

Результаты выполнения проекта за 2014 год

Целью проекта РНФ «**Фундаментальные основы конструирования сельскохозяйственных препаратов нового поколения**» является фундаментальное обоснование и разработка научных основ конструирования экологически безопасных и адресных форм удобрений и препаратов для защиты культурных растений от вредителей и возбудителей болезней с контролируемым выходом активного начала за счет депонирования в полимерную основу из биоразрушаемых природных полигидроксиалканоатов (ПГА).

План работ 2014 г. включал: анализ литературы для выбора препаратов, предназначенных для разработки долговременных форм, пригодных для депонирования в полимерную основу для грунтового применения; постановку методов определения концентрации препаратов; оптимизацию технологии синтеза полимеров (ПГА), синтез образцов и исследование свойств; получение смесей «полимер/действующие вещества препаратов» в различных фазовых состояниях; исследование и отработку условий конструирования форм препаратов, депонированных в полимерную основу в виде микрочастиц, микрогранул, пленок и объемных конструкций.

Программа исследований выполнена полностью. Получены следующие основные результаты:

На основе выполненного анализа современной литературы и предварительных исследований выбраны препараты, удовлетворяющие сформулированным критериям отбора по эффективности действия и масштабам применения, пригодные для грунтового применения, совместимые с полимерной основой в различных фазовых состояниях, устойчивые в растворах неполярных растворителей и пригодные для спектрофотометрических методов анализа. Это гербициды – Зенкор Ультра и Магнум Супер, фунгицид – Виал Траст ВСК; удобрение - гранулированная аммиачная селитра.

Поставлены высокоточные методы анализа действующих веществ отобранных препаратов. Исходя из того, что действующие вещества имеют различную химическую структуру, привлечены различные методы анализа: газовая (ГХ) и жидкостная хроматографии (ЖХ). С использованием эталонных государственных стандартных образцов (ГСО) построены калибровочные графики для детектирования действующих веществ в широком диапазоне концентраций, от нг/мкл до мкг/мкл. Для определения действующих веществ гербицида Зенкор Ультра (метрибузин) и фунгицида Виал Траст ВСК (тиабендазол и тебуконазол) в связи с тем, что эти соединения летучие и термостабильные, использована газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией. Детектирование метрибузина реализовано в диапазоне от 0,6 нг/мкл до 1,4 мкг/мкл с пределом обнаружения метрибузина 0,1 нг/мкл при ошибке метода до 0,5%. Поставленный ГХ метод пригоден для определения концентраций тиабендазола и тебуконазола от 1,0 нг/мкл до 1,4 мкг/мкл с линейностью во всем диапазоне, пределом обнаружения компонентов при использовании масс-спектрометрического детектора 1 нг/мкл и стандартной ошибке не выше 0,5%. В связи с тем, что трибенурон-метил и метсульфурон-метил (действующие вещества гербицида Магнум Супер) являются малолетучими и термически нестабильными, для их определения поставлен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с чувствительностью 0,1 мкг/мл

при стандартной ошибке метода 1,5% с линейным диапазоном на широкой области концентраций – от 0,1 до 500 мкг/мл. Для определения концентрации восстановленной и нитратной форм азота в аммиачной селитре использованы колориметрические методы с реактивом Несслера и метод Грандваль-Ляжа с дисульфифеноловой кислотой, соответственно.

С использованием современной ферментационной автоматизированной техники и разработанной в Лаборатории ранее технологии синтеза ПГА проведена оптимизация процесса по общему выходу и составу полимеров с учетом влияния на продуктивность биосинтеза исходной концентрации инокулята, его физиологической активности, определяемой величиной внутриклеточного пула полимера, типа основного углеродного субстрата и режима дозирования дополнительных С-субстратов (субстратов-предшественников, необходимых для синтеза сополимерных ПГА). Для повышения продукционных показателей реализована технология синтеза полимеров на глюкозе с привлечением штамма *C. eutrophus* B10646 вместо ранее эксплуатированного штамма *R. eutropha* B5786, синтезирующего ПГА на фруктозе с выходами по биомассе клеток и ПГА до 45-50 г/л и 80% от веса сухой биомассы, соответственно, при затратах фруктозы $2,9 \pm 0,1$ г/г полимера.

Исследованы характеристики культуры *C. eutrophus* B-10646 при варьировании стартовой концентрации клеток в посевном материале и его физиологической активности, определяемой внутриклеточным пулом полимера. Привлечение физиологически активного инокулята позволило существенно (в 2-3 раза) сократить длительность лаг-фазы и повысить продуктивность процесса по биомассе практически вдвое при экономическом коэффициенте культуры по биомассе и полимеру, соответственно, 0,35 и 0,30 г/г. Разработан двустадийный хеостатно-периодический режим культивирования *C. eutrophus* B-10646, обеспечивающий получение физиологически активного инокулята в проточных условиях ферментации, последующее концентрирование инокулята и накопление биомассы и ПГА в периодическом процессе с выходами биомассы и полимеру не менее 100-110 г/л и 80-85% от сухой биомассы. Это сопоставимо с лучшими зарубежными решениями. Процесс реализован на более доступном по сравнению с фруктозой углеводном субстрате (глюкозе).

