

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова
« _____ » _____ 20 ____ г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Получение полигидроксиалканоатов и их использование в создании
композитных материалов

Руководитель _____
подпись, дата

доцент, к. т. н.
должность, учёная степень

С.В. Барановский
инициалы, фамилия

Выпускник _____
подпись, дата

В.А. Афанасьев
инициалы, фамилия

Красноярск 2019

РЕФЕРАТ

Дипломная работа на тему: «Получение полигидроксиалканоатов и их использование в создании композитных материалов» содержит 54 страницы и включает в себя 41 литературный источник, 3 таблицы, 12 формул, 11 рисунков.

БИОСИНТЕЗ, ПГА, *CUPRIAVIDUS EUTROPHUS*, БИОПОЛИМЕР, БИОДЕГРАДАЦИЯ

Цель работы - определить возможности использования ПЗГБ в качестве полимерной основы для создания композитных материалов.

Актуальность данной работы заключается в исследовании свойств композитных материалов на основе одного из наиболее перспективных для производства биоразрушаемых пластиков, синтезируемого штаммом бактерии *Cupriavidus eutrophus* B10646. Одним из таких свойств является биодеструкция в почвенной среде под влиянием биологических процессов, происходящих в почве при участии микроорганизмов. Подбор оптимального соотношения биополимера и наполнителя, а также давления при изготовлении композитов позволяет получить образцы с необходимым сроком биодеградациии.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
СОДЕРЖАНИЕ	3
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Характеристика ПГА	7
1.2 Синтез ПГА.....	9
2 Материалы и методы	12
2.1 Культивирование бактерий <i>Cupriavidus eutrophus</i> B10646.....	12
2.1.1 Приготовление и стерилизация питательных растворов	12
2.1.2 Приготовление инокулята	14
2.2 Анализ проб	15
2.2.1 Измерение концентрации клеток в ходе культивирования ...	15
2.2.2 Определение сухой биомассы клеток	15
2.2.3 Определение концентрации глюкозы	16
2.2.4 Измерение азота	16
2.3 Экстракция полимера	17
2.4 Изготовление композитов	17
2.4.1 Наполнители	17
2.4.2 Подготовка смесей и прессование	18
2.4 Анализ полученных образцов.....	20
2.4.1 Дифференциальная сканирующая калориметрия.....	20
2.4.2 Рентгеноструктурный анализ	20
2.5 Методы обработки данных	21

3 Результаты	25
3.1 Культивирование микроорганизмов	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Физико-химические свойства композитов	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Динамика разрушения композитных форм в почве	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Регрессионный анализ	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ.....	25
ПРИЛОЖЕНИЕ А	26
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	33

ВВЕДЕНИЕ

Объёмы производства и использования неразрушаемых в природной среде синтетических полимеров достигли 200 миллионов тонн в год, что становится глобальной экологической проблемой. Биоразлагаемые полиэфиры гидроксикарбоновых кислот (полигидроксикарбоанаты, ПГА), синтезируемые микроорганизмами, вместе с полилактидами могут стать отличной заменой синтетическим пластмассам. В настоящее время во многих странах функционируют оптимизированные производства ПГА, производящие полимер под марками Biopol™, Nodax™, DegraPol/btc®, Mirel® [1, 2]. Из-за снижения стоимости применения полигидроксикарбоанатов всё чаще ориентируют на изготовление разрушаемой тары и упаковки, одноразовой посуды и бытовых изделий, а также на использование в медицине и сельском хозяйстве. В связи с увеличением объёмов производства и области применения ПГА актуальность приобретает исследование закономерностей процесса их деградации в различных природных условиях. Важнейшим природным резервуаром для разрушения полигидроксикарбоанатов служит почва. Однако большинство работ, направленных на изучение почвенной деструкции ПГА, проведено в лабораторных условиях [1–8], в то время как полевые исследования не столь разнообразны. В одном из первых исследований биодеструкции ПГА в природных условиях [11] отмечалось практически полное разрушение колышка для гольфа, изготовленного из биополимера, в почве за четыре недели; однако в этой работе не были показаны ни точный состав ПГА, ни почвенные характеристики. Известно, что тип почвы влияет на процесс биодеструкции ПГА. Таким образом, в мангровой и лесной почвах, скорость деградации биополимеров различается в несколько раз [12–14]. Показано влияние численности почвенных микроорганизмов на течение процесса деградации поли-3- гидроксипропириата в садовой почве [15]. Однако работ,

раскрывающих закономерности разрушения ПГА в почвах разных типов, различающихся микробной составляющей, крайне мало.

Цель работы: исследовать возможности использования ПЗГБ в качестве полимерной основы для создания композитных материалов.

Для достижения цели, поставлены следующие задачи:

1. Получить поли-3-гидроксибутират в культуре бактерий *Cupriavidus Eutrophus*, исследовать накопление биомассы и полимера в процессе биосинтеза.

2. Получить композитные материалы в виде смесей и 3D форм, исследовать физико-химические и физико-механические характеристики полученных композитов.

3. С использованием регрессионного анализа составить математическую модель влияния давления прессования, вида и количества наполнителя на деградацию образцов в почве.

1 Обзор литературы

1.1 Характеристика ПГА

Полигидроксиалканоаты– представляют собой класс природных полиэфиров(рисунок 1), синтезируемых большинством как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий в стрессовых условиях в качестве эндогенного депо энергии и углерода. В клетках бактерий биополимеры накапливаются в виде внутриклеточных гранул (рисунок 2) [16]. Наибольшее внимание из всего класса биополимеров привлекает поли-3-гидроксибутират(ПЗГБ), впервые обнаруженный в бактериальных клетках Морисом Лемуаном в 1925 году[17].

