

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ Т. Г. Волова

подпись инициалы, фамилия

« ____ » _____ 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЛАСТИФИКАТОРОВ НА СВОЙСТВА
ГРАНУЛ ИЗ ПОЛИ(3-ГИДРОКИСБУТИРАТА) И КИНЕТИКУ ИХ
ДЕГРАДАЦИИ В ПОЧВЕННЫХ МИКРОЭКОСИСТЕМАХ**

06.04.01 Биология

06.04.01 – 01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель _____ к.т.н., доцент С.В. Барановский

подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____ Н.Л Ертилецкая

подпись, дата инициалы, фамилия

Рецензент _____ к.т.н., доцент В.А. Кожухов

подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2021

АННОТАЦИЯ

Магистерская диссертация на тему «Исследование влияния пластификаторов на свойства гранул из поли(3-гидроксibuтирата) и кинетику их деградации в почвенных микрoэкоcистемах» содержит 67 страниц текста, 34 иллюстрации, 5 таблиц и 81 источник литературы.

Ключевые слова: П(ЗГБ), БИОПОЛИМЕРЫ, ЭКСТРУЗИЯ БИОПОЛИМЕРОВ, ЭКСТРУЗИЯ П(ЗГБ), БИОРАЗРУШЕНИЕ П(ЗГБ), ПЛАСТИФИКАТОРЫ, ТРИАЦЕТИН.

В последние десятилетия быстрый рост потребления синтетических пластмасс во многих отраслях экономики стал глобальной проблемой. Как следствие, накопление больших количеств синтетического пластика в окружающей среде и его негативное влияние на окружающую среду вызвали необходимость во внедрении биоразлагаемых полимеров, которые сохраняют эксплуатационные характеристики в течение периода потребления. Среди разрушаемых полимеров повышенное внимание уделяется полигидроксиалканоатам, самым распространенным среди которых является П(ЗГБ). Однако существенной проблемой в случае П(ЗГБ) является его термическая деградация вблизи температуры плавления, что ограничивает его переработку промышленными методами, в числе которых экструзия. Для решения этой проблемы применяют композиты с другими биоразрушаемыми полимерами или добавляют к полимеру химические агенты, снижающие его температуру плавления, в числе которых пластификаторы.

Целью данной работы было исследование влияния пластификатора триацетина на свойства и кинетику биodeградации гранул из поли(3-гидроксибутирата) полученных методом экструзии. Были реализованы следующие задачи: провести биосинтез бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 и получить образцы полимера; на примере пленок полученных растворными технологиями оценить влияние пластификатора триацетина на их свойства и возможность использования его для других методов переработки; методом экструзии получить и исследовать гранулы из П(ЗГБ) и П(ЗГБ) с триацетином 15 %; исследовать микроструктуру, молекулярную массу, физико-химические свойства полученных гранул П(ЗГБ) и П(ЗГБ) с триацетином; исследовать и сравнить кинетику биodeградации полученных гранул и пленок П(ЗГБ) и П(ЗГБ) с триацетином в лабораторных почвенных микрoэкоcистемах; определить численность деструкторов для пленок и гранул.

АВТОРЕФЕРАТ

В ходе проделанной работы получены следующие результаты:

1. Проведен процесс культивирования бактерий *Cupriavidus eutrophus* V10646 на опытном производстве и получены образцы полимера для дальнейших исследований. По результатам процесса культивирования концентрация биомассы составила 60–80 г/л с содержанием П(ЗГБ) – 80–85 %. Полученный П(ЗГБ) имел следующие свойства: среднечисловая молекулярная масса $M_n = 723 \pm 6,0$ кДа; полидисперсность $(D) = 4,6$; степень кристалличности – $76 \pm 1,2$ %.

2. Методом полива раствора получена серия пленок из П(ЗГБ) и из П(ЗГБ) с добавлением 15 % пластификатора триацетина. Пленки П(ЗГБ) и П(ЗГБ)/триацетин не отличались визуально, были прозрачными, имели гладкую поверхность. Диаметр полученных пленок составил $95 \pm 0,5$ мм, толщина варьировала от 15 до 42 мкм. Пленка П(ЗГБ)/триацетин имела более рыхлую, пористую, неоднородную структуру, при этом размер пор для составил $2,9 \pm 0,9$ мкм. Температуры кристаллизации, начала плавления и деградации для пленки П(ЗГБ)/триацетин составили 107.7, 166.73 и 269.22, соответственно.

3. За четыре недели экспозиции в почвенных микроэкосистемах пленки П(ЗГБ) разрушились на 64,3 % и пленки П(ЗГБ)/триацетин – на 83,4 %. Среди деструкторов пленок П(ЗГБ)/триацетин были определены такие специфические виды как *Aspergillus fumigatus*, *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Streptomyces albus*, *Ps. koreensis*.

4. Методом экструзии получена серия гранул из П(ЗГБ) и из П(ЗГБ) с добавлением 15 % пластификатора триацетина. Гранулы П(ЗГБ) размером 3-5 мм имели светло-коричневый цвет, шероховатую структуру и белесоватость на срезах. Гранулы П(ЗГБ)/триацетин размером 4-5 мм имели желтоватый оттенок, были блестящими, гладкими и однородными по размерам. Микрофотографии полученных гранул показали, что микроструктура гранул различается лишь незначительной шероховатостью гранул без триацетина. Температуры кристаллизации, начала плавления и деградации для гранул П(ЗГБ)/триацетин составили 77.30, 168.10 и 284.60, соответственно. Добавление триацетина в состав гранул из П(ЗГБ) позволило избежать падения молекулярной массы в процессе экструзии.

5. За пять месяцев экспозиции в почве гранулы П(ЗГБ) достигли менее 25 % разрушения, в то время, как гранулы П(ЗГБ)/триацетин превысили это значение уже в первый месяц экспозиции, с последующим повышением процента разрушения более чем в два раза (67,1 %) ко второму месяцу и разрушением на 92,6 % на пятый месяц. По данным электронной микроскопии поверхностей гранул, на третий месяц экспозиции в почве были обнаружены значительные различия в микроструктуре гранул П(ЗГБ) и П(ЗГБ)/триацетин в виде многочисленных крупных пор и полых пространств для гранул П(ЗГБ)/триацетин.

6. Среди деструкторов гранул из П(ЗГБ)/триацетин преобладали виды *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas putida*, *Aspergillus fumigatus*, род *Penicillium*. Для гранул П(ЗГБ)/триацетин оказалась характерной меньшая численность бактериальных деструкторов по сравнению с гранулами без пластификатора, численность грибных деструкторов при этом сравнительно одинакова для гранул обоих составов. Сравнение численности деструкторов на поверхности гранул и в почве показало, что численность грибных деструкторов находится в пределах одного порядка для гранул обоих составов, в то время как численность бактериальных деструкторов в почве больше, чем на поверхности гранул для гранул П(ЗГБ)/триацетин.

7. На основании полученных данных о деградации пленок и гранул далее были получены математические модели, характеризующие кинетику разрушения исследуемых материалов. Полученные уравнения характеризовались достаточно высокими значениями коэффициента аппроксимации R^2 , что означает, что модели относительно верно отражают зависимость между параметрами биodeградации.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6	
1	Обзор литературы	8
1.1	Биоразрушаемые полимеры в промышленности	8
1.2	Методы переработки биоразрушаемых полимеров	11
1.3	Экструзия ПГА	16
1.4	Биодеградация ПГА	20
1.4.1	Механизмы биодеградации	20
1.4.2	Микроорганизмы-биодеструкторы	22
1.4.3	Ферменты разрушения и механизм их действия	23
1.4.4	Определение биодеградации	24
1.4.5	Биодеградация ПГА и композитов на их основе в почвенных средах	25
1.5	Использование пластификаторов для улучшения физико-химических свойств ПГА	27
2	Материалы и методы	31
2.1	Материалы исследования	31
2.2	Синтез и выделение поли-3-гидроксibuтирата	31
2.3	Получение полимерных гранул методом влажного гранулирования	33
2.4	Получение полимерных гранул методом экструзии	34
2.5	Получение полимерных пленок методом полива из раствора	37
2.6	Исследование свойств полученных пленок и гранул из П(ЗГБ)	37
2.6.1	Определение плотности полимерных гранул	37
2.6.2	Исследование микроструктуры поверхности	37
2.6.3	Инфракрасная спектроскопия (ИК-Фурье)	38
2.6.4	Дифференциально-сканирующая калориметрия (ДСК)	38
2.6.5	Исследование динамики деградации пленок и гранул из П(ЗГБ) и из П(ЗГБ)/триацетин в лабораторных почвенных микрэкосистемах	38
2.6.6	Определение численности почвенных деструкторов пластифицированных полимерных гранул	39
2.6.7	Исследование молекулярно-массовых характеристик гранул из П(ЗГБ) с пластификатором до и после деградации в почвенных микрэкосистемах	41
2.7	Построение моделей деградации пленок и гранул	42
2.8	Статистическая обработка данных	42
3	Результаты	43
3.1	Синтез и выделение П(ЗГБ)	43
3.2	Характеристика образцов полимерных пленок и гранул из П(ЗГБ)	43

3.3	Исследование микроструктуры поверхности	44
3.4	Инфракрасная спектроскопия	45
3.5	Дифференциально-сканирующая калориметрия	47
3.6	Исследование деградации образцов полимерных пленок и гранул из П(ЗГБ) в лабораторных почвенных микрэкосистемах	48
3.6.1	Исследование деградации полимерных пленок из П(ЗГБ) и П(ЗГБ)/триацетин в лабораторных почвенных микрэкосистемах	48
3.6.2	Определение набора почвенных деструкторов пластифицированных полимерных пленок	49
3.6.3	Исследование динамики деградация гранул П(ЗГБ) и П(ЗГБ)/триацетин в лабораторных почвенных микрэкосистемах	51
3.6.4	Сравнение кинетических моделей разрушения для пленок и гранул из П(ЗГБ) и из П(ЗГБ) с добавлением триацетина	54
3.6.5	Исследование молекулярно-массовых характеристик гранул П(ЗГБ) и П(ЗГБ)/триацетин до и после деградации в лабораторных почвенных микрэкосистемах	55
3.6.6	Определение численности почвенных деструкторов полимерных гранул П(ЗГБ) и П(ЗГБ)/триацетин	56
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	61
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	62

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия быстрый рост потребления синтетических пластмасс во многих отраслях экономики стал глобальной проблемой для всего человечества. Обладая очевидными достоинствами, тем не менее, эти материалы длительно разлагаются в окружающей среде и оказывают негативное воздействие на окружающую среду. Как следствие, необходимо внедрение биоразлагаемых полимеров, которые сохраняют эксплуатационные характеристики в течение периода потребления, а затем претерпевают физико-химические и биологические изменения под действием внешних факторов и легко включаются в глобальный круговорот веществ [1].

На долю биоразлагаемых полимеров приходится менее 15 % общего объема современного рынка пластмасс. Эти полимеры широко применяются для упаковки пищевых продуктов, изготовления сельскохозяйственных пленок, контейнеров, пеноматериалов, а также одноразовой посуды, которые получают, главным образом, методами экструзии, термоформования, литья под давлением и экструзионно-раздувного формования. Одними из самых перспективных среди биоразлагаемых полимеров считаются полигидроксиалканоаты (ПГА) – полиэфиры гидроксимасляной кислоты микробиологического происхождения, накапливающиеся в клетках продуцентов в качестве запасных веществ. ПГА, в зависимости от состава, обладают разнообразными тепловыми и физико-механическими свойствами и вследствие этого подвергаются переработке из различных фазовых состояний (порошки, растворы, гели, расплавы) общепринятыми методами [2].

Несмотря на техническую простоту экструзионных методов, существенной проблемой в случае ПГА является их термическая деградация вблизи температуры плавления, что ограничивает их переработку методом экструзии. Для решения этой проблемы применяются такие подходы, как создание композитов с другими биоразрушаемыми полимерами (крахмал, поли-ε-капролактон, древесина и т.д.) или добавление химических агентов, снижающих температуру плавления ПГА и тем самым расширяющих окно его переработки.

Как и многие другие биоразрушаемые полимеры, ПГА хорошо поддается биodeградации микроорганизмами, а скорость его разрушения зависит от многих факторов, основные из которых – состав мономеров, молекулярный вес и площадь поверхности, доступной для микробного заселения [2]. Для расчета скорости разложения биоразрушаемых пластиков на практике необходимо иметь представление о сущности процесса биоразрушения. В частности, нужно понимать, как именно происходит этот процесс, какие микроорганизмы его осуществляют, от каких факторов он зависит, каковы продукты разложения биоразрушаемых материалов. В настоящее время еще недостаточно данных по этим вопросам, несмотря на то, что проведено большое количество исследований в этой области, которые, однако, зачастую имеют противоречивые результаты.

Цель настоящей работы – исследовать влияние пластификатора триацетина на свойства и кинетику биodeградации гранул из поли(3-гидроксibuтирата) полученных методом экструзии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Получить и исследовать фракцию П(ЗГБ) методом культивирования с лимитированием по азоту штамма *Cupriavidus eutrophus* В-10646 для последующего изготовления из нее полимерных пленок и гранул;
- 2) На примере пленок, полученных растворными технологиями, оценить влияние пластификатора триацетина на их свойства и возможность использования его для других методов переработки;
- 3) Методом экструзии получить и исследовать гранулы из П(ЗГБ) и П(ЗГБ) с триацетином 15 %;
- 4) Исследовать микроструктуру, молекулярную массу, физико-химические свойства полученных гранул П(ЗГБ) и П(ЗГБ) с триацетином;
- 5) Исследовать и сравнить кинетику биodeградации полученных гранул и пленок П(ЗГБ) и П(ЗГБ) с триацетином в лабораторных почвенных микрoэcosystemах;
- 6) Определить численность деструкторов для пленок и гранул.

1 Обзор литературы

1.1 Биоразрушаемые полимеры в промышленности

Биоразрушаемые полимеры были разработаны еще несколько десятилетий назад, но приобрели свою коммерческую значимость относительно недавно. Причиной этого были, во-первых, более высокая цена за счет повышенных затрат на сырье и технологическую обработку, а во-вторых – низкие прочностные характеристики по сравнению с традиционными пластмассами. Более того, большинство производителей не считали целесообразным использовать биоразрушаемые материалы в своих производствах. Однако в настоящее время ситуация меняется таким образом, что потенциальный потребитель начинает более осознанно подходить к выбору продукции и отдавать предпочтение более экологичным товарам, что, в свою очередь, заставляет производителей пересматривать свое производство и обращаться к использованию биоразрушаемых полимеров для упаковки. Стоимость биоразрушаемых полимеров стремительно снижается благодаря появлению новых производственных технологий, а их прочность повышается за счет применения метода сополимеризации и разработки композитных составов. Тем не менее, по состоянию на 2020 год, биопластики составляют примерно 1% от 335 млн. тонн пластика, производимых ежегодно. Согласно последним данным Европейского института биопластиков и научно-исследовательского института nova-Institute (Хюрт, Германия), являющимся ведущими организациями в области исследования биополимеров, глобальные производственные мощности по выпуску биопластиков увеличатся примерно с 2,11 млн. тонн в 2018 году до приблизительно 2,62 млн. тонн в 2023 году [3].