Для расширения сырьевой базы технологии исследованы метаболизм жирных кислот у штамма-продуцента и выходы полимеров при замене сахаров липидными субстратами (олеиновая кислота или неочищенное подсолнечное масло). Замена сахаров олеиновой кислотой повысила эффективность процесса: экономический коэффициент на олеиновой кислоте значительно выше, чем на сахарах, и составил по биомассе и полимеру, соответственно, 0,88 и 0,83 г/г. На олеиновой кислоте в отличие от сахаров и подсолнечного масла синтезирован многокомпонентный полимер, содержащий, помимо мономеров 3-гидроксипропионата (ЗГП), микровключения 3-гидроксивалериановой (ЗГВ) и 3-гидроксигексановой (ЗГГ) кислот.

Исследована зависимость молекулярной массы полимера по ходу развития культуры и накопления в клетках полимера, и определены условия, при которых возможно снижение величины M_w в 2-3 раза от начальных значений (1 000 кДа и выше), что негативно сказывается на процессинге и качестве получаемых изделий. Поэтому для получения ПГА с высокими выходами без существенной потери молекулярного веса необходимо избегать ситуаций, приводящих к падению величины M_w .

Изменением условий углеродного питания с применением дополнительных углеродных субстратов в качестве С-предшественников, необходимых для синтеза различных мономеров, образующих ПГА, получено семейство полимеров различного химического состава. Впервые синтезированы двухкомпонентные сополимеры П(ЗГБ/ЗГГ) с высоким содержанием мономеров 3-гидроксигексаноата (до 68 мол.%) и трехкомпонентные ПГА, полученные при одновременном и контролируемом внесении в культуру двух дополнительных субстратов: валерата калия + гексаноата калия или пропионата калия + гамма-бутиролактона, в которых суммарное содержание мономеров ЗГВ+4ГБ или ЗГВ+ЗГГ достигло 40-50 мол.%. Изучены свойства синтезированных ПГА и показано, что содержание мономеров ЗГГ и 4ГБ в сополимерах, в большей степени, по сравнению с мономерами 3-гидроксивалерата (ЗГВ) оказывает влияние на степень кристалличности образцов, снижая значение C_x до 20% и ниже.

На основе экспериментально достигнутых показателей технология масштабирована. В условиях опытного производства урожай по биомассе клеток в культуре *S. eutrophus* B10646 и выходы полимера составили 110 ± 10 г/л и 85 ± 5 % при продуктивности процесса по биомассе и ПГА - 1,7 и 1,4 г/л·ч, соответственно, что вдвое превосходит ранее достигнутые показатели в культуре *R. eutropha* B5786 на фруктозе.

Выполненные комплексные исследования, включающие выбор и характеризацию препаратов, поставленные методы их определения, синтезированные в необходимых количествах и исследованные образцы полимеров, позволили получить системы «полимер/действующие вещества препаратов» в различных фазовых состояниях (эмульсии, растворы, порошки), которые исследованы с применением ИК-спектроскопии, X-Ray и ДСК.

Анализ результатов ДСК по количеству и характеру эндотермических пиков показал, что при введении в состав полимеров действующих веществ образуются устойчивые смеси, которые не разделяются при нагревании. На термограммах смеси имеется только один пик плавления и дегградации; не зафиксировано собственных пиков плавления, характерных для всех действующих веществ. Наполнение полимера сопровождается снижением температуры плавления, энтальпии плавления и степени кристалличности. Результаты свидетельствуют об отсутствии химических связей между компонентами пестицидов и полимером и механическом характере смесей.

Полученные и охарактеризованные смесовые системы «полимер/действующие вещества препаратов» использованы для конструирования долговременных форм в виде микрочастиц, микрогранул, пленок и 3D форм.

