

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

\_\_\_\_\_ Т.Г.Волова  
подпись                      инициалы, фамилия  
« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование свойств и кинетики биодеструкции полимерных гранул на основе сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3гидроксивалерата) и пластификаторов  
тема работы

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный  
руководитель

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

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

С. В. Барановский  
инициалы, фамилия

Выпускник

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

А.А. Савченко  
инициалы, фамилия

Рецензент

\_\_\_\_\_  
подпись, дата

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

В.А. Кожухов  
инициалы, фамилия

Красноярск 2021

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему: «Исследование свойств и кинетики биодеструкции полимерных гранул на основе сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) и пластификаторов» содержит 51 страницу текстового документа, 5 таблиц, 20 иллюстраций, 51 использованный источник. Ключевые слова: поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата), биодеградация, пластификаторы, триацетин, биополимеры, экструзия биополимеров.

Целью работы стало исследование свойств и кинетики биодеструкции полимерных гранул поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) в зависимости от содержания 3-гидроксивалерата и пластификатора. В задачи исследования входило: 1) Синтез и исследование образцов П(ЗГБ/ЗГВ) с содержанием ЗГВ 10% и 18% штаммом продуцентом *Cupriavidus eutrophus* в гетеротрофных условиях; 2) Подготовка гранулята из П(ЗГБ/ЗГВ), П(ЗГБ/ЗГВ) с триацитином методом влажного гранулирования; 3) Получение и исследование гранул из П(ЗГБ/ЗГВ), П(ЗГБ/ЗГВ) с триацитином методом экструзии; 4) Исследование кинетики биодеструкции экструдированных гранул из П(ЗГБ/ЗГВ) в зависимости от содержания ЗГВ и триацитина.

Тема исследования связана с актуальным направлением – разработка биоразлагаемых полимерных упаковочных материалов с высокими потребительскими свойствами. В современном мире упаковка из пластика используется для пищевых продуктов, лекарств, электроники, опасных жидкостей и т. д. Большое использование пластиковой упаковки обусловлено тем, что они могут обеспечить защиту продукта от загрязнения, повреждения, разложения. Обладая неоспоримыми достоинствами, эти материалы имеют ряд существенных недостатков: синтетические полимеры в нормальном состоянии длительно разлагаются. Одним из способов получения таких материалов является – экструзия полимерных гранул. Исследования показали, что гранулы, полученные методом экструзии, полностью разрушаются в почве, а также стимулируют развитие почвенной микрофлоры.

## Содержание

Введение	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Упаковочные материалы	7
1.2 Биоразрушаемые полимеры – альтернатива полипропилену	10
1.2.2 Природные биоразлагаемые полимеры	13
1.3 ПГА и их характеристики	15
1.3.1 Синтез ПГА	17
1.3.2 Валерьяновая кислота в биосинтезе ПГА	20
1.4 Экструзия биополимеров	22
2 Материалы и методы исследования	25
2.1 Синтез и выделение ПГА	25
2.2 Объекты исследования	26
2.2 Получение гранул методом влажного гранулирования	27
2.3 Определение плотности гранул	28
2.4 Подбор режима экструдирования	28
2.5 Получение филамента и гранул методом экструзии	28
2.6 Исследование свойств полученных гранул из П(ЗГБ/ЗГВ)	30
2.6.1 Определение плотности полимерных гранул	30
2.6.2 Дифференциально-сканирующая калориметрия (ДСК)	30
2.6.3 Исследование динамики деградации пленок и гранул из П(ЗГБ/ЗГВ) и из П(ЗГБ/ЗГВ)/пластификатор в лабораторных почвенных экосистемах	31
2.6.4 Определение численности почвенных деструкторов пластифицированных полимерных гранул	32
2.7 Статистическая обработка данных	33
3 Результаты	33
3.1 Синтез и выделение П(ЗГБ/ЗГВ)	33
3.2 Режимы экструдирования	36
3.2 Характеристика образцов полимерных гранул из П(ЗГБ/ЗГВ)	37
3.3 Дифференциально-сканирующая калориметрия	38

3.4	Исследование динамики деградация гранул П(ЗГБ/ЗГВ) и П(ЗГБ/ЗГВ)/триацетин в лабораторных почвенных экосистемах	38
3.5	Определение численности почвенных деструкторов пластифицированных полимерных гранул	41
3.6	Кинетика биodeградации	43
	Выводы	45
	Список использованных источников	46