Преимуществом биоразлагаемых пластиков является то, что они разлагаются на натуральные компоненты под действием микроорганизмов (бактерий или грибков) и физических факторов (УФ-излучение, температура, кислород), и потому не требуют отдельного сбора, сортировки, переработки для повторного использования. Биоразрушаемые пластики не являются чужеродными для природы, но для того, чтобы на максимальном уровне использовать их способность к биоразложению, они должны собираться вместе с органическими отходами, и подвергаться компостированию в аэробных и анаэробных условиях [4].

Все разнообразие биопластиков представлено на Рисунок 1.

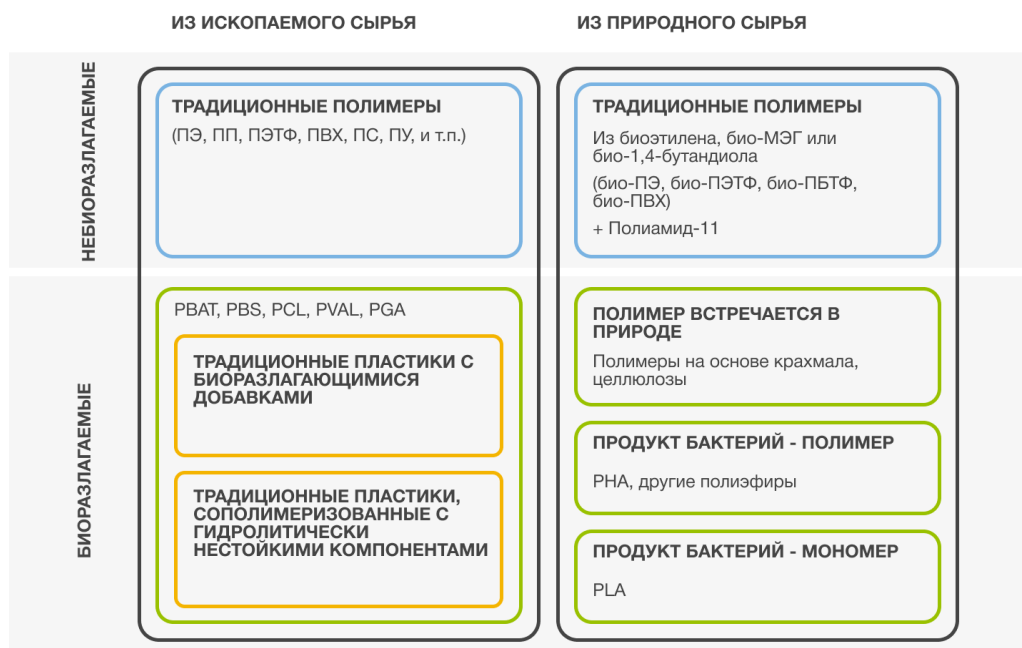


Рисунок 1 – Классификация биопластиков [3]

Биоразрушаемые полимеры можно получить из традиционных синтетических пластиков с помощью специальных биоразлагающихся добавок, которые ускоряют разложение материала в естественной среде или с помощью химической модификации. В первом случае биодegradируемость достигается добавлением в полимер добавок, ускоряющих оксо-, фото- или гидроразложение. Так, добавление 1–2 % добавки ОХ 5854 РЕ (оксобиоразлагаемая добавка) вызывает разрушение в естественных условиях молекулярных цепей полиэтилена и других полиолефинов, сроки которого зависят от климатической зоны и могут регулироваться [5]. К сожалению, использование оксобиоразлагаемых биополимеров нельзя назвать полностью экологичным: в процессе своего разрушения, такой материал образует частицы микропластика, который вызывает загрязнение почвы и воды, а так же может быть случайно проглочен организмами, живущими вне почвы, что приводит к его накоплению в телах живых организмов [6].

Химическая модификация подразумевает введение мономера биоразлагаемого полимера в состав традиционного пластика и получение таким образом биоразрушаемого сополимера. Примером такой модификации может служить добавление винилкетонного мономера в количестве 2–5% в качестве сополимера к этилену или стиролу, что позволяет получать пластики, способные к фотодegradации при действии ультрафиолетового излучения в пределах 290–320 нм [7]. Однако недостаток полимеров с подобными химическими модификациями в том, что после того, как биоразлагаемая фракция материала будет разрушена, оставшийся синтетический полимерный скелет будет разрушаться с трудом и поэтому по-прежнему будет оказывать вредное воздействие на окружающую среду [6].

Среди синтетических биоразрушаемых пластиков отдельно выделяется поли-ε-капролактон (PCL). PCL представляет собой термопластичный биоразлагаемый полиэфир, получаемый через полимеризацию ε-капролактона который удобен для термической обработки за счет низкой температуры плавления и низкой вязкости. Тем не менее, из-за низких барьерных и механических свойств, применение PCL в упаковочной промышленности в качестве биоразлагаемого полимера ограничено. Поэтому, для улучшения окрашиваемости и механических свойств, PCL обычно смешивают с другими полимерами (например, пропионатом целлюлозы, полимолочной кислотой и бутиратом ацетата целлюлозы) [8].

Вышеупомянутые недостатки биополимеров на синтетической основе показывают, что по-настоящему биоразрушаемый полимер не должен в своей основе иметь производные нефтехимии. Поэтому на сегодняшний день активно ведутся разработки биоразлагаемых полимеров полностью на натуральной основе. Натуральные биополимеры могут быть получены тремя способами:

- Выделение из природного сырья (крахмал, целлюлоза);
- Химический синтез из природных мономеров (полимолочная кислота);
- Синтез в естественной среде в живых организмах, зачастую геномодифицированных (полигидроксиалканоаты).

Выделяемые из природного сырья крахмал, целлюлоза и лигнин представляют особый интерес для практического применения. Хотя крахмал является биоразлагаемым полимером, который можно изготавливать в больших количествах при относительно низких затратах, легко обрабатывать и получать из него пленки с низкой проницаемостью для кислорода, основная проблема с нативным крахмалом заключается в том, что он является хрупким и гидрофильным, что существенно ограничивает его применение в упаковке. Для повышения его гибкости и повышения легкости обработки используются различные пластификаторы (глицерин, глицоль, сорбит) для превращения нативного крахмала в термопластичный крахмал (TPS), который устойчив к переработке экструзией, но чувствителен к влаге [9]. Целлюлозу и лигнин, являющиеся отходами деревообрабатывающей промышленности, получают напрямую из биомассы, и они привлекательны, прежде всего, своей относительно высокой подверженностью к биodeградации и экономически выгодным применением [7].

Полимолочная кислота (PLA) в настоящее время является одним из самых перспективных биodeградируемых материалов для упаковки, поскольку PLA легко и дешево подвергается переработке и в ряде физических свойств даже превосходит синтетические пластиковые материалы. PLA получают путем конденсационной полимеризации D- или L-молочной кислоты или путем полимеризации с раскрытием цикла лактидного мономера из молочной кислоты [9]. PLA может быть применен для изготовления материалов нового поколения, которые могут выдерживать высокие температуры и подходят для использования в микроволновых печах, а также для изготовления бутылок и

гибких пленок с низкой кислородной проницаемостью для напитков и продуктов питания [6].

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – биоразрушаемые полимеры полностью микробного происхождения, в то время как полилактиды синтезируются посредством комбинации брожения (синтез молочной кислоты) и химической реакции полимеризации для преобразования молочной кислоты в полимер [10]. ПГА подходят для упаковки пищевых продуктов, потому что их влагобарьерные свойства не уступают таковым традиционных полимеров. ПГА представляют собой биополиэфиры алкановых кислот, содержащие гидроксильную группу и как минимум одну функциональную группу, присоединенную к карбоксильной группе. Полимеры ПГА могут различаться по своим свойствам в зависимости от их химического состава. Они нерастворимы в воде, устойчивы к УФ-излучению. Также отмечено, что ПГА обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом, характеризуются идеальной биоразрушаемостью и биосовместимостью и могут быть получены из возобновляемых ресурсов [11].

Поли (3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат) (П(3ГБ-со-3ГВ)) подходит для горячего формования и производства гибкого пластика, используемого для упаковки пищевых продуктов, где желательны биоразлагаемые материалы. ПГА в настоящее время в основном используются в качестве упаковки для пищевых продуктов с высоким содержанием масла, а также для замороженных продуктов и продуктов питания с маркировкой «органические». В зависимости от вида и процентного содержания различных включений механические свойства варьируют от эластомерных до смол, таких же жестких, как нейлон или поликарбонат. ПГА чаще всего формуют посредством экструзии пленки, литья под давлением, выдувки и т. д. [8].

1.2 Методы переработки биоразрушаемых полимеров

При промышленном получении изделий из биоразрушаемых полимеров в основном используют те же методы, что и при переработке традиционных полимеров. Процессу переработки и изготовления изделий из полимеров и пластмасс предшествуют выбор материала для каждого изделия, базирующийся на анализе условий его эксплуатации, и конструирование изделия. Затем следуют выбор способа формования и оборудования, создание технологической оснастки и определение оптимальных параметров процесса формования.

Формование изделий из полимеров и пластмасс осуществляется различными способами, выбор которых зависит прежде всего от вида изделия и используемого полимера. Выбор метода переработки обусловлен конструкцией изделия и характером изменений полимерного материала при нагревании. Основными технологическими параметрами, определяющими протекание процессов термоформования изделий из полимерных заготовок и влияющими в конечном итоге на качество готовой продукции, являются: температура

формующего инструмента, рабочий перепад давления при формировании, скорость формирования, скорость охлаждения отформованной заготовки, геометрия формируемого изделия, свойства используемого полимерного сырья, свойства и термодинамические параметры рабочих сред и др. Так, термопласты могут быть переработаны любым методом пластической деформации, а реактопласты в основном методом горячего прессования [12, 13].

Изготовление изделий из полимерных, в том числе биоразрушаемых, материалов осуществляется главным образом методами литья под давлением, прессования, выдувного формования и экструзии.

Термопластичные полимеры, к которым относятся и некоторые биоразрушаемые материалы (ПГА, PCL PLA), претерпевают ряд превращений. Сначала материал плавится и в процессе пластической деформации ему придается конфигурация будущего изделия. Далее охлаждением до температуры теплостойкости фиксируется приданная ему форма. Процесс формообразования при переработке термореактивных материалов происходит при нагреве материала до температуры отверждения, сопровождающегося протеканием химической реакции и образованием в материале пространственной молекулярной структуры.

Литье под давлением является наиболее широко используемым методом переработки термопластичных изделий, особенно тех, которые предполагают сложную форму и требуют высокой точности размеров. Данный метод в равной степени применим как для переработки традиционных пластмасс, таких как АБС и поликарбонат, так и для биоразлагаемых полимеров, поэтому в обоих случаях применяют специальные литьевые машины (Рисунок 2).

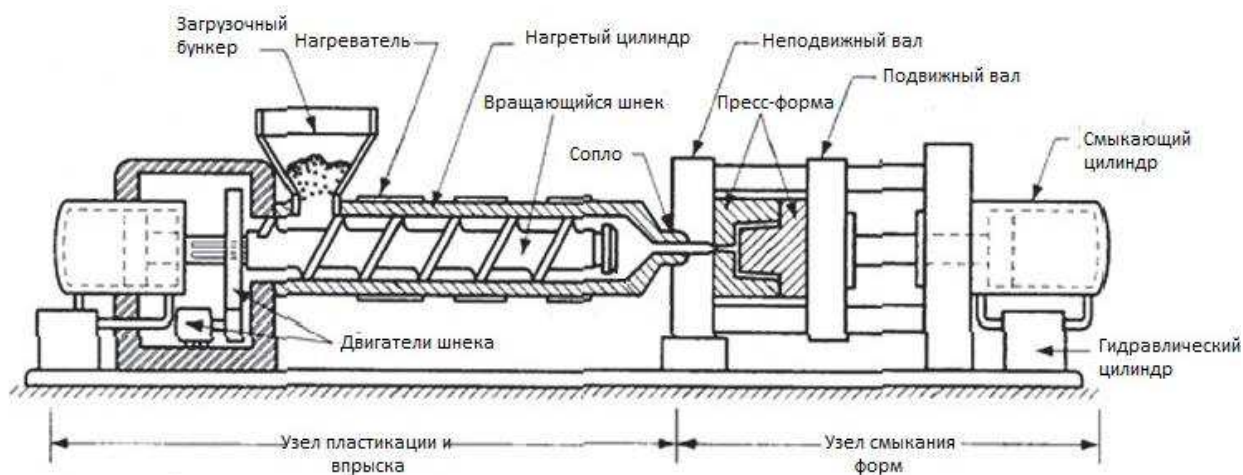


Рисунок 2 – Общая схема конструкции оборудования для литья под давлением [14]

Формование полимерных изделий производится в холодных формах, которые не нуждаются в подогреве, поскольку отвердевание полимерного материала происходит благодаря охлаждению. Процесс литья под давлением

состоит в разогреве материала до пластического состояния в специальном цилиндре и его инъекции из цилиндра с высокой скоростью и под большим давлением в литевную форму. Затем, остывая в форме, материал твердеет и образует изделия заданного профиля, которое извлекают раскрытием формы.

На литевых машинах могут изготовливаться одна или несколько деталей одновременно, в зависимости от конфигурации, массы и площади отливки. В качестве сырья для изготовления изделий методом литья применяются полистирол, полиамид, полиэтилен и другие полимеры в гранулированном или порошкообразном виде; объем зерен варьирует от 0,008 до 0,125 см³ [15].

Прессование представляет собой процесс, в котором для изготовления композитного продукта используются две подходящие металлические формы. На Рисунок 3 показан пресс-формовщик, в котором верхняя пластина (пуансон, 1) подвижна, а опорная платформа (матрица, 2) неподвижна. Формуемый материал помещен в металлическую форму, и весь узел находится между пресс-формовщиком. Две части пресс-формы сводятся вместе, и подаются тепло и давление [16].

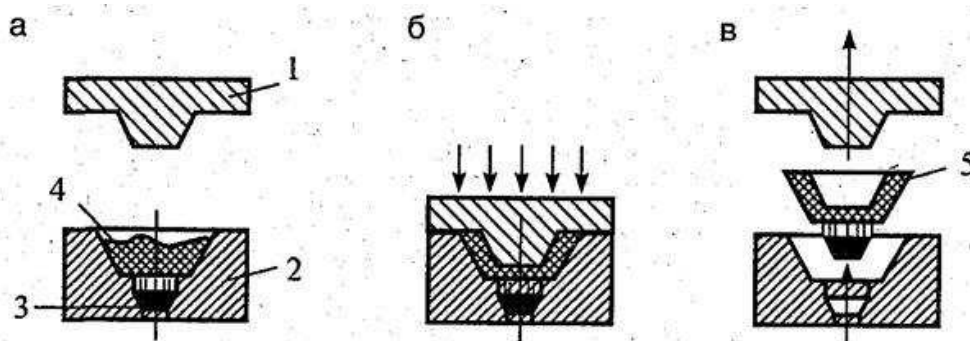


Рисунок 3 – Схема изготовления изделий прессованием [16]: а – загрузка материала в пресс-форму; б – прессование; в – извлечение изделия; 1 – пуансон; 2 – матрица; 3 – выталкиватель; 4 – пресс-материал; 5 – готовое изделие

Полимер, помещенный между формовочными плитами, течет благодаря приложению давления и тепла и приобретает форму пресс-формы с высокой точностью размеров. Отвердевание материала может проводиться либо при комнатной температуре, либо при повышенной температуре. После отвердевания пресс-форму размыкают и результат формования вынимают и используют в дальнейшей обработке. Время, температура и давление являются критическими параметрами прессования и поэтому должны быть оптимизированы. Другие производственные факторы, такие как нагрев стенок пресс-формы, скорость смыкания формы и время размыкания формы, так же влияют на производственный процесс. Биоразлагаемые полимеры, такие как PLA, поливиниловый спирт, пластмассы на основе сои и пластмассы на основе крахмала, могут быть эффективно отлиты под давлением в изделия [16].