Для конструирования форм в виде микрочастиц на основе исследованных параметров (химический состав ПГА, тип сурфактанта, плотность и скорость перемешивания эмульсии) определены условия, позволяющие получать частицы хорошего качества различных размеров. Показано, что наиболее значимыми факторами, ответственными за размеры микрочастиц, являются концентрация полимерной эмульсии и скорость ее перемешивания; на морфологию и выход микрочастиц влияют химический состав ПГА и тип сурфактанта. Использование сополимерных ПГА, содержащих в своем составе низкокристаллические мономеры 3-гидроксигексаноата и 4-гидроксибутирата, придающие эластичность изделиям, приводило к формированию частиц неправильной (вытянутой) формы с наличием пустот. Исследованы условия для получения микрочастиц с наибольшими выходами и эффективностью инкапсулирования действующих веществ

препаратов Зенкор Ультра, Магнум Супер, Виал Траст ВСК, включающие скоростные режимы (от 750 до 6 000 об/мин), варьирование плотности полимерной эмульсии и типа сурфактанта. Выявлено, что при высокой скорости перемешивания эмульсии формируются частицы микронных размеров, при низкой – на порядок выше. Размер смесовых частиц зависит от типа и структуры действующего вещества. Средний диаметр частиц, нагруженных действующими веществами препаратов Виал Траст ВСК, Зенкор Ультра, Магнум Супер в зависимости от скорости перемешивания может составлять от единиц до десятков мкм. Эффективность инкапсулирования действующих веществ в большей степени зависит от типа препарата, а не от условий получения частиц и может достигать 77–97% для действующих веществ препаратов Виал Траст ВСК и Магнум Супер и существенно ниже (30-33%) для метрибузина – действующего вещества препарата Зенкор Ультра. В итоге, определены тип ПГА и концентрация полимера в эмульсии, скорости перемешивания, тип и концентрация сурфактанта для получения микрочастиц хорошего качества с высокими выходами при различной эффективности инкапсулирования действующих веществ.

Для определения условий, позволяющих получать формы препаратов в виде пленок, изучено варьирование химического состава полимеров, концентрации растворов полимеров и температуры окружающей среды на характеристики получаемых пленок. Химический состав ПГА практически не оказывал влияния на качество получаемых пленок, за исключением величины контактного краевого угла смачивания водой поверхности, который варьировал от 70-80 до 90-100 град. Более плотные растворы полимеров в хлороформе в силу повышенной вязкости не обеспечили полного растворения исследуемых препаратов и равномерного распределения по всему объему растворителя. При использовании низкоплотных растворов полимеров в хлороформе, получено полное растворение всех исследованных препаратов и равномерное распределение в объеме полимера. Пленки, нагруженные действующими веществами гербицидов Магнум Супер и Зенкор Ультра, были плотными, имели гладкую структуру с небольшим количеством мелких пор; пленки с компонентами фунгицида Виал Траст ВСК имели более пористую поверхность. Температура раствора влияет на морфологию пленок; при повышении температуры полимерного раствора и поверхности принимающей формы качество пленок возрастает. Получены гибкие и равномерные по толщине пленки, нагруженные действующими веществами препаратов на 10 и 25 % от массы полимерной основы.

При отработке условий получения форм в виде микрогранул обнаружено аналогичное влияние на характеристики гранул химического состава ПГА, – растворы из менее кристаллических и резиноподобных полимеров, содержащих мономеры 3ГГ и 4ГБ, не обеспечивали получение гранул правильной формы. Варьируя плотность растворов, диаметр шлангов, размер иглы и высоту слоя осадителя, определены параметры, позволяющие получать микрогранулы хорошего качества. Полученные гранулы, нагруженные разными типами действующих веществ, различались по размеру, который варьировал от 2,5-3 до 5 мм; эффективность инкапсулирования действующих веществ составила свыше 90%.

Методом контактного холодного прессования из порошков смесей «полимер/действующие вещества препаратов» с применением двух типов прессов получены 3D формы диаметром от 3 до 12 мм. Показано влияние усилия при прессовании

на плотность и структуру получаемых форм, и определены оптимальные значения для получения 3D форм, равномерных по структуре поверхности и включению препаратов. В зависимости от типа действующих веществ и усилия прессования поверхность форм может быть более или менее гладкой, бездефектной или с небольшим количеством пор и мелких трещин. Выполненный спектральный анализ по элементному составу подтвердил включение препаратов в полимерную основу без изменения структуры.

В ходе разработки долговременных форм азотного удобрения (аммиачная селитра) получены формы в виде: исходных гранул с полимерной оболочкой, прессованных таблетированных 3D форм из порошков «полимер/аммиачная селитра» и таблетированных форм с полимерным покрытием. Для формирования равномерных и прочных полимерных покрытий определены оптимальная концентрация полимера в растворе, количество погружений формы в раствор, тип осадителя, используемого для формирования и закрепления полимерного покрытия на поверхности формы.

Заключение. По результатам выполненной программы работ отчетного периода подобраны препараты для защиты культурных растений от сорняков и возбудителей болезней, поставлены высокочувствительные методы детектирования их концентраций; синтезированы и охарактеризованы партии полимеров, получены двухкомпонентные системы «полимер/действующие вещества препаратов» в виде растворов, эмульсий и порошков, из которых сконструированы долговременные формы препаратов, включенные в полимерную основу в виде микрочастиц, микрогранул, пленок и 3D форм, в том числе с полимерным покрытием.