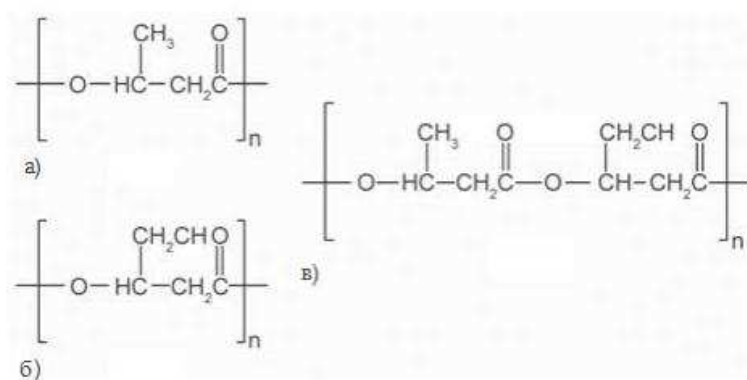


Рисунок 1 - Структурные формулы некоторых полигидроксиалканоатов, а) ПЗГБ, б)ПГВ, в)ПГБВ [17]

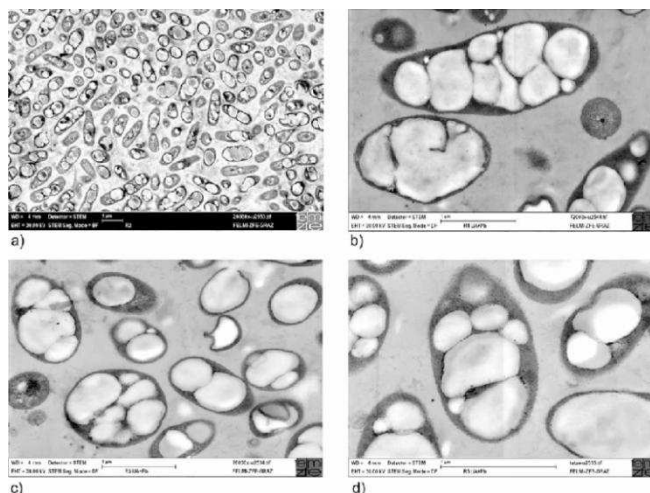


Рисунок 2- Электронная фотография ПЗГБ-богатых клеток *Cupriavidus necator*[18]

На рисунке 2 приведена микрофотография бактерий *Cupriavidus necator*. Биополимерные гранулы представлены белыми областями, заключенными в цитоплазме клеток. В оптимизированных условиях поли-3-гидроксибутират может составлять до 80% от сухого веса клеток. Вновь синтезированный полимер присутствует в клетках в очень высоких молекулярных массах, что свидетельствует о небольшом влиянии полимера на осмотическое давление клетки и отсутствии вмешательства в клеточный обмен веществ. При истощении источников питания клетка начинает использовать депонированный полимер для получения энергии, в результате чего продлевает собственную жизнеспособность до тех пор, пока не возобновится нормальное питание [17].

Разделение ПГА на группы производится в зависимости от строения мономеров, входящих в состав ПГА [19]:

1) Короткоцепочечные полигидроксиалканоаты – те, в которых мономеры состоят из 3-5 атомов углерода. Наиболее известные представителями этого класса – поли-3-гидроксибутират и его сополимеры с гидроксивалератом. Полигидроксибутират является гомополимером D(-)-3- β -оксимасляной кислоты и представляет собой полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами ($C_4H_6O_2$) [20]. Среди всех полигидроксиалканоатов, ПЗГБ является наиболее часто встречающимся биополимером в природе. Это самый простой полигидроксиалканоат по отношению к химической структуре, имеющий метиленовую группу (-CH₂). Мономеры, такие как 3-гидроксивалерат и 4-оксибутират, включают в ПГБ цепи с использованием специфических добавок в среде для роста бактерий [21,22].

2) Со средней длиной цепи ПГА – мономеры которых имеют 6-14 атомов углерода. Для синтеза такой цепи в качестве продуцента специально используются псевдомонады, а в качестве субстрата – алифатические углеводороды, например: n-алканы, n-алканоаты, или n-алканолаы [23].

3) Длинноцепочечные – с содержанием в мономерах 17-18 атомов углерода [24].

Полигидроксиалканоаты характеризуются комплексом физико-химических и механических свойств, связанных с высокой молекулярной массой полимеров, цепным строением и гибкостью макромолекул, главные из которых это:

- способность образовывать высокопрочные высокоориентированные волокна и плёнки;

- способность к большим длительно развивающимся деформациям;

- способность к набуханию и растворению (хлороформ и другие хлорированные углеводороды) [25];

- термопластичен;

- биосовместим;

- биоразрушаем;

- нетоксичен [26].

1.2 Синтез ПГА

Для производства полигидроксиалканоатов используются простые, возобновляемые ресурсы, такие как сахароза, крахмал, целлюлоза и глицерин. Производство синтетических пластмасс, в свою очередь, приводит к потреблению невозобновляемых ископаемых ресурсов, таких как нефть. В качестве определяющих критериев для выбора потенциальных продуцентов ПГА принято рассматривать такие показатели как химический состав, выход полимера, затраты углеродного субстрата, концентрацию клеточной биомассы в культуре, продуктивность процесса. Продуцентами полигидроксиалканоатов являются многие бактерии, имеющие различные свойства. *Cupriavidus necator* является наиболее известной и широко используемой бактерией для синтеза ПГА. В 1980-х годах мутированная форма бактерии *C. necator* была использована Imperial Chemical

Industries(UK) для промышленного синтеза поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерата[Р (ЗНВ-соЗНВ)], проданного под торговой маркой Biopol™[27]. Также используются генетически сконструированные бактерии – рекомбинантные штаммы бактерии *Escherichia coli*, продуцирующей полигидроксиалканоаты с различными мономерами в составе [28].