Выдувное формование является наиболее приемлемым методом получения полых изделий из биополимеров, обладающих одинаковой толщиной стенок по всему объему. Существует два способа выдувного формования: инжекционно-выдувное и экструзионно-выдувное. Первый способ используется для производства полых изделий (бутылки, банки и другие контейнеры) в больших объемах.

Процесс происходит в несколько стадий. Сначала методом литья под давлением делают заготовку в виде пробирки – преформу. Преформу нагревают до состояния эластичной резины, помещают в пресс-форму и в резиноподобном состоянии раздувают сжатым воздухом. Далее готовое изделие остывает на холодных стенках пресс-формы [17]. Процесс инжекционно-выдувного формования схематично представлен на Рисунок 4.

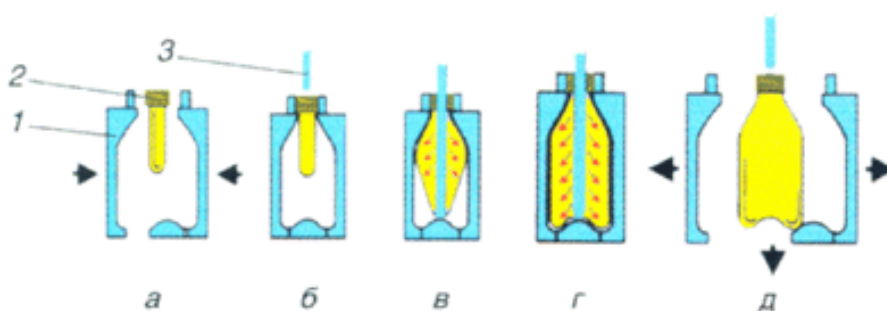


Рисунок 4 – Схема инжекционно-выдувного формования [17]: 1 – пресс-форма; 2 – преформа; 3 – шток

Экструзионное формование несколько отличается от инжекционно-выдувного формования. При этом способе полимер пластифицируется в стандартном экструдере и выходит из него в виде трубной заготовки. Когда заготовка достигает заданной длины, она поступает в форму. Расплавленный полимер раздувается воздухом и остывает на холодных стенках пресс-формы. После цикла охлаждения пресс-форма открывается и изделие изымается. Таким образом, сварной шов имеется лишь в нижней части изделия. Процесс экструзионно-выдувного формования схематично представлен на Рисунок 5.

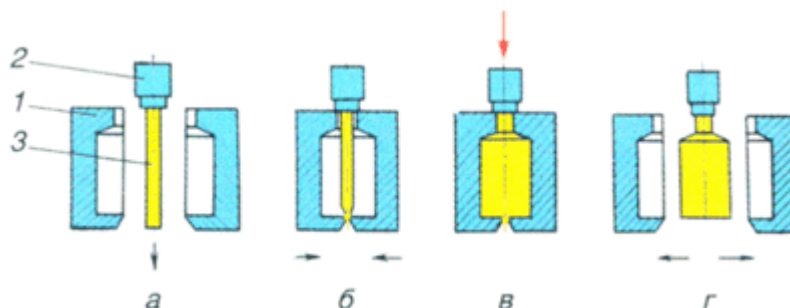


Рисунок 5 – Схема экструзионно-выдувного формования [17]: 1 – пресс-форма; 2 – трубная головка; 3 – трубная заготовка

Метод формования экструзией широко применяется для переработки термопластов в ленты, трубки, пленки, листы, а также для покрытия проводов. Принцип формования экструзией сходен с литьем под давлением. Схема стандартного экструдера представлена на Рисунок 6.

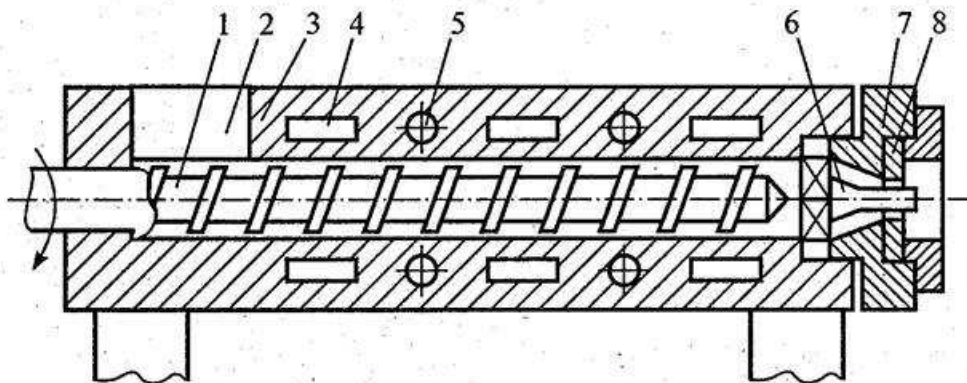


Рисунок 6 – Схема экструдера [16]: 1 – шнек; 2 – загрузочное отверстие; 3 – цилиндр; 4 – водяной или паровой обогрев; 5 – воздушное охлаждение; 6 – сопло; 7 – головка цилиндра; 8 – мундштук

Твердый полимерный материал (в виде порошка или гранул) поступает в экструдер через загрузочное отверстие, разогревается в цилиндре и в виде вязкой массы непрерывно выдавливается шнеком через сопло, имеющее различные профили и сечения формующей головки. При прохождении через сопло и выходе из него полимерный материал охлаждается и затвердевает в виде профильного изделия с сечением сопла. Пленки и листы из полимерных материалов изготавливают методом экструзии через щель. Широкую тонкую пленку часто получают выдуванием.

К технологическим параметрам экструзии относятся температуры зон материального цилиндра и на выходе из экструдера, частота вращения шнека, производительность процесса, скорость вытяжки изделия и давление в головке. Производительность процесса и давление расплава полимера в головке во многом зависят от вязкости и течения расплава [18].

Температурные параметры экструзии выбираются на основе температур переходов, полученных при помощи ДСК или ДТА. Температура материального цилиндра экструдера должна быть на 10-30 °С, а температура головки – на 20-40°С выше температуры плавления полимерного материала [18].

В зону питания экструдера полимер поступает из бункера машины в виде порошка, гранул или ленты, захватывается нарезкой шнека и перемещается вдоль цилиндра. Движение полимера, находящегося в твердом состоянии, обусловлено разностью крутящих моментов, возникающих от сил трения между поверхностью шнека и полимером и поверхностью цилиндра и полимером. При этом для перемещения полимера необходимо, чтобы крутящий

момент от действия силы трения на поверхности цилиндра был больше, чем на поверхности шнека. Это условие обеспечивается, например, изменением температуры цилиндра или шнека, в результате чего меняются коэффициенты трения [16].

При правильно выбранном технологическом режиме стенки цилиндра задерживают вращение гранул полимера, которые шнеком перемещаются вдоль оси. По мере продвижения под действием возникающего давления гранулы уплотняются и перемещаются в виде твердого слоя (винтовой пробки) без пересыпания в канале шнека. Поскольку твердый слой частично проскальзывает относительно поверхности цилиндра и шнека, то движение его происходит по винтовой линии относительно оси вращения [16].

1.3 Экструзия ПГА

Главной особенностью ПГА, усложняющей их термическую переработку, является близость температур плавления и температур деградации и вытекающая из этого узость окна переработки. Чем уже окно переработки полимерного материала, тем выше вероятность термической деградации и как следствие этого – уменьшение молекулярной массы полимера. При температурах, ненамного превышающих температуру плавления П(ЗГБ), уже происходит быстрое снижение молекулярной массы и последующее образование кротоновой кислоты в качестве основного летучего продукта [19]. Было обнаружено, что сополимеры, в частности, П(ЗГБ-со-ЗГВ), являются термически нестабильными при температурах выше 170°C и термически стабильными при температурах ниже 160°C, а литьевое формование П(ЗГБ) и П(ЗГБ-со-ЗГВ) при температуре от 135 до 160 ° С снижает молекулярную массу на 4–53% [20].

Известно, что присутствие влаги, остатков ферментационной среды, кислорода, металлов и щелочных катализаторов усиливает термическую деградацию. Кроме того, гели, черные вкрапления и пожелтение образуются, когда полимер подвергается воздействию слишком высоких температур. Эти материалы гигроскопичны и чувствительны к влаге, поэтому существует необходимость следить за температурой расплава, скоростью шнека, скоростью впрыска и правильностью сушки [14].

Хотя биоразлагаемые полимеры являются полукристаллическими и имеют низкие температуры плавления, они кристаллизуются достаточно медленно, имеют тенденцию прилипать к металлическим поверхностям во время обработки и поглощать влагу при воздействии окружающего воздуха. Гигроскопичность биополимеров делает необходимой их предварительную сушку перед переработкой в экструдере во избежание падения молекулярной массы, вязкости расплава, а также увеличения вероятности образования неоднородных и хрупких деталей. Однако слишком высокая температура сушки может привести к тому, что материал станет мягким и будет застревать в загрузочном бункере [14].

На настоящий момент существует не так много работ, посвященных экструзии ПГА, а из тех, что существуют, большинство посвящены не столько экструзии чистых ПГА, сколько экструзии смесей на их основе. Это, опять же, связано с термической нестабильностью ПГА в процессе экструзии, поэтому многие авторы делают попытки улучшить термические свойства экструдированного материала добавлением более термически стабильных полимеров. Так, сразу несколько работ посвящены исследованию экструзии композитов на основе ПГА с добавлением другого биоразлагаемого, но более термостабильного полимера.

Например, в работе [21] было исследовано влияние различных сшивающих агентов на физико-химические свойства композитных пленок на основе ПГА и гидроксипропилфосфата крахмала (HPDSP), полученных экструзией с раздувом. Четыре типа сшивающих агентов с мультикарбоксильной или мультигидроксильной структурой были использованы при получении композитных пленок. Результаты сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показали, что пленки с добавлением лимонной кислоты, адипиновой кислоты и буры имеют более целостную и однородную текстуру, чем пленки с борной кислотой. Дифракция рентгеновских лучей показала, что добавление сшивающих агентов приводит к образованию интеркалированных структур в полимерной матрице. Пленки с борной кислотой демонстрировали высокое сопротивление растяжению, в то время как пленки с добавлением лимонной кислоты в качестве сшивающего агента показала наибольшее удлинение при разрыве. Инфракрасный анализ с Фурье-преобразованием подтвердил участие сшивающих агентов в межмолекулярных взаимодействиях, обеспечивающих соединение ПГА с гидроксипропилфосфатом крахмала.

В исследовании [22] авторы показали, что коммерчески значимые механические свойства композитов на основе П(ЗГБ-со-ЗГВ) и древесины (с содержанием древесины 10, 20, 30 и 40%), полученных экструзией при температурах до 190 °С, могут быть достигнуты путем регулирования скорости шнека и скорости подачи, и, следовательно, времени пребывания экструдата в экструдере. У исследованных композитов было достигнуто увеличение модуля упругости на 73% по сравнению с чистым П(ЗГБ-со-ЗГВ). Однако было обнаружено снижение молекулярной массы как чистого П(ЗГБ-со-ЗГВ), так и композитов на его основе при увеличении времени пребывания экструдата в экструдере.

В работе [23] П(ЗГБ) смешивали в расплаве с поли(ε-капролактоном) (PCL) в соотношении 75/25 путем реактивной экструзии с различным содержанием дикумилпероксида (DCP) в диапазоне 0–1 мас.%. Было показано увеличение удлинения при разрыве на 91% для смеси П(ЗГБ) / PCL при добавлении 1 мас. % по сравнению со смесью без добавки. Кроме того, в смеси П(ЗГБ) / PCL с добавлением 1 мас. % DCP было отмечено заметное уменьшение размера частиц доменов, богатых PCL, случайно распределенных в

П(ЗГБ). Также выявили улучшение межфазной адгезии между П(ЗГБ)- и PCL-богатыми фазами с заметным уменьшением промежутков между ними. Добавление 1 мас. % DCP также способствовало снижению степени кристалличности П(ЗГБ) на 14% в смеси.

Работы, исследующие влияние экструзии на чистые ПГА, зачастую выявляют существенные недостатки данного материала, затрудняющие его успешную переработку. В работе [19] оценивалось влияние нескольких циклов переработки на экструдере на свойства П(ЗГБ). Тепловые и механические свойства материала измеряли после каждого цикла экструзии и отмечали изменения структуры и молекулярной массы полимера. В частности, у П(ЗГБ) авторы отметили потерю прочности на разрыв более чем на 50% в третьем цикле экструзии, но это снижение механических свойств было значительным уже во втором цикле – 40%. Также было отмечено увеличение степени кристалличности уже от первого ко второму циклу экструзии. При этом каких-либо существенных изменений в полимерных структурах, связанных с образованием новых химических групп обнаружено не было. Более того, данные ТГА выявили снижение термостабильности П(ЗГБ) с увеличением циклов экструзии. Для предотвращения выявленных изменений, авторы статьи предлагают смешивать вторичные П(ЗГБ) с первичным или включать стабилизаторы в полимерный состав для контроля его разложения во время переработки.

В работе Pachekoski et al. [24] авторы выполнили исследование характеристик П(ЗГБ) до и после процессов экструзии и литья под давлением с целью выяснить, как температура и другие условия экструзии и литья под давлением влияют на разложение полимера. В результате подвергшиеся переработке образцы показали увеличение индекса текучести расплава, снижение температуры динамической кристаллизации и уменьшение молярной массы, что свидетельствует о некоторой деградации материала. Снижение молярной массы после обработки, прогнозируемое с учетом только термического разложения, было рассчитано в зависимости от кинетических параметров, таких как постоянное термическое разложение и время пребывания во время промышленной обработки. Было обнаружено, что реальное уменьшение молярной массы было выше теоретического значения, что указывает на важный вклад сдвига полимерных цепей при переработке при деградации ПОБ. Также результаты показали снижение полидисперсности, пропорциональное уменьшению молекулярной массы, что указывает на систематический и предпочтительный разрыв цепей большой длины. Согласно Kunioka et al. [25], на которых ссылаются авторы, этот разрыв цепи происходит в результате случайного разрыва сложноэфирной связи структуры, генерируя продукты с низкой молекулярной массой и образуя карбоксильные и кротонатные винильные группы.

Твердофазная экструзия серии образцов П(ЗГБ-со-ЗГВ) была проведена Wang et al. с целью получить фундаментальное представление о возможности

их переработки при температурах ниже температуры плавления. Было установлено, что окно экструдиремости П(ЗГБ-со-ЗГВ) находится в диапазоне температур от 135 до 150 ° С, в зависимости от содержания фракции валерата. Было обнаружено, что твердофазные экструдаты показывают дополнительную эндотерму плавления примерно на 15-20 ° С выше их нормальной температуры плавления, причем этот высокотемпературный пик плавления все больше становился доминирующим при более низких температурах экструзии. Вопреки ожиданиям авторов, твердофазноэкструдированные образцы не показали значительной ориентации полимерных цепей вдоль направления экструзии, что могло быть результатом разрушения массы в цилиндре на более мелкие кусочки и их случайного уплотнения в процессе их прохождения через головку. Когда температуру экструзии повышали ближе к температуре плавления, качество экструдатов улучшалось, и это отражалось в улучшении их механических свойств [26].