## **Введение**

Значительную обеспокоенность вызывает в последние годы стремительный и практически неконтролируемый рост использования синтетических пластмасс во многих отраслях экономики. В наше время упаковка из пластика используется для сохранения пищевых продуктов, лекарств, электроники, опасных жидкостей и т. д. Обширное применение пластиковой упаковки обуславливается тем, что они гарантируют защиту упакованного продукта от засорения, повреждения, распада, но кроме того универсальностью применения форм и цветовой палитры, легкостью, невысокой стоимостью материала, небольшой энергоемкостью производства по сравнению со стеклом, металлом и бумагой. Владея очевидными плюсами, данные материалы обладают рядом существенных недочетов: синтетические полимеры в нормальном состоянии имеют длительный период распада. Активные темпы увеличения применения полимерной упаковки приводят к внезапному увеличению числа остатков. Классические методы обращения с ними – захоронение, сжигание, вторичная переработка и др. – экологически и экономически не целесообразны (Литвяк, 2019).

В результате, нужно получить полимеры, которые способны сохранять рабочие свойства на протяжении периода использования, а затем испытывают физико-химические и биологические превращения под воздействием факторов окружающей среды и легко включаются в процессы метаболизма природных экосистем [2].

Биопластмассы занимают примерно 10–15 % общего объема современного рынка пластмасс. Биоразлагаемые полимеры широко применяются для упаковки пищевых продуктов, изготовления сельскохозяйственных пленок, контейнеров, пеноматериалов, а также одноразовой посуды (Pinchuk et al, 2014).

Для изготовления полимерных изделий методом экструзии биodeградируемые полимеры, подобно традиционным, должны быть

представлены в форме гранулята. Гранулы полимера, в отличие, например, от порошка, не прилипают к внутренней поверхности экструдера и обеспечивают равномерное распределение исходного материала в цилиндре экструдера [2]. Невзирая на техническую простоту экструзионных методов, значительным вопросом в случае ПГА является их тепловая деградация около температуры плавления, что затрудняет их переработку методом экструзии (Hablott, 2008).

Цель данной работы исследование свойств и кинетики биодеструкции полимерных гранул поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) в зависимости от содержания 3-гидроксивалерата и пластификатора.

Исходя из цели, были поставлены следующие задачи:

1. Синтез и исследование образцов П(ЗГБ/ЗГВ) с содержанием ЗГВ 10% и 18% штаммом продуцентом *Cupriavidus eutrophus* в гетеротрофных условиях;
2. Подготовка гранулята из П(ЗГБ/ЗГВ), П(ЗГБ/ЗГВ) с триацитином методом влажного гранулирования;
3. Получение и исследование гранул из П(ЗГБ/ЗГВ), П(ЗГБ/ЗГВ) с триацитином методом экструзии;
4. Исследование кинетики биодеструкции экструдированных гранул из П(ЗГБ/ЗГВ) в зависимости от содержания ЗГВ и триацитина.

Работа выполнена на кафедре Микробиологии и Биотехнологии, Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского Федерального Университета.

## **1 Обзор литературы**

### **1.1 Упаковочные материалы**

Упаковка каждый день применяется в абсолютно всех областях индустрии с целью долговременного также кратковременного сохранения продуктов, их транспортировки, но кроме того реализации покупателям. При этом сама тара может являться разнообразной: стеклянные или металлические банки, картонные коробки, полиэтиленовые пакеты. Более распространенной в настоящий период считается полимерная упаковка (Асякина и др., 2017).

Полимеры имеют обширное использование, изначально предназначены в качестве исходного материала для получения упаковки. Это могут быть пленки для разных сфер применения: теплиц, многослойные укрывные материалы, а также для электроизоляции (Богатова, 2015). Полимерные материалы – это высокомолекулярные соединения, состоящие из неорганических и органических, аморфных и кристаллических веществ. Химический состав разделяет полимерные материалы на органические, элементоорганические, неорганические (Зубова, 2018). Полимеры в комбинации с иными материалами могут быть использованы как упаковка для различных сфер пищевой промышленности и служить защитой для мяса, рыбы, овощей и других продуктов питания. Полимерные пленочные материалы дают возможность в изготовлении товаров кормления повысить время их хранения и уменьшить порчу продуктов (Богатова, 2015).