ПГА синтезируются в результате сложного биосинтетического процесса, каждая стадия которого катализируется специфическими ферментами. Изучение закономерностей организации внутриклеточного цикла полигидроксиалканоатов даёт возможности управления этим процессом и основу для синтеза полимеров с новыми свойствами. Накопление ПГА является естественным способом хранения энергетических запасов, в то время когда запасы питательных веществ несбалансированны. Биополимеры накапливаются в тот момент, когда рост бактерий ограничен истощением азота, фосфора либо кислорода. При полимеризации растворимых промежуточных соединений в нерастворимые бактериальная клетка не претерпевает изменений в своём осмотическом состоянии, что способствует предотвращению утечки данных соединений через клеточную стенку бактерии [29].

Внутриклеточный метаболизм полигидроксиалканоатов носит циклический характер – в клетке постоянно происходят процессы синтеза и деструкции биополимера[30].

Биосинтез ПГА происходит при участии трёх ферментов:

- β-кетотиолаза, кодируемая геном *phbA*;
- ацетоацетил-КоА-редуктаза, кодируемая геном *phbB*, служит ключевым ферментом биосинтеза и определяет тип ПГА;
- ПГА-синтаза, кодируемая геном *phbC* – может находиться в растворимой форме либо связываться с гранулами полимера; при лимитировании по углероду осуществляется синтез преимущественно растворённой формы фермента, однако при переносе культуры в условия, при которых начинается лимитирование по азоту начинается резкое падение

активности ПГА-синтазы, и наблюдается нахождение преимущественно уже гранулозаисимой формы[31].

2 Материалы и методы

2.1 Культивирование бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646

Процесс биосинтеза полигидроксиалканоатов подразделяется на следующие этапы:

- приготовление технологических сред;
- стадия приготовления растворов;
- стерилизация полученных растворов;
- подготовка питательных сред;
- получение инокулята в колбах из музейной культуры;
- получение инокулята в ферментёре-инокуляторе (масштабирование);
- двустадийная ферментация в производственном ферментёре;
- концентрирование бактериальной культуры;
- центрифугирование сгущенной культуры(получение пасты биомассы);
- лиофильная сушка биомассы;
- экстракция полимера[38].

2.1.1 Приготовление и стерилизация питательных растворов

При средоподготовке реализуются следующие этапы технологического цикла:

- стадия приготовления маточных растворов;
- стадия стерилизации.

Необходима предварительная стерилизация всей посуды (колбы, пробирки) в автоклаве насыщенным водяным паром при давлении в 1 атм. Для приготовления маточных растворов используют навески сухих солей и растворяют при комнатной температуре дистиллированной водой. В качестве минеральной среды используется смесь из четырёх маточных растворов:

А, Б, В и Г. Растворы готовятся из расчёта на производственную программу.

Таблица 1– Состав питательных сред[39]

Раствор	Компонент	Концентрация, г/л
А	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	9.0
	KH_2PO_4	1.5
Б	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
В	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \times \text{H}_2\text{O}$	5.0
Г	H_3BO_3	0.228
	$\text{COCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0.03
	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.08
	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.08
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.176
	$\text{NaMoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0.05
	NiCl_2	0.08
Карбамид	$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	60
Глюкоза	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	500

Раствор А – необходимое количество фосфата калия и фосфата натрия растворяют при перемешивании в дистиллированной воде.

Раствор Б – навеску сульфата магния растворяют в дистиллированной воде.

Раствор В - навеску лимоннокислого железа вносят в колбу и доводят до метки дистиллированной водой, затем кипятят до полного растворения и раствор вновь доводят водой до метки.

Раствор Г – в колбу вносят поочередно навески солей, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают до полного растворения.

Растворы А, Б, В и Г стерилизуются при 121°C, давлении 1 атм в течение 45 минут.

Раствор глюкозы готовят с концентрацией 500 г/л. Готовый раствор насосом перекачивают в ёмкость через стерилизующий фильтр.

Раствор карбамида готовят с концентрацией 60 г/л. Готовый раствор насосом перекачивают в ёмкость через стерилизующий фильтр.

Для получения воды для приготовления питательных сред и подготовки инокулята используют электрический аквадистиллятор производительностью 25 л/ч.

В качестве пеногасителя в процессе культивирования используется подсолнечное масло. Для приготовления стерильного пеногасителя подсолнечное масло заливается в мерную колбу на 100 мл, закрывается ватно-марлевой пробкой, оборачивается бумагой и подвязывается верёвкой. Стерилизуется масло в автоклаве при 1 атм, 121 °С, 30 мин. [39].

2.1.2 Приготовление инокулята

Бактерии выращивают в условиях, разработанных для синтеза ПГА [Волова с соавт.,1992]. Инокулят получают в стерильных условиях в периодическом режиме с использованием шейкера-инкубатора «IncubatorShakerInnova®» серии 44 («NewBrunswickScientific», США,) в стеклянных колбах объемом 2,0 л с коэффициентом заполнения 0,5 при 30 °С и 200 об/мин. Посевной материал получают ресуспендированием музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде. Музейную культуру выращивают в жидкой солевой среде Шлегеля со стартовой концентрацией глюкозы 10 г/л. Для культивирования бактерий за основу принята солевая среда Шлегеля: $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ – 9.1; KH_2PO_4 – 1.5; $\text{MgSO}_4\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$ – 0.025 (г/л) и сбалансированная кислотнo-солевая среда (Волова, 2004). Источником железа служит раствор лимоннокислого железа (5 г/л), который вводят из расчета 5 мл/л. Микроэлементы вводятся по прописи Хоагганда (таблица 1, раствор Г) из расчёта 3 мл стандартного раствора на 1 литр среды. В качестве источника азота используется хлористый аммоний или мочеви́на. Культивирование бактерий проводится на опытном производстве Сибирского Федерального Университета, с использованием ферментёра фирмы Bioengineering NLF 22 с объёмом аппарата 30 л (рисунок 3) и рабочем объёме от 5 до 20 л при температуре 30 °С.