В статье Nufenus et al. [27] авторы изучили факторы, которые влияют на характеристики П(ЗГБ) с целью разработать масштабируемый метод прядения из расплава (технология, сходная по принципу с экструзией) для производства высокопрочных волокон. Авторы исследовали образец чистого полимера, а так же образцы с добавлением пластификатора трибутил цитрата (ТВС) и нуклеирующего агента нитрида бора (BN), которые были получены методом экструзии. Для всех экструдатов наблюдалось систематическое снижение среднemasсовой молекулярной массы и полидисперсности по отношению к их основным материалам, что подтверждает термомеханическое разложение полимера экструзией из расплава. Как более продолжительное время, так и более высокие температуры предварительной обработки вызывали постепенное снижение среднemasсовой молярной массы и полидисперсности, причем относительное снижение полидисперсности является наиболее сильным в случае полимера без добавок, где начальное значение довольно высокое. Кроме того, авторы отметили, что в сравнении с исходным порошком полимера, образцы, полученные при помощи двухшнековой экструзии показывали меньшие значения молекулярной массы. Это, вероятно, связано с тем, что процесс экструзии вызывает заметное снижение молекулярной массы и численное уменьшение полидисперсности, поскольку в экструдере сдвиг может локально повысить температуру расплава на 10–15 ° С, что еще больше способствует деградации и, как следствие, снижению прочности на разрыв [28]. Сравнение температур плавления показывает, что присутствие пластификатора ТВС снижает температуру плавления материалов почти на 15 ° С по сравнению с полимером без него. Снижение T_m увеличивает окно переработки и прядения из расплава, учитывая естественную близость точки плавления и температуры разложения П(ЗГБ). Добавление BN к П(ЗГБ) уменьшило кристаллизацию полимера после последовательного нагрева и охлаждения по сравнению с полимером без добавления BN. Это связано с тем, что этот нуклеирующий агент препятствует зародышеобразованию и последующей кристаллизации.

Таким образом, авторы обнаружили, что нуклеирующие агенты контролируют и стабилизируют кристаллизацию, в то время как пластификаторы гасят колебания вязкости и позволяют снизить температуру переработки, что приводит к уменьшению термического разложения (потери молекулярной массы) [27].

1.4 Биодegradация ПГА

1.4.1 Механизмы биодegradации

Одним из главных преимуществ ПГА перед традиционными полимерами является их способность к полному аэробному разложению до простых конечных продуктов, которые впоследствии беспрепятственно могут включаться в глобальный круговорот веществ. В природной среде биодеструкции подвергаются практически все полимерные материалы, однако для большинства из них скорость разрушения чрезвычайно низка. Она зависит от природы полимера и от наличия пластификаторов или наполнителей в составе полимерного материала. В естественных условиях полимеры, по структуре подобные природным (производные целлюлозы, хитина, модифицированный крахмал, ПЛА, ПГА, ПГК и др.), относительно легко разлагаются и минерализуются микроорганизмами. Часть продуктов разложения таких полимеров вступает в реакции гумификации, образования остатков с почвенным и другим природным веществом [29].

Определение срока службы биоразлагаемых полимеров начинается с определения механизмов, за счет которых происходит биоразложение. Под биодegradацией (синонимы – биоразложение, биодеструкция, биоразрушение) понимают полное разрушение материала в результате биологической активности, например, в результате действия микроорганизмов, таких как бактерии, археи, грибы и водоросли. ПГА-деструкторы, присутствующие в большинстве естественных сред, включая морскую среду, разлагают ПГА как в аэробных, так и в анаэробных условиях [30, 31]. В аэробных условиях конечными продуктами биоразложения являются биомасса, CO_2 и вода, в то время как в анаэробных условиях конечными продуктами выступают биомасса, CO_2 , метан и вода.

Известно, что биодegradация ПГА происходит главным образом за счет эрозии поверхности в результате гидролиза, катализируемого ферментами микроорганизмов [32, 33], что означает, что скорость потери массы объекта ПГА зависит от площади поверхности, доступной для ферментативного воздействия. Свойства полимера, такие как кристалличность, длина боковой цепи, морфология поверхности, а также свойства среды, в которой происходит биоразложение (температура, воздействие ультрафиолета, количество питательных веществ, сила механических воздействий, виды присутствующих бактерий, уровень pH и кислорода), могут влиять на скорость биодegradации [33, 34, 35, 36]. Кроме того, по мере того как происходит биоразложение, поверхность полимера изменяется, образуются поры, и может происходить

сдвиг механизма в сторону разложения по массе и автокаталитического гидролиза, а не просто разрушения поверхности [33, 37]. Все эти факторы действуют совместно, что приводит к сложному взаимодействию, которое влияет на скорость биodeградации (Рисунок 7).

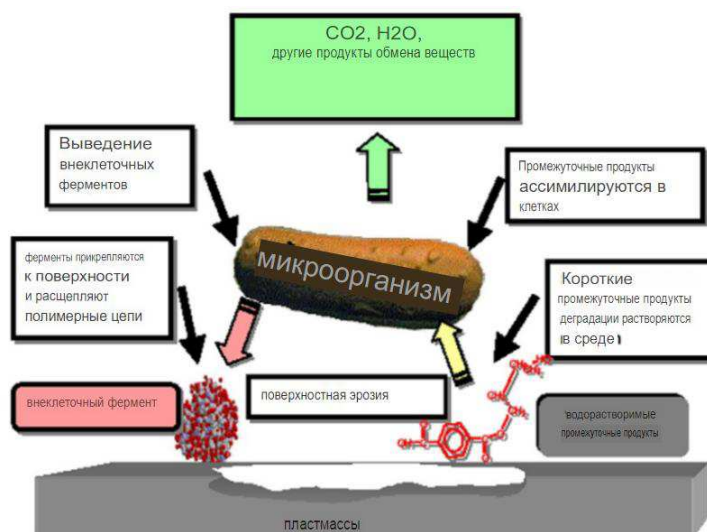


Рисунок 7 – Общий механизм биоразрушения пластика в аэробных условиях [38]

Упрощенный процесс биodeградации состоит из трех ключевых шагов, для каждого из которых может быть рассчитана скорость протекания [39, 40, 41]. Следует отметить, что точные границы между каждым этапом размыты, поскольку они зачастую протекают одновременно и интегративно. Первым этапом происходит образование биопленки и, как следствие, биоповреждение материала. Биопленка представляет собой уникальную и сложную ассоциацию микробов, образованную связанными с поверхностью микробными клетками и продуцируемым ими внеклеточным матриксом, состоящим из полисахаридов, белков и захваченных органических и неорганических частиц [42, 43, 41]. Биопленка образуется не сразу при внесении образца полимера в среду, а с некоторой временной задержкой (в пределах от нескольких дней до нескольких недель), обусловленной тем, что для формирования биопленки и адаптации микробной популяции требуется время. Образование биопленки приводит к изменению химических и физико-механических свойств разрушаемого материала [44, 39].

Следующим этапом является катализируемая ферментами гидролитическая деполимеризация. На данном этапе внеклеточные деполимеразы катализируют расщепление гидролитических связей в полимере, что в конечном итоге приводит к образованию олигомеров, димеров и мономеров. Наконец, поглощение малых молекул клеткой во время биоассимиляции для роста, размножения или минерализации было объединено в отдельный этап. Получающиеся продукты этого процесса – клеточная биомасса и простые конечные продукты, такие как CO_2 в аэробных средах и

метан в анаэробных средах. Установлено, что процессы образования биопленки и гидролитической деполимеризации ограничивают скорость биоразрушения полимерного материала в большей степени, что означает, что влияние любых факторов на минерализацию может считаться менее значительным. Для большей части процесса биоразложения, предполагается, что усвоение и минерализация ПГА происходит быстро. Объединение этого предположения с пониманием того, что ПГА разлагается с помощью механизма поверхностной эрозии, и интерес представляют только макро-изменения целостности полимера в течение длительных периодов времени, приводит к выводу, что скорость биодеградации ПГА можно надлежащим образом оценить как линейную скорость потери массы со временем [45].

1.4.2 Микроорганизмы-биодеструкторы

Биодеструкция полимерных материалов синтетического и природного происхождения может быть вызвана микроорганизмами различных систематических групп, относящихся к грибам и бактериям. Однако чаще всего в разрушении пластиков принимают участие смешанные ассоциации микроорганизмов, характеризующиеся широким разнообразием. К наиболее активным разрушителям полимеров, вызывающим их повреждение и деструкцию относятся несовершенные микроскопические грибы (рр. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Fusarium*). Разрастаясь на поверхности полимерных материалов, мицелии этих видов грибов проникают в их толщу через микротрещины, а выделяемые ими различные ферменты и метаболиты агрессивно воздействуют на отдельные компоненты пластиков [29].

Среди гетеротрофных бактерий наибольшую активность при биодеградации проявляют стрептомицеты, микобактерии, нокардии, псевдомонады и бациллы. Среди конкретных видов микроорганизмов, активно разрушающих ПГА, разные исследователи выделяют *Alcaligenes faecalis* [46, 47, 48], *Pseudomonas stutzeri* [46, 48], *Rhodospirillum rubrum*, *Bacillus megaterium*, *Acinetobacter beijerinckii*, *Pseudomonas lemoignei* [47, 48] и другие. Способность всех этих микроорганизмов разрушать полимерные материалы связывают с разнообразием ферментов и метаболитов, секретируемых ими в окружающую среду. В результате действия внеклеточных ферментов и метаболитов полимерный материал переводится в растворимое состояние, образуются низкомолекулярные продукты распада, которые доступны микроорганизмам в качестве источников энергии и питания. Биодеструкция полимеров может ускоряться под воздействием окисленных форм ионов Fe и Mn и хемолитотрофных микроорганизмов, генерирующих окисленные формы ионов в присутствии кислорода [29].

Относительно видового состава деструкторов ПГА интерес представляет недавнее исследование Sera et al. Авторами была выполнена большая и емкая работа по определению влияния двух температурных режимов (25 и 37°C) на

скорость разрушения и микробиологический состав деструкторов нескольких видов коммерческих биоразрушаемых полимеров, среди которых так же был П(ЗГБ). Эксперимент проводили в лабораторных условиях, в заранее просеянной и очищенной от посторонних частиц почве с известными влажностью, величиной рН и другими показателями в течение 270 дней. В результате эксперимента, уже на 150 сутки для П(ЗГБ) был достигнут высокий уровень биodeградации, и конечные проценты варьировались между 85,8% и 96,4% при 25°C и 71,1% и 93,1% при 37°C. Помимо того, что все исследованные образцы показали более высокую скорость биodeградации при температуре 37 °C, видовой и родовой состав деструкторов также отличался для разных температур. В случае П(ЗГБ) было установлено, что на уровне филума в бактериальных сообществах при обеих температурах преобладают *Proteobacteria*, затем *Actinobacteria*, а при 37 °C так же выделяются *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. В грибных сообществах на уровне филума полностью доминировали *Ascomycota*. На видовом уровне только ограниченное число видов составляло большинство грибных сообществ на П(ЗГБ) при температуре 25°C, причем термофильные грибы *Aspergillus fumigatus* полностью доминировали при температуре 37 °C. В целом, авторы сделали заключение, что грибы играли важную роль в биodeградации П(ЗГБ), что было подтверждено их высоким присутствием на поверхности полимера, которое было зафиксировано при помощи СЭМ [49].

1.4.3 Ферменты разрушения и механизм их действия

Деструкция ПГА происходит под действием ряда ферментов микроорганизмов, главными из которых выступают внутриклеточные и внеклеточные деполимеразы. Механизмы внутриклеточной деградации ПГА в настоящее время изучены не так детально, как синтез и внеклеточная деградация полимера. Тем не менее, этот процесс, вероятно, играет решающую роль в физиологии бактерий, продукции полимера в клетке, его качественного состава [50].

При внеклеточной деградации полимера продукты гидролиза поглощаются микроорганизмами, утилизируются в виде разложенных на составные части соединений в качестве источников питания. Экзodeполимеразы многих бактерий, а также грибов выделены в чистом виде и охарактеризованы. К их общим свойствам следует отнести [50]:

- стабильность при изменяющихся условиях рН, температуры и ионной силы среды;
- относительно низкую молекулярную массу (менее 100 кДа);
- большинство деполимераз состоит только из одного полипептида;
- ПГА-деполимеразы не связываются с анионами таких веществ как ДЕАЕ (нейтральная рН), но близки по свойствам к гидрофобным материалам;
- оптимум рН для них составляет 7,5-9,8;

– большинство ПГА-деполимераз подавляются ингибиторами сериновых гидролаз, которые ковалентно связываются с активным участком серина у сериновых гидролаз.

Гидролиз полимера осуществляется последовательно ферментами П(ЗГБ)-деполимеразой, (D)-гидроксibuтиратдегидрогеназой и ацетоацетил-КоА-синтазой (кетотиолазой). Продуктом деградации П(ЗГБ) являются мономеры, димеры и короткоцепочечные полимеры (D)-3-гидроксibuтирата в соотношении 80–85 %, 15–20 % и следовых количествах, соответственно. Димеры и мономеры (D)-3-гидроксibuтирата, образованные на первом этапе деградации П(ЗГБ), гидролизуются под действием димер-гидролаз (эстераз) до мономеров. Гидролаза не проявляет активности в отношении других эфиров, а также нативных гранул П(ЗГБ) или очищенного П(ЗГБ) и ингибируется диизопропил-фторфосфатом. Мономеры 3-гидроксibuтирата превращаются под действием НАД-зависимой гидроксibuтиратдегидрогеназы в ацетоацетат. Ацетоацетат вступает в трансферазную реакцию с сукцинил-КоА, катализируемую тиофороазой (ацетоацетат : сукцинил-КоА КоА-трансфераза), в результате которой образуется ацетоацетил-КоА. Под действием кетотиолазы ацетоацетил-КоА превращается в ацетил-КоА, который поступает на энергетические и анаболические нужды клетки [50].

Некоторые микроорганизмы имеют ферменты с высокой специфичностью к субстрату и могут разрушать как короткоцепочечные ПГА, так и ПГА со средней длиной полимерной цепи. Тем не менее, большинство ПГА-разрушающих микроорганизмов синтезируют ферменты, специфичные для определенного типа ПГА-субстрата [51]. Следовательно, один и тот же полимер в разных средах может демонстрировать разную скорость биоразрушения [52, 53].

1.4.4 Определение биodeградации

Двумя ключевыми методами определения биodeградации являются физические (за счет определения убыли массы) и спирометрические методы (за счет определения выделившегося CO₂, а также за счет определения биологической потребности в кислороде). Спирометрические методы используются в лабораторных исследованиях для получения полной картины биodeградации полимера, поскольку они позволяют определить, что произошел последний этап минерализации. Спирометрические методы так же являются основными в международных стандартах определения биоразложения [54]. Тем не менее, спирометрические методы не предоставляют информации о темпах биоразложения *in situ*, и поэтому не позволяют рассчитать, как быстро произойдет разрушение материала. В связи с этим получили распространение физические методы, в частности определение убыли массы материала, поскольку они являются более практичными и не требуют специального оборудования, хотя и не лишены некоторых недостатков [53]. Одним из недостатков определения деградации методом расчета убыли массы является

то, что иногда бывает сложно тщательно отмыть образцы после их экспозиции в почве и получить точное значение убыли массы. Так же бывает случаи, когда невозможно использовать измерение убыли массы на более поздних исследования из-за сильного разрушения исследуемого материала, что затрудняет правильную оценку массы образца [55, 56].