Так как упаковка позволяет сохранить не только внешний вид продукта, но и полезные качества, то она считается значимым звеном в пищевой промышленности и поэтому к ней применяются жесткие критерии. Упаковочные материалы должны соответствовать санитарно-эпидемиологическим характеристикам, сертификатам соответствия и нормативным документам (ГОСТ 12302-2013), гигиеническим нормативам и инструкциям Министерства здравоохранения Российской Федерации (МЗ России № 880-71). Эти документы определяют условия к качеству и составу

материала, используемого для изготовления упаковки, поверхности упаковки, размеру и качеству боковых швов, герметичности и прочности упаковки. Так одно из важных условий, при использовании упаковки в пищевой промышленности, является наличие сертификата соответствия, выданного Министерством здравоохранения, которое может подтвердить, что данный материал является безопасным (Асякина, 2016).

Одним из главных упаковочных материалов на данный момент является гибкая упаковка.

Биржа товаров пищевой промышленности на данный момент одна из самых глобальных сфер, в которой используется наибольшее количество полимерной гибкой упаковки. Обычно её получают с помощью методов ламинации и экструзии. Основным сырьем в процессе изготовления гибкой упаковки служат полиэфиры, полиэтиленовая пленка, металлизированная пленка, полипропиленовая пленка, бумага, адгезивный клеевой состав и т.д. Компании, которые используют полимерные упаковочные материалы, вынуждены использовать многослойную пленку, так как только это сможет обеспечить сохранение товара от порчи, так как солнечный свет, кислород и загрязнения способствуют сокращению срока годности изделия. Такую многослойную упаковку можно получить из слоя алюминиевой фольги, которая помещается между несколькими слоями полимерной пленки, соединенных между собой при помощи ламинации или клея. Минусом производства является то, что производители, пытаясь улучшить качество упаковки, создают проблему невозможности повторной переработки полимерного материала. Из-за огромного числа вариаций полимерных композиционных структур, которые применяют при производстве гибкой упаковки, процесс переработки (практически) не выполним. Все вещества, использованные при производстве затрудняют разделение и переработку гибких материалов, а так же их классифицирование (ГОСТ 12302-2013).

На сегодняшний день все острее встаёт вопрос о накоплении в окружающей среде отходов синтетических полимеров, обладающих



исключительной стойкостью к физико-химическому и биологическому разложению. Одним из перспективных направлений решения экологической проблемы, связанной с загрязнением окружающей среды синтетическими полимерами, является разработка композиционных материалов на основе полимеров и различных добавок, способных к биодegradации в условиях окружающей среды (Кадыров, 2017). Если полимерная составляющая гибкой упаковки будет подвержена биоразложению, то это в значительной степени решит задачу утилизации отходов.

Полимерные материалы в пищевой промышленности удовлетворяют требованиям механической прочности, химической устойчивости к действию компонентов пищевого продукта, экономичности, доступности, не высокой стоимости исходного сырья (ГОСТ 12302-2013). В настоящее время для производства упаковочных материалов широко используются полимерные материалы, такие как полиэтилен (ПЭ) и полипропилен (ПП). Срок эксплуатации упаковочных изделий из полимерных материалов определяется, прежде всего, сроком службы потребительских товаров, заключенных в эти материалы. Поэтому, как правило, полимерная упаковка попадает в твердые бытовые отходы раньше, чем теряет свои потребительские свойства (Кадырова и др, 2017). Однако, несмотря на свои привлекательные свойства, полимерные материалы имеют ряд недостатков. Два основных из них заключаются в следующем: во-первых, полимерные материалы производятся из невозобновляемых природных ресурсов – нефти, угля, газа и, во-вторых, их долговечность, которая в долгосрочной перспективе обернулась одним из главных недостатков. С ростом мирового производства полимерных материалов все более обостряется проблема защиты окружающей среды от полимерного мусора, которым являются использованные изделия из ПМ и отходы их производства (ГОСТ 12302-2013).

По итогам 2015 года всего в мире было потреблено примерно 225 млн. тонн тарной продукции, в то время как в 2000 году объем потребления составлял 150 млн тонн. Крупнейшим потребителем является Китай, объем

рынка упаковки, которого в 2015 году составил 68 млн. тонн; объем рынка России в том же году оценивался в 4,6 млн тонн. К 2030 году прогнозируется увеличение объемов рынка на 30% (Курманбаева, 2018). На современном этапе развития общества возник новый подход к разработке полимерных материалов. Он имеет целью получение полимеров, которые сохраняют эксплуатационные характеристики только в течение периода потребления, а затем претерпевают физико-химические и биологические превращения под действием факторов окружающей среды и легко включаются в процессы метаболизма природных биосистем (ГОСТ 12302-2013).