Рисунок 3 - Ферментёр Bioengineering NLF 22 (Швейцария)

2.2 Анализ проб

2.2.1 Измерение концентрации клеток в ходе культивирования

Изменение биомассы клеток в процессе роста культуры регистрируется оптическими показателями культуры. Для измерения оптической плотности каждый час проводится отбор пробы культуры и её дальнейший анализ на фотоколориметре, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и $\lambda=440$ нм (кювета 1 мм).

2.2.2 Определение сухой биомассы клеток

Концентрация клеток X , г/л, регистрируется весовым способом. Проводится отбор аликвот бактериальной культуры, объёмом 25-35 мл, центрифугируется на протяжении 10 мин при 6000 об/мин; клетки дважды отмываются от солей дистиллированной водой и снова центрифугируются. Отмытые клетки переносятся в бюксы с доведенным постоянным весом. Пробы высушиваются при температуре 105°C в течение одних суток, затем охлаждаются в эксикаторе и взвешиваются. Биомасса бактерий в культуре

определяется разницей между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

2.2.3 Определение концентрации глюкозы

Концентрация глюкозы измеряется при помощи набора «Глюкоза – ФКД». В комплект набора входят таблетка с ферментно–хромогенной смесью(ФХС) и калибратор (раствор глюкозы с известной концентрацией).

Одна таблетка ФХС растворяется в 100 мл дистиллированной воды при тщательном перемешивании. Два миллилитра культуры центрифугируют в течение двух минут при 6000 оборотах. В три пробирки наливают по 2 мл ФХС. В первую пробирку добавляют 0,02 мл фугата, во вторую пробирку – 0,02 мл калибратора, а в третью (холостая проба) - 0,02 мл дистиллированной воды. Пробы тщательно перемешивают и инкубируют в течение 20 мин. при 37°С. После окончания инкубации измеряется величину оптической плотности рабочей и калибровочной проб относительно холостой пробы в кюветах с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 490 нм. Расчёт концентрации глюкозы в пробах рассчитывали по формуле:

$$C=(E_{оп}/E_{к})\cdot 9,8$$

где:

C – концентрация глюкозы, г/л;

E_{оп} – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт.плотн.;

E_к – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт.плотн.;

9,8 – концентрация глюкозы в калибраторе, г/л.

2.2.4 Измерение азота

Для измерения концентрации азота к одному миллилитру фугата добавляют 10 мл дистиллированной воды, 1-2 капли 33% КОН и 0,5 мл реактива Неслера. Результат наблюдают по цветовой реакции.

2.3 Экстракция полимера

По окончании периода ферментации культуральная жидкость центрифугируется при 6000rpm. Осаждённая биомасса заливается этанолом в соотношении 1:5 и помещается под оборотный холодильник с магнитными мешалками. Время экстракции спиртом – 60 минут, при температуре 70С.

Остывшая суспензия отфильтровывается с помощью воронки Бюхнера со вставленным в неё бумажным фильтром в колбу Бунзена с использованием вакуумного насоса. Затем биомасса помещается обратно в колбу и повторно заливается спиртом. Экстракция этанолом ещё дважды повторяется.

После экстракции этанолом отфильтрованная биомасса на ночь заливается метиленом хлористым (дихлорметан) в соотношении 1:10. Затем колба с дихлорметаном помещается на магнитную мешалку (температура 50°С) с подключенным к колбе оборотным холодильником. Необходимо дать колбе нагреться и остыть. Затем опять проводится фильтрование. Отфильтрованный экстракт осаждается гексаном либо этанолом в соотношении 1:2. После осаждения производится фильтрация ПГА от смеси дихлорметан-этанол и высушивается.

2.4 Изготовление композитов

2.4.1 Наполнители

В качестве наполнителей (филлеров) используются три природных материала:

- торф марки "Агробалт-Н (ЗАО Росторфинвест, Россия);

- древесные опилки, полученные измельчением древесины березы на деревообрабатывающем станке МД 250-85 (компания «СтанкоПремьер», Россия);

- глина(месторождение «Кузнецовское», Красноярский край, Россия)

Размол наполнителей проводится ударно-сдвиговым воздействием на ультрацентрибежной мельнице ZM 200 («Retsch», Германия); использовали сито с диаметром отверстий 2 мм; скорость вращения ротора 6000 об/мин. Фракционный состав порошков наполнителей определяется с помощью аналитической просеивающей машины AS 200 control (Retsch, Германия). Время фракционирования составляет 10 мин, амплитуда 1,5 мм, навеска 100 г.

2.4.2 Подготовка смесей и прессование

Для получения смесей предварительно полимер измельчается ударно-сдвиговым воздействием на ультрацентрибежной мельнице ZM 200 («Retsch», Германия). Во избежание плавления полимера во время помола измельчаемый материал, а также корпус с размольными элементами мельницы предварительно охлаждается при $- 80^{\circ}\text{C}$ около 15 мин в морозильной камере InnovaU101 (NEWBRUNSWICKSCIENTIFIC, США). Размол проводится с использованием сита с диаметром отверстий 2 мм, скорость вращения ротора – 18000 об/мин.

Фракционный состав порошка полимера определяется с помощью аналитической просеивающей машины AS 200 control (Retsch, Германия). Время фракционирования – 10 мин, амплитуда 1,5 мм, навеска 100 г.

Далее к навескам измельченного полимера с размером частиц 200 мкм добавляются навески различных наполнителей с таким же размером частиц, два порошка смешиваются в настольном планетарном миксере

SpeedMixer DAC 250 SP (HauschildEng., Германия), время смешения 1 мин, скорость 1000 об/мин.