1.4.5 Биодegradация ПГА и композитов на их основе в почвенных средах

Были проведены многочисленные исследования по изучению биоразлагаемости биопластиков в различных условиях окружающей среды, таких как почва, компост, морская и другие водные среды. Среди этих исследований основную массу составляют исследования по биоразрушаемости в почвенных средах, что, вероятно, связано с их высоким микробиологическим разнообразием и, следовательно, более высоким потенциалом биоразрушения по сравнению с другими средами. Большое разнообразие микроорганизмов, присутствующих в почве, делает более вероятным обнаружение микробов, способных разрушать биоразлагаемые пластиковые отходы. Поскольку почва может содержать такие микроорганизмы, она считается средой с отличной способностью к разрушению ПГА [57, 53]. Несколько факторов, в том числе тип почвы и ее биоразнообразие, температура, влажность или pH, а также метод измерения, могут влиять на воспроизводимость результатов [58, 53]. Если ПГА является единственным доступным источником углерода для бактерий, испытания могут демонстрировать более высокую скорость биоразрушения по сравнению с таковыми в средах, где имеются другие, более поддающиеся разрушению, доступные источники углерода. Исследование биоразрушения ПГА в условиях естественных сред важно для лучшего понимания последствий пластикового загрязнения [53].

В литературе во многих исследованиях изучалась биоразлагаемость биопластиков ПГА и PLA в почве. В недавней работе с целью улучшения биоразлагаемости биопластика, были исследованы смеси различных биоразлагаемых материалов. В результате авторы обнаружили, что биодegradация биокompозита П(ЗГБ)/PPW-FR (отходы ферментации картофельных очистков) была более эффективной, чем для одного П(ЗГБ), поскольку волокна PPW-FR снижали кристалличность биокompозита на основе П(ЗГБ) [55, 59]. В другом исследовании добавление волокон пустых фруктовых гроздьев пальмы (EFB) увеличило скорость биодegradации биокompозита из П(ЗГБ) [60, 59].

Изменения температуры, pH, влажности и даже микробного состава почвы могут привести к различиям в скорости биоразрушения ПГА [57]. В исследовании, проведенном в почве во Вьетнаме, П(ЗГБ) (была измерена убыль массы) разрушился быстрее, чем П(ЗГБ-со-ЗГВ), что противоречит многочисленным исследованиям, показывающим, что сополимеры разрушаются быстрее гомополимера [61]. Авторы связали эти результаты с

различиями в составе микробных сообществ и разнообразием ПГА-деполимераз у входящих в них микроорганизмов. В этой работе значительное падение молекулярной массы и увеличение полидисперсности ПГА указало на то, что исследованный полимер разложился на более мелкие фрагменты с различной степенью полимеризации [53].

В другой работе при слабокислом рН (около 5,48), скорость биоразрушения ПГА была выше, чем в почве со значением рН близким к нейтральному (6,63), что может быть связано с различиями в микробном разнообразии и активности микроорганизмов. рН почвы действительно может определять микробную активность, поскольку некоторые виды имеют узкие пределы оптимальных значений рН и не могут проживать в кислых средах, а также потому, что рН может влиять на доступность почвенных питательных веществ (таких как, например, аммоний и нитраты), которые необходимы для ряда микробных видов [62, 53]. Однако слабокислые почвы предпочтительны для жизнедеятельности грибов, которые играли основную роль в биоразрушении ПГА в таких почвах, в то время как бактерии были доминирующими в почвах с нейтральным рН [53].

Влажность почвы повлияла на биоразрушение П(ЗГБ), которое, по-видимому, происходило интенсивнее в почвах с более высоким содержанием воды. Водопоглощающая способность исследуемого полимера вероятно также влияет на биоразрушение. Так, композиты из П(ЗГБ-со-ЗГГ) с волокнами кенафа, которые имели более высокое водопоглощение, чем один П(ЗГБ-со-ЗГГ), показали более высокий процент биоразрушения (определенный измерением убыли массы), чем П(ЗГБ-со-ЗГГ) [63, 53].

Другим фактором, влияющим на скорость биоразрушения изделий из ПГА в почве, выступает уровень их погружения. В работе Yew et al. скорость биоразрушения пленок из П(ЗГБ) (определенная через убыль массы) на поверхности почвы была на 50% ниже, чем когда пленки были погружены в почву [64]. Вероятно, это связано с тем, что, находясь на поверхности осадочных отложений, пленки из ПГА разрушаются медленнее, чем когда они погружены в них. Погруженные пленки полностью покрыты почвой и, следовательно, площадь поверхности, подверженной микробному воздействию, больше, в результате чего повышается скорость биоразрушения. Более того, микробные сообщества, населяющие погруженные и не погруженные пленки, различны по своему составу (т.к. первые взаимодействуют как с аэробными, так и с анаэробными микроорганизмами), что также может влиять на скорость биоразрушения [65, 53].

Gallardo-Servantes et al. исследовали биоразрушаемость чистых ПГА и их композитов с добавлением волокон агавы в количестве 20 мас. % в почве смешанного состава (добавлен компост, овечий навоз и куриный помет) в лабораторных условиях. Результаты показали, что биокompозиты достигли более высоких максимальных значений минерализации и, как следствие, разрушались быстрее, чем чистые матрицы, из-за наличия волокон,

разрушающих структуру полимера. Предварительное пропионирование волокон перед добавлением в композит снижало скорость разрушения из-за ограниченной влажности и диффузии микроорганизмов. Также было продемонстрировано, что чистый П(ЗГБ-со-ЗГВ) был минерализован в более значительной пропорции (40%), чем чистый П(ЗГБ) (34%), вероятно, потому, что первый менее кристаллический из-за присутствия мономеров валерата, что позволяет микроорганизмам быстрее разрушать материал [66].

1.5 Использование пластификаторов для улучшения физико-химических свойств ПГА

Пластификаторы – класс низкомолекулярных нелетучих соединений, которые широко используются в полимерной промышленности в качестве добавок. Основная задача пластификаторов – повысить гибкость, эластичность и простоту переработки полимеров за счет снижения температур плавления и стеклования. Международный союз теоретической и прикладной химии (ИЮПАК) определяет понятие «пластификатор» как «вещество или материал, включенный в другой материал (пластик или эластомер) для увеличения его гибкости, удобоукладываемости или растяжимости». Частными эффектами пластификаторов являются уменьшение твердости, плотности, вязкости и электростатичности полимера, увеличение гибкости цепи полимера, сопротивления разрушению и диэлектрической постоянной. Изменение степени кристалличности, оптической прозрачности, электропроводности, устойчивости к биологической деградации также являются эффектами пластификации [67].

Особенности макромолекулярной структуры ПГА обуславливают ухудшение со временем физических и механических свойств полимеров. Для предотвращения этого ухудшения применяются различные подходы, одним из которых является добавление пластификаторов в раствор полимера. Такой подход позволяет улучшить свойства полимеров и изделий из них в результате инициации вторичной кристаллизации. Кроме того, пластификаторы оказывают влияние на реологические свойства расплавов полимеров, тем самым облегчая их переработку [68].

Установлено, что для П(ЗГБ) и ПЗГВ-со-П(ЗГБ) в качестве пластификаторов могут быть использованы: 1) высококипящие эфиры ряда основных кислот (фталаты, изофталаты, цитраты, фумараты, глютамат, фосфаты или фосфиты); 2) высококипящие эфиры полиоксиспиртов, особенно, гликоля, полигликоля и глицерина и 3) ароматические сульфонамиды [68].

Одними из самых эффективных пластификаторов для П(ЗГБ) и П(ЗГБ)-со-П4ГВ считаются глицеролтриацетат (триацетин), ацетил-3-N-бутилцитрат, ди-N-бутилфталат [68, 69]. Добавление в П(ЗГБ)-пленки додеканола, лауриновой кислоты, трибутирина или трилаурина также вызывает сильный эффект пластификации. В одной из работ было показано, что

вышеперечисленные добавки вызвали изменения в структуре пленок из П(ЗГБ), уменьшив их температуру стеклования и температуру холодной кристаллизации за счет улучшения подвижности молекул в аморфной фазе. Тот же эффект наблюдался в пленках П(ЗГБ) и при добавлении биоразрушаемого пластификатора ди-N-бутилфталата [67].

В работе Wang, et al. диоктилфталат, диоктилсебацинат и ацетил трибутилцитрат были исследованы на предмет пластифицирующих свойств по отношению к П(ЗГБ). Только добавление ацетилтрибутилцитрата привело к значительному снижению температуры стеклования и улучшило термические характеристики полимерной пленки, но в то же время, механические свойства материала улучшились незначительно. Также было установлено, что диоктилсебацинат по отношению к П(ЗГБ) является скорее мягчителем, а не пластификатором, и оказывает влияние только на скорость кристаллизации, но не на ее степень. Добавление диоктилфталата также показало некоторое изменение механических и термических свойств полимера в область эластомера, однако диоктилфталат был признан непригодным для пластификации из-за своей токсичности [70].

Baltieri, et al. в своей работе исследовали влияние четырех типов пластификаторов (диоктилфталат (ДОФ), диоктиладипинат (ДОА), триацетин (ТАГ) и полиадипат (ПА)) на тепловые и механические свойства П(ЗГБ). Пластификаторы были протестированы по отдельности и в виде смесей, их процентное содержание варьировало от 5 до 30% от массы полимера. Лучший результат был получен при использовании ТАГ в количестве 30%, а также при применении смеси 20% ПА с 10% ТАГ, в то время как ДОА оказался абсолютно неэффективным, а ДОФ, с повышением его содержания, делал полимер более хрупким [71]. Однако следует отметить, что пластификатор ТАГ имеет существенный недостаток: пластификатор достаточно эффективен, так как его пластифицирующее действие основано на увеличении подвижности цепи полимера, но его высокая летучесть обуславливает его быстрое испарение как в процессе переработки, так и в процессе хранения готового полимера, что приводит к постепенному ухудшению свойств полимера [68].

Исследованы тепловые свойства смесей П(ЗГБ) с PEG400 в различных пропорциях (2, 5, 10, 40%), приготовленных с применением растворной технологии. В этих смесях наблюдалось увеличение удлинения при разрыве приблизительно до четырех раз против изначального удлинения при разрыве П(ЗГБ) и сокращения предела прочности. Данные ДСК показали уменьшение температуры плавления системы П(ЗГБ)/PEG по сравнению с чистым П(ЗГБ). На основе этих результатов авторы классифицировали PEG400 как один из пластификаторов для П(ЗГБ) [69].

В другой работе изучили влияние четырех пластификаторов (соевое масло, эпоксирированное соевое масло, дибутилфталат и триэтилцитрат) на механические и термические свойства полимерных пленок из сополимера 3-гидроксивалерата с 3-гидоксибутиратом (П(ЗГБ)-co-ПЗГВ), отношение

полимера к пластификатору в составе пленок было 80 к 20. В результате исследования было установлено, что наилучшее влияние на температуру стеклования данных полимерных пленок оказали триэтилцитрат, дибутилфталат и эпоксицированное соевое масло. Неэпоксицированное соевое масло не оказало никакого эффекта на температуру стеклования и было признано неэффективным для П(ЗГБ)-со-ЗГВ пластификатором. Что касается механических свойств, то улучшение удлинения на разрыв и ударной вязкости показали пленки из смесей сополимера с триэтилцитратом и дибутилфталатом. Эффективность двух последних также была подтверждена исследованием их поверхности с помощью СЭМ и расчетом параметров растворимости [72].

Достаточно подробное исследование влияния пластификаторов на структуру П(ЗГБ) была проделана Panaitescu с коллегами. В качестве исследуемых пластификаторов были выбраны уже упомянутые выше ацетилтрибутилцитрат и эпоксицированное соевое масло, а также PEG4000 и PEG6000. Морфологическое исследование показало, что и кристаллическая структура, и морфологическая организация П(ЗГБ) претерпевали различные изменения в зависимости от типа пластификатора. Например, эпоксицированное соевое масло приводит к наилучшему механическому поведению с точки зрения более высокого удлинения при разрыве почти без изменения прочности на растяжение; оно также задержало процесс разложения П(ЗГБ). Добавление эпоксицированного соевого масла привело к увеличению размера кристаллитов и увеличению межплоскостных расстояний в П(ЗГБ), что отражает как взаимодействие П(ЗГБ) и эпоксицированного соевого масла (по их карбоксильным / гидроксильным и эпоксидным группам), так и включение молекул масла в межламеллярную аморфную фазу П(ЗГБ). Ацетилтрибутилцитрат, с высокой полярностью и низкой молекулярной массой, вызывал наиболее заметный пластифицирующий эффект. Это было отражено в уменьшении температуры плавления, вязкости, кристалличности и размера кристаллов и образовании небольших сферолитов, что было обусловлено более легким проникновением АТБЦ между полимерными цепями. Также было отмечено увеличение удлинения при разрыве и снижение предела прочности и модуля упругости. Пластификаторы ПЭГ-типа оказывали промежуточное действие: PEG6000 в большей степени проявлял себя как полимерный модификатор, улучшая термическую стабильность и кристаллизацию. В целом, исследование показало, что можно адаптировать реологические, термические и механические свойства коммерческого П(ЗГБ) путем добавления пластификатора в небольших количествах. Выбирая определенный пластификатор, можно также контролировать морфологию и свойства П(ЗГБ) для конкретного применения [73].

Интерес представляет работа Mangeon с коллегами по применению терпенов в качестве пластификаторов. Природные терпены линалоол, гераниол и геранилацетат в количестве от 10 до 20 мас. %, были смешаны с П(ЗГБ), чтобы оценить их влияние на структурные и механические свойства П(ЗГБ).

Измерения ДСК показали снижение температуры стеклования с 8,5 до -13 ° С при добавлении 20% геранилацетата, что свидетельствует о наличии эффекта пластификации. Этот эффект коррелировал с уменьшением степени кристалличности с 57 до 36 %. Кроме того, в присутствии 20 мас. % геранилацетата, было получено увеличение удлинения при разрыве пластифицированного П(ЗГБ) в более чем 650 раз, по сравнению с чистым П(ЗГБ), в сочетании с уменьшением модуля Юнга. Динамический механический анализ также показал, что использование терпенов в качестве добавок способствует снижению модуля накопления и температуры стеклования. Эффект более выражен при добавлении геранилацетата из-за присутствия у него сегмента, несущего сложноэфирную группу, которая увеличивает свободный объем и молекулярную подвижность [74].

Таким образом, разнообразие пластификаторов дает большие возможности для изменения свойств ПГА, что в перспективе делает возможным получение биоразрушаемого материала со свойствами традиционных полимеров.

2 Материалы и методы

2.1 Материалы исследования

В качестве материала исследования выбран гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты – поли-3-гидроксибутират (далее – П(ЗГБ)). Полимер обладал следующими характеристиками: $M_n = 723 \pm 6,0$ кДа; $T_{пл} = 187,7^\circ\text{C}$; $C_x = 76 \pm 1,2$ %.

Пластификатор триацетин («Acros organics», Германия) добавляли к П(ЗГБ) для снижения температур плавления и кристаллизации. Плотность – 1,16 г/мл; $T_{кип} = 258^\circ\text{C}$; $M = 218,21$.

Дихлорметан использовали в качестве растворителя для ПГА. Охлажденный этиловый спирт использовали для осаждения растворов ПГА (3 части спирта к 1 части раствора).

В работе использовали два состава для получения гранул: №1 – П(ЗГБ) чистый, №2 – П(ЗГБ) + 15 % триацетина.

