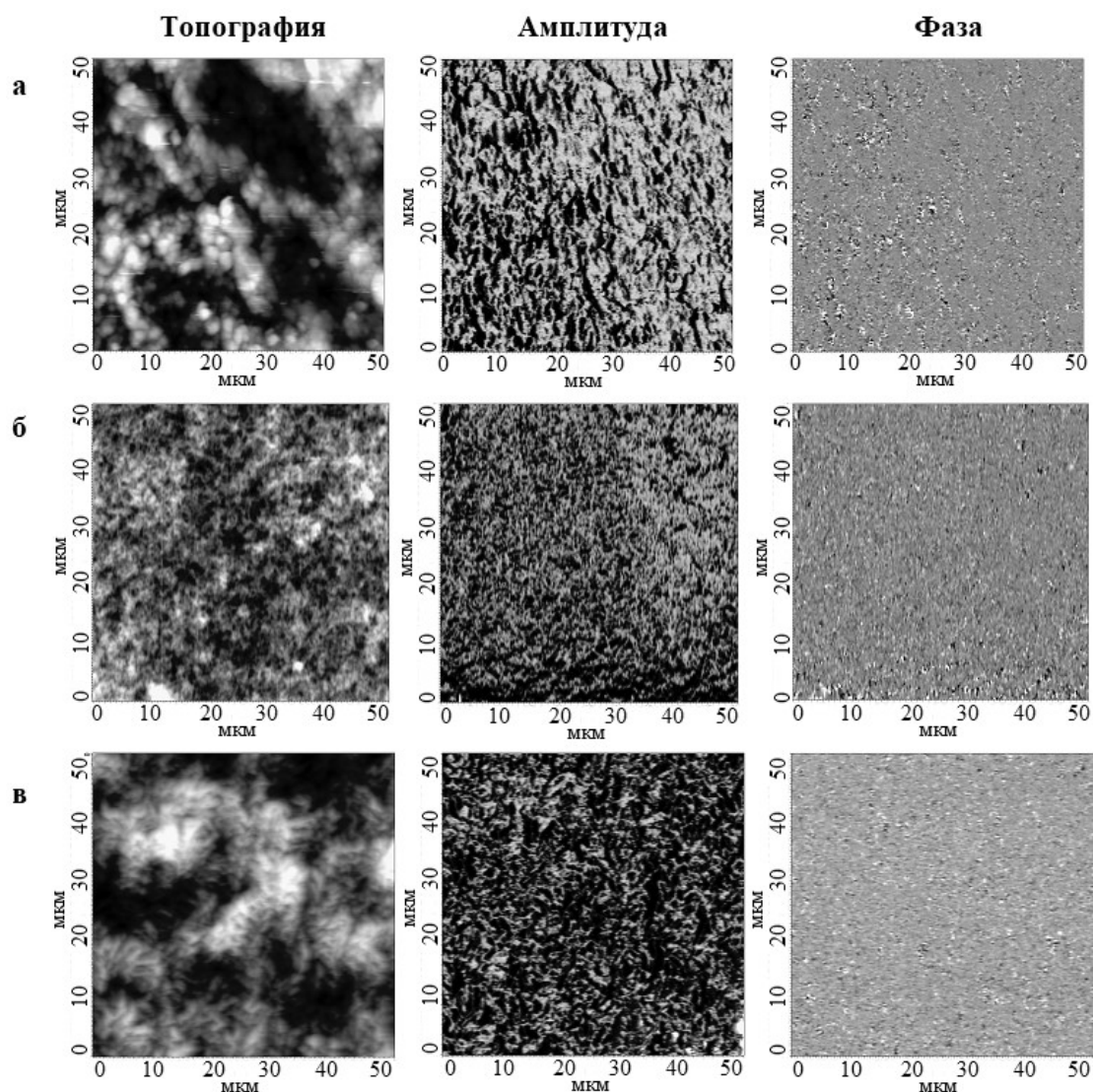


Рисунок 1. ПСМ изображения топографии, амплитуды и фазы образцов: а) ПОБ, б) ПОБВ, в) ПОБВ-ПЭГ

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.