Массовая доля наполнителей в смесях варьируется и составляет 10, 30 и 50(%). Затем проводится навеска гомогенизированных порошков использовали для получения смесовых форм в виде прессованных таблеток

2.4 Анализ полученных образцов

2.4.1 Дифференциальная сканирующая калориметрия

Термический анализ исходных материалов и смесей выполняется при использовании дифференциального сканирующего калориметра DSC-1 (METTLER TOLEDO, Швейцария). Порошкообразные образцы ($4,0 \pm 0,2$ мг каждый) помещаются в алюминиевый тигель перед измерением. Каждый образец измеряется не менее 3 раз. Образцы нагреваются со скоростью $5^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 200°C , затем охлаждаются до -20°C , выдерживаются в течение 3 минут при данной температуре и вновь нагреваются до 320°C . Температура стеклования ($T_{\text{ст}}$), кристаллизации ($T_{\text{кр}}$), плавления ($T_{\text{плав}}$) и термического разложения ($T_{\text{дегр}}$) определяется по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE».

2.4.2 Рентгеноструктурный анализ

Рентгеноструктурный анализ и определение кристалличности исходных материалов и смесей проводится с использованием порошкового рентгеновского дифрактометра D8 ADVANCE, оснащённого быстрым линейным детектором VANTEC. Чтобы определить кристалличность ПЗГБ, из 2% раствора полимера в хлороформе приготавливаются 3 образца плёнок диаметром 2 см и толщиной 0,15 мм. Образцы имеют круглую форму, потому что во время измерения образец вращается в направлении, перпендикулярном поверхности. Шаг сканирования составляет $0,016^\circ$, время измерения на каждом шаге 114 с, а диапазон сканирования составляет от 2° до 60° (от 48° до 60° наблюдается только равномерно уменьшающийся фон); зарегистрированным параметром является интенсивность рентгеновских лучей, рассеянных образцом: $55^\circ / 0,016^\circ = 3438$ раз. Степень кристалличности рассчитывается как отношение общей площади кристаллических пиков к общей площади рентгенограммы (кристаллический + аморфный компоненты).

2.5 Методы обработки данных

Статистическая обработка результатов проводилась по стандартным методикам с использованием программного пакета анализа данных Microsoft Excel.

Для изучения механизмов биологических процессов и их оптимизации применяется планирование эксперимента. Методом планирования является выбор необходимых для эксперимента опытов, методов математической обработки их результатов. Все показатели, оказывающие влияние на изучаемый объект обозначаются буквой X и называются факторами. Каждый фактор может принимать от одного до нескольких значений в опыте; такие значения называются уровнями. При планировании эксперимента все полученные данные должны быть воспроизводимыми, а объект управляем.

Расчёт параметров множественной линейной регрессии описано по следующей методике:

Уравнение множественной регрессии может быть представлено в виде:

$$Y = f(\beta, X) + \varepsilon, \quad (1)$$

где $X = X(X_1, X_2, \dots, X_m)$ - вектор независимых переменных; β - вектор параметров (подлежащих определению); ε - случайная ошибка (отклонение); Y - зависимая (объясняемая) переменная.

Теоретическое линейное уравнение множественной регрессии может быть представлено в виде:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_m X_m + \varepsilon, \quad (2)$$

β_0 - свободный член, определяющий значение Y , в случае, когда все объясняющие переменные X_j равны 0.

К матрице (таблица 2) с переменными X_j добавляется единичный столбец:

Таблица 2 - Матрица с добавленным единичным столбцом

X ₀	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	0	0	0	0
1	1	0	1	1
1	2	0	2	2
1	0	1	1	2
1	1	1	2	0
1	2	1	0	1
1	0	2	2	1
1	1	2	0	2
1	2	2	1	0

Далее рассчитываются коэффициенты для принятой модели:

$$\beta_i = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n x_i y_i. \quad (3)$$

Тесноту совместного влияния факторов (R) на результат оценивает индекс множественной корреляции. В отличие от парного коэффициента корреляции, который может принимать отрицательные значения, он принимает значения от 0 до 1. Поэтому R не может использоваться для интерпретации направления связи. Чем плотнее фактические значения y_i располагаются относительно линии регрессии, тем меньше остаточная дисперсия и, следовательно, больше величина $R_{y(x_1, \dots, x_m)}$. Таким образом, при значениях R, близким к 1, уравнение регрессии лучше описывает полученные данные и влияние факторов на результат сильное. При значениях R, близким к 0, уравнение регрессии плохо описывает полученные данные и влияние факторов, оказываемое на результат слабое.

$$R = \sqrt{1 - \frac{S_i^2}{\sum (y_i - y_{cp})^2}}; \quad (4)$$

Коэффициент множественной корреляции определяется через матрицу парных коэффициентов корреляции:

$$R = \sqrt{1 - \frac{\Delta_r}{\Delta_{r11}}}; \quad (5)$$

где Δ_r - определитель матрицы парных коэффициентов корреляции;
 Δ_{r11} - определитель матрицы межфакторной корреляции.

Квадрат (множественного) коэффициента корреляции называется коэффициентом детерминации, который показывает долю вариации результативного признака, объясненную вариацией факторного признака.

Проверяется однородность дисперсии по критерию Кохрена ($G_p < G_{табл}$):

$$G_p = \frac{S_{i\max}^2}{\sum_{i=1}^N S_i^2}; \quad (6)$$

Определяется ошибка опытов:

$$S_y^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N S_i^2; \quad (7)$$

Проводится расчёт дисперсии коэффициентов регрессии:

$$S_{ki}^2 = \frac{S_y^2}{N}; \quad (8)$$

Проверяется значимость коэффициентов регрессии: Рассчитывается коэффициент Стьюдента

$$t_{ip} = \frac{\beta_i}{S_{ki}^2}; \quad (9)$$

где β_i – коэффициент регрессии: Определяется табличный коэффициент Стьюдента t_{st} и проверить условие $t_{ip} < t_{st}$.