2.2 Синтез и выделение поли-3-гидроксибутирата

Бактерии *Cupriavidus eutrophus B-10646* выращивали в периодическом двустадийном режиме, разработанном ранее для синтеза ПГА [75]. Посевной материал получали путем ресуспендирования музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде. Музейную культуру выращивали в жидкой солевой среде Шлегеля при стартовой концентрации глюкозы 10 г/л. Для выращивания бактерий за основу принята среда следующего солевого состава: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9,1 г/л; KH_2PO_4 – 1,5 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г/л; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025 г/л и сбалансированная кислотнo-солевая среда [68]. Источником железа служил раствор железа лимоннокислого (5 г/л), который вводят из расчета 5 мл/л. Микроэлементы вводили по прописи Хоагганда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор содержит: H_3BO_3 – 0,288 г/л; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,030 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176 г/л; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,050 г/л; NiCl_2 – 0,008 г/л. В качестве источника азота использовали мочевины. Сведения о сырье и материалах, используемых в процессе культивирования приведены в Таблица 1.

Таблица 1 – Сведения о сырье и материалах

Наименование материала	Нормативная документация
Глюкоза ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	ГОСТ 975-88
Натрий фосфорнокислый двузамещенный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	ГОСТ 4172-76
Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4)	ГОСТ 4198-75
Магний сернокислый ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	ГОСТ 4523-77
Железо лимоннокислое ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	ТУ6-09-01719-87
Купорос медный ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	ГОСТ 19347-99

Продолжение Таблицы 1

Наименование материала	Нормативная документация
Марганец хлористый ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	ГОСТ 612-75
Никель хлористый ($NiCl_2$)	ГОСТ 4038-79
Карбамид ($(NH_2)_2CO$)	ГОСТ 6691-77
Купорос цинковый ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	ГОСТ 8723-75
Кобальт хлористый ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	ГОСТ 4525-77
Кислота борная (H_3BO_3)	ГОСТ 9656
Дихлорметан (CH_2Cl_2)	ГОСТ 9968-86
Гексан (C_6H_{14})	ТУ 2631-003-05807999-98
Бутандиол-1,4 ($C_4H_{10}O_2$)	ТУ 6-09-2822-78

Культивирование бактерий проводили в стерильном режиме на опытном производстве Сибирского федерального университета, с использованием ферментёров фирмы Bioengineering (Швейцария) - объем аппарата 30 л (рабочий объем от 5 до 20 л) и 150 л (рабочий объем от 10 до 110 л). В ходе экспериментов периодически отбирали пробы культуры (каждые 5 ч). Контроль оптической плотности и азота, определение содержания и состава полимера, определение сухой биомассы клеток.

Периодически отбирали пробы культуры и измеряли их оптическую плотность на фотоколориметре, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и $\lambda = 440$ нм (длина оптического пути $d = 1$ мм).

Биомассу бактерий в культуре определяли весовым способом. Для этого аликвоты бактериальной суспензии объемом 10-25 мл, центрифугировали 7 мин. при 6000g на центрифуге Eppendorf. Затем дважды отмывали клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы сушили при температуре 105°C в сушильном шкафу в течение суток, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Биомассу бактерий определяли, как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.

Два основных шага для получения полимера, это, во-первых, изменение проницаемости клеточных мембран, что позволит высвободить и растворить молекулы ПГА. После выделения полимера, следует осаждение ПГА в виде осадка и его фильтрация. Извлечение полимера с помощью растворителей проходит без потери его качества за счет повышения проницаемости клеточной мембраны и последующей сольюбилизации ПГА. Добавление к дихлорметану этилового спирта и проведение трёхкратной экстракции с нагреванием повышает выход ПГА. Процесс подготовки биомассы для дальнейшего извлечения из нее полимера проходит в несколько стадий:

1) Очищение биомассы от белковых фракций и липидов этанолом. Экстракция этанолом проводится с использованием обратного холодильника на магнитной мешалке Heidolph MR Hei-Standard (Германия).

2) Фильтрация биомассы на воронке Бюхнера с использованием склянки Бунзена и вакуумного насоса Millipore WP6122050 (Billerica, США).

3) Экстракция биомассы органическим растворителем (дихлорметаном) проводится путем кипячения при перемешивании на магнитной мешалке с обратным холодильником про 40 °С.

4) Фильтрация экстракта с помощью воронки Бюхнера, склянки Бунзена, вакуумного насоса и бумажного фильтра «красная лента». Оставшийся шрот после экстракции анализируется на остаток полимера, жирных кислот. При низкой концентрации полимера шрот утилизируется, при высокой – проводится повторная экстракция дихлорметаном.

5) Осаждение экстракта этанолом (соотношение «растворитель : биомасса» определяется номером реализуемого эксперимента в плане) и дальнейшая фильтрация полимера от осадителя.

2.3 Получение полимерных гранул методом влажного гранулирования

Процедура получения гранул для экструзии состояла из нескольких этапов. Сначала 20 г полимера в виде порошка растворяли в 400 мл дихлорметана (5 % раствор) и ставили на мешалку с подогревом (40°C) до полного растворения полимера. Далее полученный раствор осаждали по частям в охлажденном этаноле, используя в общей сложности 1,2 л осадителя. Полученный осадок тщательно перемешивали и ставили в холодильник на сутки для достижения полного осаждения. Затем полученный осадок при помощи вакуумного насоса по частям фильтровали через воронку Бюхнера с использованием фильтра «белая лента» для получения влажной полимерной массы. Для получения полимерного состава № 2 в полученный осадок дополнительно добавили 2,6 мл триацетина (15 % от массы полимера) и тщательно перемешали вручную. Далее из полученной полимерной массы изготавливали гранулы при помощи ручного гранулятора Fimar (Италия). Гранулы помещали на металлические подносы и высушивали при комнатной температуре в течение суток. Полученные гранулы представлены на Рисунке 8, где под №1 представлены гранулы из чистого П(ЗГБ) и под №2 – гранулы из П(ЗГБ) с добавлением 15 % триацетина. Размер гранул варьировал от 3 до 5 мм.



Рисунок 8 – Гранулы, полученные методом влажного гранулирования: №1 – П(ЗГБ), №2 – П(ЗГБ) + 15 % триацетина

Гранулы исследуемых составов не отличались по визуальным и структурным характеристикам. Гранулы обоих составов были белого цвета, без каких-либо вкраплений, плотной однородной консистенции. Исходя из этого, можно сделать вывод, что добавление триацетина не влияет на внешний вид гранул, полученных методом мокрого гранулирования. Плотность полученных гранул составила: для №1 – $\rho = 3,0 \pm 0,1$ г/мл; для №2 – $\rho = 3,0 \pm 0,1$ г/мл. Полученные таким образом гранулы далее использовали для экструзии.

2.4 Получение полимерных гранул методом экструзии

Полученные методом влажного гранулирования гранулы с известной плотностью далее использовали для получения полимерного прутка на одношнековом экструдере Brabender Kompaktextruder KE19 (Германия) с подбором режима экструдирования (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Одношнековый экструдер Brabender Kompaktextruder KE19 с линией транспортера

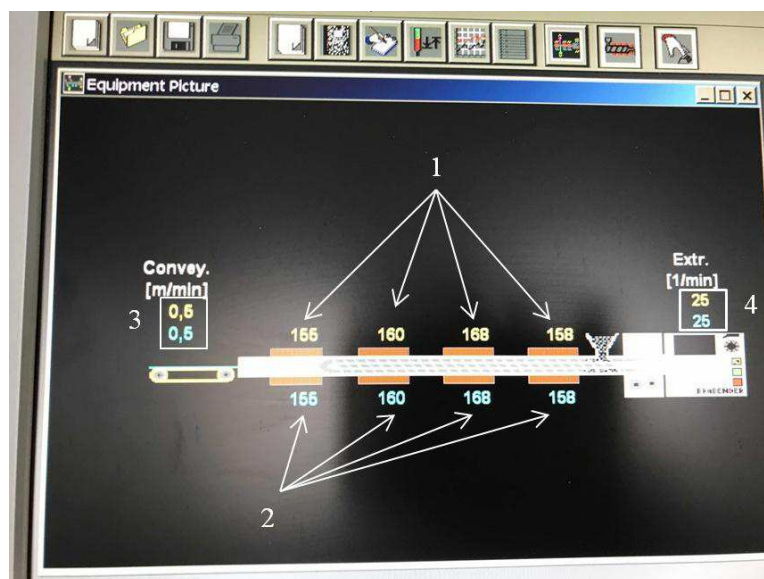


Рисунок 10 – Окно управления экструдером Brabender Kompaktextruder KE19 в программе WINEXT (пояснения в тексте)

На управляющем компьютере в программном обеспечении WINEXT для Windows устанавливали значения температурного профиля экструзии в 4 зонах (Рисунок 10, 1), ориентируясь на литературные данные [19, 76, 77]. Выбранные значения температур, при которых были получены удовлетворительные продукты экструзии, представлены в Таблице 2. Кроме этого, регулировали скорость вращения шнека (Рисунок 10, 4) и скорость движения транспортера (Рисунок 10, 3).

Таблица 2 – Температурные режимы при экструзии ПГА

Образец	Температура в зонах нагрева экструдера				Скорость вращения шнека (вращений\минута)
	Зона 1	Зона 2	Зона 3	Зона 4	
П(ЗГБ)	160	168	170	165	30
П(ЗГБ) + 15 % триацетина	158	165	155	150	30

Полимер в виде гранул засыпали в загрузочный бункер. Через некоторое время из сопла экструдера выходил полимерный пруток, который поступал на движущийся транспортер.

Ориентируясь на цвет (потемнение прутка), консистенцию (хлопьевидные включения, рассыпчатость) и структуру прутка (наличие пузырей), регулировали температуру зон температурного профиля и скорость экструзии для исправления дефектов прутка прямо в ходе процесса экструзии. При уменьшении температуры наблюдалось неравномерное плавление гранулята, вследствие чего округлый полимерный пруток выходил с не расплавленным полимером. При увеличении температуры наблюдалась

деградация полимерного материала, сопровождавшаяся потемнением полимерного прутка. После экструзии всех образцов, полученные прутки (Рисунок 11) визуально сравнивались на наличие пузырьков воздуха, равномерность и шероховатость.

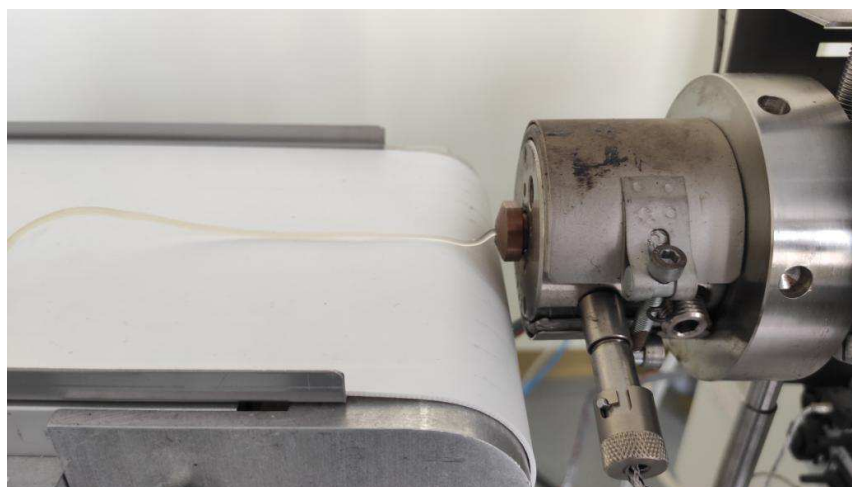


Рисунок 11 – Выход полимерного прутка из сопла экструдера

Полученный экструзией пруток из П(ЗГБ) имел желтоватый цвет с мелкими белесоватыми вкраплениями, был шероховатым на ощупь, блеск отсутствовал. Пруток был достаточно хрупким, белел на изломе. Пруток из П(ЗГБ) с добавлением 15 % триацетина так же был желтоватого цвета, но без белесоватых вкраплений, гладким на ощупь и блестящим. По сравнению с прутком из П(ЗГБ) без пластификатора, данный пруток не белел на изломе.



Рисунок 12 – Гранулятор Brabender

Полученные полимерные прутки далее гранулировали на автоматическом грануляторе Brabender (Рисунок 12). На данном грануляторе предусмотрено управление скоростью отрезки, а также скоростью съема, что обеспечивает возможность регулирования размера гранул. Измельчение проводили при скорости отрезки 2 м/с.

2.5 Получение полимерных пленок методом полива из раствора

Полимерные пленки получали методом полива разогретого до 50 °С 2 % раствора П(ЗГБ) в хлороформе на обезжиренную поверхность чашек Петри, предварительно добавив в него 34,8 мкл триацетина (15 % от массы полимера) и перемешав ультразвуковым гомогенизатором Misonix Inc S-3000 (США). Пленки высушивали в беспылевом боксе-ламинаре фирмы «Labconco» (США) в течение 48 часов с целью испарения растворителя. В качестве контрольного образца использовалась пленка, полученная тем же методом из 2-% раствора П(ЗГБ) в хлороформе (300 мг полимера на 15 мл растворителя) без добавления триацетина. Толщину пленок измеряли микрометром. С помощью специальной формы высекали диски диаметром 10 мм, которые использовали в экспериментах.

2.6 Исследование свойств полученных пленок и гранул из П(ЗГБ)

2.6.1 Определение плотности полимерных гранул

Определяли плотность гранул методом обмера и взвешивания, описанным в ГОСТ 15139-69 [78]. Для этого несколько полученных гранул одного образца, предварительно взвесив, помещали в мерную пробирку с 15 мл воды и отмечали, на сколько делений поднялся объем воды. Плотность гранул определяли по формуле:

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (1)$$

где m – масса гранулы в граммах, V – объем вытесненной гранулой жидкости в миллилитрах. Полученные данные по каждому образцу статистически обрабатывали и вычисляли стандартную ошибку.

2.6.2 Исследование микроструктуры поверхности

Микроструктуру образцов полученных полимерных пленок и гранул изучали с применением растровой электронной микроскопии (РЭМ-снимков поверхностей) (Hitachi S-5500, Япония). Предварительно образцы покрывали платиной (10 мА, 40 секунд) с помощью установки для напыления Emitech K575X. Размеры пор, образованных в полученных полимерных пленках и гранулах, измеряли на основе полученных снимков при помощи инструментов программного обеспечения ImageJ для Windows.

2.6.3 Инфракрасная спектроскопия (ИК-Фурье)

Для определения характера межмолекулярного взаимодействия между П(ЗГБ) и пластификатором, для установления их взаимной совместимости и для получения информации о степени кристалличности материала сравнивали ИК-спектры полученных образцов пленок и гранул до и после разрушения в почве. ИК-спектры получали с использованием инфракрасного спектрометра Bruker (Германия).

2.6.4 Дифференциально-сканирующая калориметрия (ДСК)

Термический анализ образцов пленок и гранул с пластификатором и без был проведен с использованием дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 («METTLER TOLEDO», Швейцария). Исследуемый образец помещали в алюминиевый тигель и сжимали перед измерением. Каждый образец измеряли не менее 3 раз. Образцы подвергались однократному нагреву от -20°C до 320°C . В результате были получены термограммы, отражающие температуры перехода из одного агрегатного состояния в другое, в частности, температуры кристаллизации ($T_{\text{кр}}$), плавления ($T_{\text{пл}}$) и термического разложения ($T_{\text{дегр}}$).

2.6.5 Исследование динамики деградации пленок и гранул из П(ЗГБ) и из П(ЗГБ)/триацетин в лабораторных почвенных микроэкосистемах

Деградацию гранулированных форм исследовали в лабораторных почвенных микроэкосистемах. Почва для эксперимента была отобрана с опытных полей учебного хозяйства «Миндерлинское» ФГБОУ ВО «Красноярский государственный аграрный университет» (п. Борск, Сухобузимский район, Красноярский край). Почва представляет собой чернозем выщелоченный, среднемощный, легкоглинистый с нейтральной реакцией почвенного раствора (рН - 7,2). Почва отличается высоким содержанием гумуса (6,9 %), очень высокой суммой обменных оснований (57,5 ммоль/100г), низкой обеспеченностью нитратным азотом (4,74 мг/кг), очень низкой – аммонийным азотом (0,50 мг/кг), средней – подвижным фосфором (175,8 мг/кг), очень высокой – обменным калием (291,0 мг/кг). Предварительно взвешенные образцы исследуемых гранул в мешочках из органзы в четырех повторностях помещали в пластиковые контейнеры со 180 г почвы на глубину не более 1 см. Контейнеры с содержимым инкубировали в термостате воздушном ХТ-3/70 (ЗАО «Пять океанов», Беларусь) при температуре 26°C и влажности 60 % (Рисунок 13). Эксперимент проводился в течение 6 месяцев с экспериментальными точками в конце каждого месяца (всего 6 точек). По достижении каждой из шести точек часть образцов изымали из почвы, аккуратно очищали без потери частей гранул в водопроводной воде и высушивали в термостате при 32°C и проводили контрольное взвешивание образцов для установления процента убыли массы. Процент убыли массы определяли по формуле:

$$\Delta m = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad (2)$$

где m_1 – начальная масса образца до помещения в почву (г), m_2 – масса образца после экспозиции в почве в течение определенного времени (г).



Рисунок 13 – Экспериментальные почвенные микроэкосистемы в термостате

Аналогично была исследована деградация полимерных пленок из П(ЗГБ) в почвенных микроэкосистемах. Почва, использованная в эксперименте, была взята из полевого стационара «Медерлинское» Красноярского государственного аграрного университета, лесостепь (56° северной широты, 92° восточной долготы). Это чернозем тяжелосуглинистого гранулометрического состава, плотность от 0.80 до 1,24 г/см³; рН 7.3 с высоким содержанием аммонийного (35 мг/кг) и нитратного (9.2 мг/кг) азота. Содержание фосфора составляло 280; калия 250 мг/кг. Предварительно взвешенные образцы полученных полимерных пленок в виде круглых форм диаметром 13 мм помещали в пластиковые контейнеры со 150 г почвы. Далее в течение эксперимента поддерживали постоянную влажность почвы на уровне 60 %. Эксперимент проводился в течение четырех недель с экспериментальными точками в конце каждой недели. По достижении каждой из четырех точек часть образцов изымали из почвы, аккуратно очищали без потери частей пленок в водопроводной воде, высушивали в термостате при 32 °С и проводили контрольное взвешивание образцов для установления процента убыли массы. Процент убыли массы определяли по формуле (2).

2.6.6 Определение численности почвенных деструкторов пластифицированных полимерных гранул

Образцы гранул без пластификатора и с пластификатором после экспозиции в почве к концу каждой точки эксперимента использовали для определения численности их деструкторов методом посева на твердые микробиологические среды. Для получения посевной суспензии изъятые гранулы, не промывая и не очищая, помещали в колбы со 100 мл стерильной

воды и взбалтывали. Далее из обеих суспензий была получена серия разведений (до 10^6). Для контроля динамики численности деструкторов также выполняли посевы суспензий из почвы, в которой проходила экспозиция. Для этого 10 г исследуемой почвы помещали в колбы со 100 мл стерильной воды, взбалтывали и аналогичным, как и для гранул, способом делали серию разведений (до 10^6).

Микробиологический анализ посредством посева суспензий в количестве 0,1 мл на чашку проводили общепринятыми методами на элективные среды, содержащие полимер П(ЗГБ) отдельно для грибов и бактерий для выделения деструкторов (разведения 10^1 , 10^2 и 10^5 , 10^6 , соответственно). Состав сред приведен в Таблица 3.

Таблица 3 – Состав элективных сред для деструкторов ПГА

Среда для грибов-деструкторов ПГА		Среда для бактерий-деструкторов ПГА	
Компонент	Масса (на 1 л), г	Компонент	Масса (на 1 л), г
П(ЗГБ)	5,0	П(ЗГБ)	2,5
NaNO ₃	2,0	KH ₂ PO ₄	4,488
K ₂ HPO ₄	1,0	Na ₂ HPO ₄	4,686
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	NH ₄ Cl	1,0
KCl	0,5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	Цитрат железа	0,05
ZnSO ₄	0,04	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,005
Дрожжевой экстракт	0,1	Дрожжевой экстракт	0,05
Агар	20,0	Гидролизат казеина	0,1
Вода водопроводная	1 л	Агар	20,0
		Вода водопроводная	1 л

Чашки с посевами выдерживали в течение 3-5 суток (для грибов) и 10-14 суток (для бактерий) в термостате при температуре 30°C и 25°C для бактерий и грибов, соответственно. Через 3-14 суток был сделан ручной подсчет выросших колоний и на основании полученных данных были вычислены титры бактерий деструкторов по формуле:

$$X = \frac{a \times b}{c \times d} \quad (3)$$

где a – среднее количество колоний на чашке, b – разведение, из которого сделан высев, c – количество вносимой суспензии (мл), d – масса исследуемой почвы, g (или объём суспензии, мл; или площадь пленки, cm^2).

Образцы пленок из П(ЗГБ) без триацетина и с добавлением триацетина после экспозиции в почве на третью неделю эксперимента также использовали для определения микробиологического состава их деструкторов. Для получения посевной суспензии изъятые пленки не промывая и не очищая, помещали в колбы со 100 мл стерильной воды и взбалтывали. Далее из обеих суспензий была получена серия разведений (до 10^6).

Микробиологический анализ посредством посева суспензий на элективные среды в количестве 0,5 мл на чашку проводили общепринятыми методами по следующей схеме: численность аммонификаторов, прототрофных бактерий, усваивающих минеральный азот и олигонитрофильных и азотфиксирующих бактерий определяли соответственно на мясопептонном агаре (МПА), крахмало-аммиачном агаре (КАА) и на безазотистой среде Эшби из разведений 10^5 и 10^6 в двух повторностях для каждого образца; численность грибов определяли на среде Сабуро из разведений 10^2 и 10^3 в двух повторностях для каждого образца.

Чашки с посевами выдерживали в термостате при температуре $30^\circ C$ (для среды Сабуро – $25^\circ C$) в течение 7 суток. Через 7 суток был сделан подсчет выросших колоний и на основании полученных данных были вычислены титры бактерий каждой группы по формуле (3).

Идентификацию чистых культур микроорганизмов проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии на масс-спектрометре MALDI-TOF (Bruker, Германия).

2.6.7 Исследование молекулярно-массовых характеристик гранул из П(ЗГБ) с пластификатором до и после деградации в почвенных микроэкосистемах

Для исследования молекулярно-массовых характеристик, образцы гранул с массой 10-30 мг растворяли в 2 мл хлороформа и фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (Германия) с использованием калибровочных стандартов Agilent PS-H EasiVial. Находили средневесовую (M_w) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность (D). Расчет проводился в программе Agilent ChemStation for LC System. Работа на хроматографе выполнялась согласно инструкции производителя. По результатам проведенных анализов при помощи пакета Microsoft Office Excel 2010 строили графики изменения молекулярной массы и

поддисперсности в течение всего периода деградации в почвенных микрэкосистемах.

2.7 Построение моделей деградации пленок и гранул

На основании полученных данных о деградации полимерных пленок и гранул из П(ЗГБ) были получены математические модели и выведены константы биоразрушения k с учетом коэффициента аппроксимации R^2 , характеризующие кинетику разрушения исследуемых материалов. Для этого в качестве основы из источников по теме была взята модель первого порядка [79, 80]. Данная модель представляет собой график зависимости натурального логарифма отношения конечной и начальной масс образца от времени, в течение которого происходит деградация. Уравнение модели приведено ниже (4):

$$\ln (m(t)/m^0) = kt \quad (4)$$

где t – время экспозиции (сутки), m^0 – масса образца до экспозиции в почве (мг), m – масса образца после экспозиции в почве в течение t суток, k – константа биоразрушения.

2.8 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам [81] с использованием программного пакета Microsoft Excel 2016 для Windows 8. Все эксперименты проводились в количестве не менее трех повторностей. Для полученных данных рассчитывались средние значения, среднее квадратическое отклонение, стандартная ошибка и доверительный интервал. Все расчеты проводились с учетом уровня значимости $\alpha = 0,05$.

3 Результаты

Изъято 18 страниц

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получена серия пленок из П(ЗГБ) и из П(ЗГБ) с добавлением 15 % пластификатора триацетина. Добавление триацетина в состав пленок из П(ЗГБ) показало эффективность пластификатора в снижении температур кристаллизации и плавления, а также в ускорении разрушения пленок в почвенных микроэкосистемах. Среди деструкторов полученных полимерных пленок с триацетином были определены такие специфические виды как *Aspergillus fumigatus*, *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Streptomyces albus*, *Ps. koreensis*.

На основании вывода об эффективности пластификатора в снижении температур кристаллизации и плавления также была получена серия гранул из П(ЗГБ) и из П(ЗГБ) с добавлением 15 % триацетина. Добавление триацетина в состав гранул из П(ЗГБ) позволило избежать падения молекулярной массы в процессе экструзии, а также ускорило их разрушение в почвенных микроэкосистемах в 6,2 раза по сравнению с гранулами без добавления пластификатора. Значительное разрушение гранул П(ЗГБ)/триацетин было подтверждено данными ИК и СЭМ.

На основании полученных данных о деградации пленок и гранул далее были получены математические модели, характеризующие кинетику разрушения исследуемых материалов. Полученные уравнения характеризовались достаточно высокими значениями коэффициента аппроксимации R^2 , что означает, что модели относительно верно отражают зависимость между параметрами биodeградации.

Среди деструкторов гранул из П(ЗГБ)/триацетин преобладали виды *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas putida*, *Aspergillus fumigatus*, род *Penicillium*. В целом, для гранул П(ЗГБ)/триацетин характерна меньшая численность бактериальных деструкторов по сравнению с гранулами без пластификатора, численность грибных деструкторов при этом сравнительно одинакова для гранул обоих составов. Сравнение численности деструкторов на поверхности гранул и в почве показало, что численность грибных деструкторов находится в пределах одного порядка для гранул обоих составов, в то время как численность бактериальных деструкторов в почве больше, чем на поверхности гранул для гранул П(ЗГБ)/триацетин.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Литвяк, В.В. Перспективы производства современных упаковочных материалов с применением биоразлагаемых полимерных композиций // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – № 2. – 2019.
2. Weng, Y.X. Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions / Y.X. Weng, X.L. Wang, Y.Z. Wang // Polymer Testing. – № 30. – 2011. – С. 372-380.
3. Часть вторая. Все о биоразлагаемых пластиках. Мировой рынок биополимеров [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://ect-center.com/blog/biodegradable-polymers#rec159593979> (дата обращения: 17.04.2021).
4. Биоразлагаемые пластики: текущее состояние рынков и перспективы [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://vestkhimprom.ru/posts/tag/полигидроксибутират> (дата обращения: 17.04.2021).
5. Соловьянов, А.А. Пластики и окружающая среда // Твердые бытовые отходы. – № 8. – 2010. С. 38-41.
6. Sin, L.T. Overview of Biodegradable Polymers and Poly(Lactic Acid) / L.T. Sin, S.T. Bee // Polylactic acid: a practical guide for the processing, manufacturing, and applications of PLA. – William Andrew, 2019.
7. Ермакова, Е.А. Применение инновационных решений в создании экологически чистых упаковочных материалов // Сервис в России и за рубежом. – № 2(49). – 2014. С. 116-121.
8. Pellicer, E. Advances in applications of industrial biomaterials. / E. Pellicer, D. Nikolic, J. Sort, M. Baró, F. Zivic, N. Grujovic, R. Grujic, S. Pelemis // – Springer International Publishing, 2017.
9. Zhong, Y. Biodegradable Polymers and Green-based Antimicrobial Packaging Materials: A mini-review / Y. Zhong, P. Godwin, Y. Jin, H. Xiao // Advanced Industrial and Engineering Polymer Research. – № 3. – 2019. С. 27-35.
10. Narancic, T. Microbial biotechnology addressing the plastic waste disaster / T. Narancic, K.E. O'Connor // Microbial biotechnology. – Т. 10. – № 5. – 2017. С. 1232-1235.
11. Волова, Т.Г. Физико-химические свойства полигидроксиалканоатов различного химического строения / Т.Г. Волова, Н.О. Жила, Е.И. Шишацкая, П.В. Миронов, А.Д. Васильев, А.Г. Суковатый // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2013. – № 7.
12. Крыжановский, В.К. Производство изделий из полимерных материалов: Учеб. пособие. / В.К. Крыжановский, М.Л. Кербер, В.В. Бурлов, А.Д. Паниматченко // – СПб: Профессия, 2004.
13. Удалова, Н.Ю. Разработка технологии и оборудования по модификации полимерных отходов / Н.Ю. Удалова, П.В. Макеев, П.С. Беляев // Современные твердофазные технологии: теория, практика и инновационный

менеджмент. Материалы XI международной научно-инновационной молодежной конференции. –2017. С. 150-152.

14. Ashter, S.A. Chapter 7. Processing Biodegradable Polymers // Introduction to bioplastics engineering. – William Andrew, 2016.

15. Решетников, А. С. Методы изготовления изделий из полимерных материалов / А.С. Решетников, О.В. Ковалевская // Материалы международной научно-практической конференции "Перспектив Свободный-2011". – 2011.

16. Бортников, В.Г. Основы технологии переработки пластических масс. – Ленинград: Химия, 1983.

17. Сабсай, О.Ю. Экструзионно-выдувное формование: Второе рождение // Тара и упаковка. – № 1. – 2000. С. 28 - 30.

18. Виноградов, В.М. Практикум по технологии переработки пластических масс. / В.М. Виноградов, Г.С. Головкин // – М.: Химия, 1980.

19. Rivas, L.F. Reprocessability of PHB in extrusion: ATR-FTIR, tensile tests and thermal studies / L.F. Rivas, S.A. Casarin, N.C. Nepomuceno, M.I. Alencar, J.A.M. Agnelli, E.S.D. Medeiros, A.M.D. Medeiros // Polímeros. –Т. 27. – № 2. – 2017. С. 122-128.

20. Wanc, Y.D. Processing Characteristics and Structure Development in Solid-state Extrusion of Bacterial Copolyesters: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) / Y.D. Wanc, T. Yamamoto, M. Cakmak // Journal of Applied Polymer Science. – Т. 61. – 1996. С. 1957-1970.

21. Sun S., Liu P., Ji N., Hou H., Dong H. Effects of various cross-linking agents on the physicochemical properties of starch/PHA composite films produced by extrusion blowing // Food Hydrocolloids, Vol. 77, 2018. С. 964-975.

22. Vandi, L.J. Extrusion of wood fibre reinforced poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)(PHBV) biocomposites: Statistical analysis of the effect of processing conditions on mechanical performance / L.J. Vandi, C.M. Chan, A. Werker, D. Richardson, B. Laycock, S. Pratt // Polymer degradation and stability. – Т. 159. – 2019. С. 1-14.