Проводится расчёт адекватности дисперсий:

$$S_{ad}^2 = \frac{m}{N-m} \sum_{i=1}^N (y_{cp} - y^*)^2; \quad (10)$$

где y_{cp} – среднее значение из всех повторностей в каждой строке; y^* – значение, рассчитанное по уравнению регрессии.

Проводится расчет адекватности модели: рассчитывается критерий Фишера

$$F_p = S_{ad}^2 / S_y^2 ; \quad (11)$$

определяется табличный критерий $F_{таб}$ и осуществить их сравнение.

3 Результаты

Изъято 17 страниц.

ВЫВОДЫ

1. В процессе культивирования получены образцы ПЗГБ, исследован процесс накопления биомассы и полимера в клетках.

2. С использованием ПЗГБ в качестве полимерной основы и различного количества наполнителей (опилки, глина, торф) получены смеси и 3D формы композитных материалов. Применение ИК-спектроскопии, ДСК, рентгеноспектрального анализа, определение физико-механических характеристик и исследование влагоёмкости показало отсутствие химических связей между полимером и наполнителями всех типов и говорит о физическом характере смесей, показывает снижение температурных и прочностных характеристик, степени кристалличности и гидрофобности полученных композитных материалов.

3. Получена математическая модель процесса деградации в почве образцов композитных материалов. Уравнение

$$Y = 93,0897 - 6,83135 * X_1 - 3,90089 * X_2 + 2,58572 * X_3 + 1,45981 * X_4 \quad (12)$$

позволяет оценить влияние каждого фактора на снижение массы образцов, а также показывает возможное управление процессом биodeградации.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Время экспозиции	Соотношение ПЗГБ/наполнитель	Вид наполнителя	Давление	Масса образца
0	0	0	0	90,6
0	1	0	0	97,765
0	2	0	0	81,975
0	3	0	0	71,38
0	0	1	0	90,6
0	1	1	0	98,91
0	2	1	0	88,075
0	3	1	0	88,69
0	0	2	0	90,6
0	1	2	0	89,88
0	2	2	0	83,525
0	3	2	0	89,565
0	0	0	1	89,595
0	1	0	1	86,645
0	2	0	1	82,495
0	3	0	1	70,83
0	0	1	1	89,595
0	1	1	1	96,855
0	2	1	1	86,915
0	3	1	1	70,085
0	0	2	1	89,595
0	1	2	1	86,83
0	2	2	1	85,275
0	3	2	1	79,925
0	0	0	2	91,365
0	1	0	2	84,745
0	2	0	2	78,29
0	3	0	2	91,435
0	0	1	2	91,365
0	1	1	2	86,735
0	2	1	2	86,75

0	3	1	2	86,33
0	0	2	2	91,365
0	1	2	2	89,25
0	2	2	2	84,89
0	3	2	2	82,76
0	0	0	3	93,58
0	1	0	3	85,95
0	2	0	3	75,845
0	3	0	3	75,58
0	0	1	3	93,58
0	1	1	3	87,845
0	2	1	3	91,54
0	3	1	3	77,83
0	0	2	3	93,58
0	1	2	3	95,365
0	2	2	3	90,06
0	3	2	3	80,46
1	0	0	0	95,61
1	1	0	0	70,95
1	2	0	0	82,675
1	3	0	0	91,965
1	0	1	0	95,61
1	1	1	0	97,395
1	2	1	0	95
1	3	1	0	96,395
1	0	2	0	95,61
1	1	2	0	90,36
1	2	2	0	90,89
1	3	2	0	89,51
1	0	0	1	93,555
1	1	0	1	87,36
1	2	0	1	83,6
1	3	0	1	91,045
1	0	1	1	93,555
1	1	1	1	94,16
1	2	1	1	84,6

1	3	1	1	84,825
1	0	2	1	93,555
1	1	2	1	89,845
1	2	2	1	89,42
1	3	2	1	88,22
1	0	0	2	95,365
1	1	0	2	75,64
1	2	0	2	87,71
1	3	0	2	90,135
1	0	1	2	95,365
1	1	1	2	95,1
1	2	1	2	85,045
1	3	1	2	91,005
1	0	2	2	95,365
1	1	2	2	96,52
1	2	2	2	92,55
1	3	2	2	91,24
1	0	0	3	95,15
1	1	0	3	84,145
1	2	0	3	81,09
1	3	0	3	91,9
1	0	1	3	95,15
1	1	1	3	92,32
1	2	1	3	95,8
1	3	1	3	84,695
1	0	2	3	95,15
1	1	2	3	94,24
1	2	2	3	92,55
1	3	2	3	90,2
2	0	0	0	82,615
2	1	0	0	62,14
2	2	0	0	65,57
2	3	0	0	84,115
2	0	1	0	82,615
2	1	1	0	91,11
2	2	1	0	72,92

2	3	1	0	82,015
2	0	2	0	82,615
2	1	2	0	88,04
2	2	2	0	82,03
2	3	2	0	54,985
2	0	0	1	86,865
2	1	0	1	64,23
2	2	0	1	78,325
2	3	0	1	82,985
2	0	1	1	86,865
2	1	1	1	93,09
2	2	1	1	84,215
2	3	1	1	68,17
2	0	2	1	86,865
2	1	2	1	84,305
2	2	2	1	71,875
2	3	2	1	73,235
2	0	0	2	85,585
2	1	0	2	64,865
2	2	0	2	76,465
2	3	0	2	83,825
2	0	1	2	85,585
2	1	1	2	85,105
2	2	1	2	84,41
2	3	1	2	66,935
2	0	2	2	85,585
2	1	2	2	88,49
2	2	2	2	78,11
2	3	2	2	74,21
2	0	0	3	90,975
2	1	0	3	64,115
2	2	0	3	72,315
2	3	0	3	81,855
2	0	1	3	90,975
2	1	1	3	83,965
2	2	1	3	75,77

2	3	1	3	61,605
2	0	2	3	90,975
2	1	2	3	87,65
2	2	2	3	84,805
2	3	2	3	80,455
3	0	0	0	71,53
3	1	0	0	49,7
3	2	0	0	55,395
3	3	0	0	78,39
3	0	1	0	71,53
3	1	1	0	77,23
3	2	1	0	70,82
3	3	1	0	62,725
3	0	2	0	71,53
3	1	2	0	77,38
3	2	2	0	59,86
3	3	2	0	44,75
3	0	0	1	78,715
3	1	0	1	58,81
3	2	0	1	66,68
3	3	0	1	77,775
3	0	1	1	78,715
3	1	1	1	83,39
3	2	1	1	70,46
3	3	1	1	79,485
3	0	2	1	78,715
3	1	2	1	79,425
3	2	2	1	74,08
3	3	2	1	72,105
3	0	0	2	82,18
3	1	0	2	59,955
3	2	0	2	67,97
3	3	0	2	84,93
3	0	1	2	82,18
3	1	1	2	94,25
3	2	1	2	83,76

3	3	1	2	68,945
3	0	2	2	82,18
3	1	2	2	80,505
3	2	2	2	75,48
3	3	2	2	69,285
3	0	0	3	88,19
3	1	0	3	63,38
3	2	0	3	63,215
3	3	0	3	78,665
3	0	1	3	88,19
3	1	1	3	86,65
3	2	1	3	84,75
3	3	1	3	63,125
3	0	2	3	88,19
3	1	2	3	85,215
3	2	2	3	75,135
3	3	2	3	70,97
4	0	0	0	61,945
4	1	0	0	45,22
4	2	0	0	46,44
4	3	0	0	66,605
4	0	1	0	61,945
4	1	1	0	55,055
4	2	1	0	59,51
4	3	1	0	27,215
4	0	2	0	61,945
4	1	2	0	75,665
4	2	2	0	60,925
4	3	2	0	48,01
4	0	0	1	64,48
4	1	0	1	37,145
4	2	0	1	49,615
4	3	0	1	64,225
4	0	1	1	64,48
4	1	1	1	70,215
4	2	1	1	61,3

4	3	1	1	31,43
4	0	2	1	64,48
4	1	2	1	75,42
4	2	2	1	65,29
4	3	2	1	47,015
4	0	0	2	78,705
4	1	0	2	53,205
4	2	0	2	54,36
4	3	0	2	71,715
4	0	1	2	78,705
4	1	1	2	75,57
4	2	1	2	67,42
4	3	1	2	40,54
4	0	2	2	78,705
4	1	2	2	82,11
4	2	2	2	73,61
4	3	2	2	64,1
4	0	0	3	80,84
4	1	0	3	42,155
4	2	0	3	43,19
4	3	0	3	52,55
4	0	1	3	80,84
4	1	1	3	75,01
4	2	1	3	59,21
4	3	1	3	31,44
4	0	2	3	80,84
4	1	2	3	80,345
4	2	2	3	57,955
4	3	2	3	50,805

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Chen G7Q. // Chem. Soc. Rev. 2009. V. 38. № 8. P. 2434–2446.
2. Kim D.Y., Kim H.W., Chung M.G., Rhee Y.H. // J. Microbiol. 2007. V. 45. № 2. P. 87–97.
3. Bonartseva G.A., Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Kevbrina M.V., Kallistova A.Y., Gerasin V.A., Iordanskii A.L., Nozhevnikova A.N. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2003. V. 109. № 1–3. P. 285–301.
4. Mergaert J., Webb A., Anderson C., Wouters A., Swings J. // Appl. Environ. Microbiol. 1993. V. 59. № 10. P. 3233–3238.
5. Suyama T., Tokiwa Y., Ouichanpagdee P., Kanagawa T., Kamagata Y. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. № 12. P. 5008–5011.
6. Woolnough C.A., Charlton T., Yee L.H., Sarris M., Foster J.R. // Polym. Int. 2008. V. 57. № 9. P. 1042–1051.
7. Мокеева В.Л., Чекунова Л.Н., Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Герасин В.А., Бонарцева Г.А. // Микология и фитопатология. 2002. Т. 36. № 5. С. 59–63.
8. Bhatt R., Shah D., Patel K.C., Trivedi U. // Biores. Technol. 2008. V. 99. № 11. P. 4615–4620.
9. Colak A., Güner S. // Int. Biodeterior. Biodegradation. 2004. V. 53. P. 103–109.
10. Nishida H., Tokiwa Y. // J. Environ. Polym. Degrad. 1993. V. 1. № 1. P. 65–80.
11. Mukai K., Doi Y. // RIKEN Review. 1993. № 3. P. 21–22.
12. Lim S.-P., Gan S.-N., Tan I. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2005. V. 126. № 1. P. 23–32.
13. Sridewi N., Bhubalan K., Sudesh K. // Polym. Degrad. Stab. 2006. V. 91. № 12. P. 2931–2940.
14. Lopez-Llorca L.V., Colom Valiente M.F., Gascon A. // Micron. 1993. V. 24. № 1. P. 23–29.