23. Garcia-Garcia, D. Improvement of the compatibility between poly (3-hydroxybutyrate) and poly (ϵ -caprolactone) by reactive extrusion with dicumyl peroxide / D. Garcia-García, E. Rayón, A. Carbonell-Verdu, J. López-Martínez, R. Balart // European Polymer Journal. – Т. 86. – 2017. С. 41-57.

24. Pachekoski, W.M. The influence of the industrial processing on the degradation of poly (hidroxybutyrate)-PHB / W.M. Pachekoski, C. Dalmolin, J.A.M. Agnelli // Materials Research. – Т. 2. – № 16. – 2013. С. 237-332.

25. Kunioka, M. Thermal degradation of microbial copolyesters: poly (3 - hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-4 hydroxybutyrate) // Macromolecules. – Т. 7. – № 23. – 1990. С. 1933-1936.

26. Wang, Y.D. Processing characteristics and structure development in solid- state extrusion of bacterial copolyesters: Poly (3- hydroxybutyrate- co- 3- hydroxyvalerate) / Y.D. Wang, T. Yamamoto, M.

Cakmak // Journal of applied polymer science. – Т. 61. – № 11. – 1996. С. 1957-1970.

27. Hufenus, R. Molecular orientation in melt-spun poly(3-hydroxybutyrate) fibers: Effect of additives, drawing and stress-annealing / R. Hufenus, F.A. Reifler, M.P. Fernández-Ronco, M. Heuberger // European Polymer Journal. – № 71. – 2015. С. 12-26.

28. Jaffe, M. Polyester fibers / M. Jaffe, A.J. East // Handbook of Fiber Chemistry (Third ed.). – Boca-Raton: CRC Press, 2007. С. 1-29.

29. Кузнецов, А.Е. Прикладная экобиотехнология: учебное пособие : в 2 т. Т 1. / А.Е. Кузнецов, Н.Б. Градова, С.В. Лушников, М. Энгельхарт, Т. Вайссер, М.В. Чеботаева // – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. С. 432-433

30. Jendrossek, D. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates / D. Jendrossek, R. Handrick // Annual review microbiology. – № 56. – 2002. С. 403–432.

31. Shah, A.A. Biological degradation of plastics: a comprehensive review / A.A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, S. Ahmed // Biotechnology Advances. – № 26. – 2008. С. 246–265.

32. Guerin, P. Degradation of natural and artificial poly[(R)-3-hydroxyalkanoate]s: From biodegradation to hydrolysis / P. Guerin, E. Renard, V. Langlois // Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. Microbiology Monographs. – Berlin: Springer-Verlag, 2010. С. 283-321.

33. Laycock, B. prediction of biodegradable polymers / B. Laycock, M. Nikolik, J.M. Colwell, E. Gauthier, P. Halley, S. Bottle, G. George // Program Polymer Science. – № 71. – 2017. С. 144–189.

34. Deroiné, M. Accelerated ageing and lifetime prediction of poly(3 hydroxybutyrate co 3 hydroxyvalerate) in distilled water / M. Deroiné, A. Le Duigou, Y.M. Corre, P.Y. Le Gac, P. Davies, G. César, S. Bruzard // Polymer Testing. – № 39. – 2014. С. 70–78.

35. Woolnough, C.A. A tuneable switch for controlling environmental degradation of bioplastics: addition of Isothiazolinone to polyhydroxyalkanoates / C.A. Woolnough, L.H. Yee, T.S. Charlton, L.J.R. Foster // PLoS One. – № 8. – 2013. С. 1-10.

36. Kale, G. Compostability of bioplastic packaging materials: an overview / G. Kale, T. Kijchavengkul, R. Auras, M. Rubino, S.E. Selke, S.P. Singh // Micromolecular bioscience. – № 7. – 2007. С. 255-277.

37. Ho, Y.H. Biodegradation of a medium-chain-length polypolyhydroxyalkanoate in tropical river water / Y.H. Ho, S.N. Gan, I.K.P. Tan // Applied Biochemistry & Biotechnology. – Т.1. – № 102. – 2002. С. 337-347.

38. Mueller, R.J. Biodegradability of polymers: regulations and methods for testing // Biopolymers. – Т.10. – 2003.

39. Lucas, N. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques – a review / N. Lucas, C. Bienaime, C. Belloy, M. Queneudec, F. Silvestre, J.E. Nava-Saucedo // Chemosphere. – № 73. – 2008. С. 429–442.

40. Haider, T.P. *Plastics of the future? The impact of biodegradable polymers on the environment and on society* / T.P. Haider, C.Völker, J. Kramm, K. Landfester, F.R. Wurm // *Angewandte Chemie – International Edition*, 2018.
41. Dilkes-Hoffman, L.S. *The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study* / L.S. Dilkes-Hoffman, P.A. Lant, B. Laycock, S. Pratt // *Marine Pollution Bulletin*. – № 142. – 2019. C. 15–24.
42. Donlan, R.M. *Biofilms: microbial life on surfaces* // *Emerging Infectious Diseases*. – № 8. – 2002. C. 881–890.
43. Flemming, H.C. *Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials* // *Polymer Degradation Stability*. – № 59. – 1998. C. 309–315.
44. Woolnough, C.A. *Surface changes in polyhydroxyalkanoate films during biodegradation and biofouling.* / C.A. Woolnough, T. Charlton, L.H. Yee, M. Sarris, L.J.R. Foster // *Polymer International*, № 57, 2008. C. 1042-1051.
45. Chinaglia, S. *Biodegradation rate of biodegradable plastics at molecular level* / S. Chinaglia, M. Tosin, F. Degli-Innocenti // *Polymer Degradation and Stability*. – № 147. – 2018. C. 237–244.
46. Shima, M. *Biodegradation of plastics* // *Current Opinion in Biotechnology*. – № 12. – 2001. C. 242–247.
47. Reddy, C.S.K. *Polyhydroxyalkanoates: an overview* / C.S.K. Reddy, R. Ghai, K.V.C. Rashmi // *Bioresource Technology*. – № 87. – 2003. C. 137–146.
48. Bátori, V. *Anaerobic degradation of bioplastics: A review* / V. Bátori, D. Åkesson, A. Zamani, M.J. Taherzadeh // *Waste Management*. – № 80. – 2018. C. 406–413.
49. Šerá, J. *Accelerated biodegradation testing of slowly degradable polyesters in soil* / J. Šerá, L. Serbruyns, B. De Wilde, M. Koutný // *Polymer Degradation and Stability*. – T. 171. – № 109031. – 2020.
50. Волова, Т.Г. *Полиоксиканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины.* / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишачкая // – Новосибирск: СО РАН, 2003.
51. Schirmer, A. *Substrate specificities of poly (hydroxyalkanoate)-degrading bacteria and active site studies on the extracellular poly (3-hydroxyoctanoic acid) depolymerase of Pseudomonas fluorescens GK13* / A. Schirmer, C. Matz, D. Jendrossek // *Canadian journal of microbiology*. – T.13. – № 41. – 1995. C. 170-179.
52. Lim, S.P. *Degradation of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in tropical forest and mangrove soils* / S.P. Lim, S.N. Gan, I.K. Tan // *Applied biochemistry and biotechnology*. – T.1. – №126. –2005. C. 23-33.
53. Fernandes, M. *Factors affecting polyhydroxyalkanoates biodegradation in soil* / M. Fernandes, M. Alves, A.A. Vicente // *Polymer Degradation and Stability*. – 2020. C.109408.
54. Harrison, J.P. *Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: a critical review* / J.P. Harrison, C. Boardman, O.

Callaghan, A. Delort, J. Song, J.P. Harrison // *Royal Society Open Science*. – № 5. – 2018. C. 171-192.

55. Wei, L. Thermophysical properties and biodegradation behavior of green composites made from polyhydroxybutyrate and potato peel waste fermentation residue. / L. Wei, S. Liang, A.G. McDonald // *Industrial Crops and Products*. – № 69. – 2015. C. 91-103.

56. Avella, M. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and wheat straw fibre composites: thermal, mechanical properties and biodegradation behavior / M. Avella, G. La Rota, E. Martuscelli, M. Raimo, P. Sadocco, G. Elegir, R. Riva // *Journal of Materials Science*. – № 35. – 2000. C. 829–836.

57. Boyandin, A.N. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates by soil microbial communities of different structures and detection of PHA degrading microorganisms. / A.N. Boyandin, S.V. Prudnikova, M.L. Filipenko, E.A. Khrapov, A.D. Vasil'ev, T.G. Volova // *Applied Biochemistry and Microbiology*. –Т.1. – № 48. – 2012. C. 28-36.

58. Briassoulis, D. Key parameters in testing biodegradation of biobased materials in soil / D. Briassoulis, A. Mistriotis // *Chemosphere*. – № 207. – 2018. C. 18-26.

59. Emadian, S.M. Biodegradation of bioplastics in natural environments. / S.M. Emadian, T.T. Onay, B. Demirel // *Waste management*. – № 59. – 2017. C. 526-536.

60. Harmaen, A.S. Thermal and biodegradation properties of poly(lactic acid)/fertilizer/oil palm fibers blends biocomposites. / A.S. Harmaen, A. Khalina, I. Azowa, M.A. Hassan, A. Tarmian, M. Jawaid // *Polymer Composites*. – № 36. – 2015. C. 576-583.

61. Boyandin, A.N. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils / A.N. Boyandin, S.V. Prudnikova, V.A. Karpov, V.N. Ivonin, T.H. Nguyen, T.G. Volova и др. // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – № 83. – 2013. C. 77-84.

62. Zhalnina, K. Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment / K. Zhalnina, R. Dias, P.D. de Quadros, A. Davis-Richardson, F.A. Camargo, I.M. Clark, S.P. McGrath, P.R. Hirsch, E.W. Triplett // *Microbial ecology*. –Т. 2. – № 69. – 2015.

63. Joyyi, L. Composite properties and biodegradation of biologically recovered P (3HB-co-3HHx) reinforced with short kenaf fibers / L. Joyyi, M.Z.A. Thirmizir, M.S. Salim, L. Han, P. Murugan, K.I. Kasuya, F.H. Maurer, M.I.Z. Arifin, K. Sudesh // *Polymer Degradation and Stability*. – № 137. – 2017. C. 100-108.

64. Yew, S.P. Photocatalytic activity and biodegradation of polyhydroxybutyrate films containing titanium dioxide / S.P. Yew, H.Y. Tang, K. Sudesh // *Polymer degradation and stability*. –Т.8. – № 91. – 2006. C. 1800-1807.

65. Sridewi, N. Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem / N. Sridewi, K. Bhubalan,

K. Sudesh // *Polymer Degradation and Stability*. –Т. 12. – № 91. – 2006. С. 2931-2940.

66. Gallardo- Cervantes, M. Biodegradability and improved mechanical performance of polyhydroxyalkanoates/agave fiber biocomposites compatibilized by different strategies / M. Gallardo- Cervantes, Y. González- García, A.A. Pérez- Fonseca, M.E. González- López, R. Manríquez- González, D. Rodrigue, J.R. Robledo- Ortiz // *Journal of Applied Polymer Science*. –Т.15. – №138. – 2021. С. 50182.

67. Vieira M.G.A., Silva M.A., Santos L.O., Beppu M.M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review // *European Polymer Journal*, Vol. 47, № 3, 2011. С. 254-263.

68. Волова, Т.Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины. / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишачкая // – Новосибирск: СО РАН, 2003.

69. Bugnicourt, E. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. / E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V.A. Alvarez // *Budapest University of Technology and Economics*, 2014.

70. Wang, L. Processability modifications of poly (3-hydroxybutyrate) by plasticizing, blending, and stabilizing / L. Wang, W. Zhu, X. Wang, X. Chen, G. Chen, K. Xu // *Journal of Applied Polymer Science*. –Т.107. – № 1. – 2008. С. 166-173.

71. Baltieri, R.C. Study of the influence of plasticizers on the thermal and mechanical properties of poly (3-hydroxybutyrate) compounds / R.C. Baltieri, I. Mei, H. Lucia, J. Bartoli // *Macromolecular Symposia*. – Wiley Online Library, 2003. С. 33-44.

72. Choi, J.S. Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly (3-hydroxybutyrate) / J.S. Choi, W.H. Park // *Polymer testing*. –Т.23. – № 4. – 2004. С. 455-460.

73. Panaitescu, D.M. Plasticized poly(3-hydroxybutyrate) with improved melt processing and balanced properties / D.M. Panaitescu, C.A. Nicolae, A.N. Frone, I. Chiulan, P.O. Stanescu, C. Draghici, M. Iorga, M. Mihailescu // *Journal of Applied Polymer Science*. –Т.134. – № 19. –2017.

74. Mangeon, C. Natural Terpenes Used as Plasticizers for Poly (3-hydroxybutyrate) / C. Mangeon, L. Michely, A. Rios de Anda, F. Thevenieau, E. Renard, V. Langlois // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. –Т.6. – № 12. – 2018. С. 16160-16168.

75. Волова, Т.Г. Получение и исследование микробных гетерополимерных полиоксиалканоатов / Т.Г. Волова, О.Г. Беляева, Г.С. Калачева, В.Ф. Плотников // *Доклад РАН*. – Т 346. – 1996. С. 558-561.

76. Giles, H.F.J. Extrusion: the definitive processing guide and handbook. / H.F.J. Giles, I.E.M. Mount, R.W.J. John // – William Andrew, 2004.

77. Asrar, J. PHA compositions and methods for their use in the production of PHA films. / J. Asrar, J.R. Pierre // U.S. Patent № 6,620,869. 16 Sep. 2003.

78. ГОСТ 15139-69 (СТ СЭВ 891-78) Пластмассы. Методы определения плотности (объемной массы) (с Изменением N 1) // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200020785> (дата обращения: 1.10.2019).

79. Rossetti, I. Kinetic Modelling of Biodegradability Data of Commercial Polymers Obtained under Aerobic Composting Conditions / I. Rossetti, F. Conte, G. Ramis // Eng. –Т 1. – № 2. – 2021. С. 54-68.

80. Kiselev, E.G. Constructing sustained- release herbicide formulations based on poly- 3- hydroxybutyrate and natural materials as a degradable matrix / E.G. Kiselev, A.N. Boyandin, N.O. Zhila, S.V. Prudnikova, A.A. Shumilova, S.V. Baranovskiy, E.I. Shishatskaya, S.Thomas, T.G. Volova // Pest management science. – Т.76. – №5. – 2020. С. 1772-1785.

81. Лакин, Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для университетов и педагогических институтов. // – М.: Высшая школа, 1990.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

подпись инициалы, фамилия

« 18 » июня 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПЛАСТИФИКАТОРОВ НА СВОЙСТВА
ГРАНУЛ ИЗ ПОЛИ(3-ГИДРОКИСБУТИРАТА) И КИНЕТИКУ ИХ
ДЕГРАДАЦИИ В ПОЧВЕННЫХ МИКРОЭКОСИСТЕМАХ**

06.04.01 Биология

06.04.01 – 01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель



к.т.н., доцент

С.В. Барановский

подпись, дата должность, ученая степень

инициалы, фамилия

Выпускник

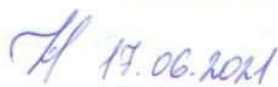


Н.Л. Ертилецкая

подпись, дата

инициалы, фамилия

Рецензент



к.т.н., доцент

В.А. Кожухов

подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2021