15. Yew S.-P., Tang H.-Y., Sudesh K. // Polym. Degrad. Stab. 2006. V. 91. № 8. P. 1800–1807.
16. Neves A. Use of Enzymes in Extraction of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* / A. Neves, J. Muller // Biotechnology Progress. - 2012. – Vol. 28, №6. – P. 1575 – 1580.
17. Hejazi P. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(3-hydroxybutyrate) recovery / P. Hejazi, E. Vasheghani-Farahani, Y. Yamini // Biotechnology Progress. – 2003. – №19. – P. 1519–1523.
18. Koller M. Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review / M. Koller, A. Salerno, M. De Sousa Dias // Food Technology and Biotechnology – 2010 - Vol.48, №3 – P. 255–269.
19. Kunasundari B. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Kunasundari, K. Sudesh // eXPRESS Polymer Letters. – Vol.5, – №7. – 2011. – P. 620–634.
20. Noisshiki Y. Medical materials for soft tissue use/ Y. Noisshiki, S. Komatsuzaki // Japanese Patent Application. – № JP 7275344 A2. – 1995.
21. Lee E. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by newly isolated *Agrobacterium* sp. SH-1 and GW-04 from structurally unrelated single carbon substrates / E. Y. Lee, S. H. Kang, C. Y. Choi // Biosynthesis J. Ferment. Bioeng. – 1995. – P. 328-334.
22. Doi, Y Nuclear magnetic resonance studies on poly(α -hydroxybutyrate) and a copolyester of α -hydroxybutyrate and α -hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16 / Y Doi, M. Kunioka, Y. Nakamura, K. Soga // Macromolecules. –1986. – P. 2860-2864.
23. Shang L. Optimization of propionic acid feeding for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in fed-batch of *Ralstonia eutropha* / L. Shang, J. H. Do, D. D. Fan, M. Jiang, H. N. Chang, J. Chin. // Chem. Eng. – 2003. – P. 220-223.

24. Du G. C. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha* / G. C. Du, J. Chen, J. Yu, S. Y. Lun // *Biochem. Eng. J.* – 2001. – P. 103-110.

25. Вайнберг Р. Ш. Теплофизические проблемы и практические результаты повышения энергоэффективности извлечения и термообработки высокомолекулярных биополимеров // *Промышленная теплотехника.* – 2007.

26. Bugnicourt E. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging / E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez // *eXPRESS Polymer Letters.* – Vol.8, – №.11. – 2014. – P. 791-808.

27. Luzier WD. Materials derived from biomass biodegradable materials / W. D. Luzier // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1992. – P. 839-842.

28. Fonseca G. G. Polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Escherichia coli* harboring the structural genes of the polyhydroxyalkanoate synthases of *Ralstonia eutropha* and *Pseudomonas aeruginosa* using low cost substrate / G. G. Fonseca, R. V. Antonio // *Journal of Applied Sciences.* – 2006. – P. 1745-1750.

29. Volova Tatiana G. Fundamental basis of production and application of biodegradable polyhydroxyalkanoates / Tatiana G. Volova, Ekaterina I. Shishatskaya, Natalia O. Zhila, Eugeny G. Kiselev, Petr V. Mironov, Alexander D. Vasiliev, Ivan V. Petersone, Anthony J. Sinskey // *Journal of Siberian Federal University. Biology* 3. – 2012. – P. 280-299.

30. Прудникова С. В. Экологическая роль полигидроксиалканоатов – аналога синтетических пластмасс: закономерности биоразрушения в природной среде и взаимодействия с микроорганизмами / С. В. Прудникова, Т. Г. Волова. – Красноярск: Красноярский писатель, 2012. – 184 с.

31. Kalacheva G.S. Fatty Acid Composition of *Wautersia eutropha* Lipids under Conditions of Active Polyhydroxyalkanoates Synthesis / G. S. Kalacheva, T. G. Volova // *Microbiology.* – 2007. V. 76. № 5. P. 535-540.

32. Дорожкин В.П. Химия и физика полимеров: учебное пособие / Нижнекамск – Нижнекамский химико-технологический институт, 2013 – С. 189.

33. Koller M. Extraction of short-chain-length poly-[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under elevated temperature and pressure / M. Koller, R. Bona, E. Chiellini, G. Braunegg // *Biotechnology Letters*. – 2013. – № 35. – P. 1023–1028

34. Filomena Doutora Maria Andrade de Freitas : Investigation of the Adhesive Properties of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates (mcl-PHA) for Medical Applications // *Theses and studies in the field of biological diversity*- 2016. - P. 13.

35. Gurtovenko A. A. Interaction of ethanol with biological membranes: the formation of non-bilayer structures within the membrane interior and their significance/ A. A. Gurtovenko J. Anwar // *The Journal of Physical Chemistry* – 2009. - P. 1983–1992.

36. Kunasundari B. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates / B. Kunasundari, K. Sudesh // *eXPRESS Polymer Letters*. – 2011. – Vol.5. №7. – P.620 – 634.

37. Jong-il Choi Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals / Jong-il Choi, Sang Yup Lee // *Biotechnology and Bioengineering* – 1999. – Vol . 62. – P. 546–553

38. Волова Т.Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) - биоразрушаемые полимеры для медицины/ Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. – Новосибирск, Издательство СО РАН. – 2003. – С. 330.

39. Культивирование микроорганизмов в ферментере BioFlo115(7,5л.) / методические указания к лабораторному практикуму [Электронный ресурс] // сост. С.В. Барановский, А.В. Демиденко, Е.Г. Киселев. – Электрон.дан. – Красноярск :Сиб. федер. ун-т, 2016. – С. 42.

40 Нетрусов А.И., Котова, Котова И.Б. Микробиология: учебник жля студентов высших учебных заведений./ А.И. Нетрусов.М: Изд-во «Академия»,2006 г. - 352 с.

41 - Волова Т.Г, Шишацкая Е.И., Разрушаемые биополимеры - получение, свойства, применение [Текст]/Т.Г. Волова. - Красноярск. Изд-во Красноярский писатель, 2011.- 392 с.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой
М. Волова Т. Г. Волова
« 5 » июля 20 19 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Получение полигидроксиалканоатов и их использование в создании
композитных материалов


Руководитель


подпись, дата

доцент, к. т. н.
должность, учёная степень

С.В. Барановский
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

В.А. Афанасьев
инициалы, фамилия

Красноярск 2019