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.

Наиболее технологически и экономически выгодным направлением создания биоразлагаемых полимеров является получение композиционных материалов на основе традиционных синтетических полимеров и различных добавок, ускоряющих процесс биоразложения (Кадырова, 2017). Для оценки способности полимерных материалов к деструкции применяются модельные эксперименты (Курманбаева, 2018).

Известно, что биокоррозия может привести к прямому разрушению упаковочного материала, если сам полимер или его компоненты являются питательной средой. Поверхность полимера также может стать носителем колоний микроорганизмов, поступающих, как из окружающей среды, так и в контакте с питательной средой, то есть в антимикробной защите часто нуждаются и полимерные материалы. Но следует помнить, что для каждого проектируемого применения антимикробная добавка и полимерная составляющая материала должны быть правильно и специально подобраны с учетом их безопасности, эффективности, доступности, экономической целесообразности и кроме того, подобные материалы должны сохранять свою

стабильность при их использовании в течение длительного времени (Дышлок, 2019).

## **1.2 Биоразрушаемые полимеры – альтернатива полипропилену**

Производство пластических масс на современном этапе развития возрастает в среднем на 5-6 % ежегодно и к 2010 г. достигла 250 млн. т. Их потребление на душу населения в индустриально развитых странах за последние 20 лет удвоилось, достигнув 85-90 кг (Клинков, 2005; Пономарева, 2002).

Насчитывается около 150 видов пластиков, 30 % из них – это смеси различных полимеров. Для достижения определенных свойств, лучшей переработки в полимеры вводят различные химические добавки, которых уже более 20, а ряд из них относятся к токсичным материалам. Выпуск добавок непрерывно возрастает, и все они будут введены в пластики, а со временем потребляемые пластики неизбежно переходят в отходы (Клинков, 2005).

Такая высокая популярность пластмасс объясняется их легкостью, экономичностью и набором ценнейших служебных свойств. Пластики являются серьезными конкурентами металлу, стеклу, керамике. Например, при изготовлении стеклянных бутылей требуется на 21 % больше энергии, чем на пластмассовые. Но наряду с этим возникает проблема с утилизацией отходов, которых существует свыше 400 различных видов, появляющихся в результате использования продукции полимерной промышленности (Клинков, 2005).

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 (оксобiorазлагаемая 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].

Практически все экономически развитые страны мира ищут решение проблемы «полимерного мусора». Проблема утилизации решается путем захоронения, сжигания, пиролиза или вторичной переработки (рециклинга), что не всегда экономически и экологически оправдано (Тертышная, 2015).

В настоящее время одним из приоритетных путей решения проблемы утилизации «полимерного мусора» в России, США, странах Европы является создание биodeградируемых полимерных материалов (ПМ) (Тертышная, 2015).

Наука в области химии и физики полимеров не стоит на месте. В конце XX в. несколько производителей из Германии, Нидерландов, США представили на рынок био- и фоторазрушаемые полимеры на основе полигидроксиалканоатов (ПГА), полилактидов (ПЛА) и поликапролактонов (ПКЛ). Такие полимеры получают путем непосредственно микробиологического синтеза, например ПГА, или же постадийно, используя процесс полимеризации (ПЛА, ПКЛ) (Тертышная и др., 2016).

Создание био- и фоторазрушаемых пластмасс основано на введении в цепь полимера активных добавок, которые должны содержать функциональные группы, способные разлагаться под действием микроорганизмов и УФ-излучения. В настоящее время существует немало работ, посвященных получению и исследованию биопластиков (Тертышная и др., 2016).

На современном этапе развития общества возник новый подход к разработке полимерных материалов, диаметрально противоположный традиционному. Он имеет целью получение полимеров, которые сохраняют эксплуатационные характеристики только в течение периода потребления, а затем претерпевают физико-химические и биологические превращения под действием факторов окружающей среды и легко включаются в процессы

метаболизма природных биосистем. Упаковка из таких полимерных материалов получила название биоразрушаемой или биodeградируемой (Мяленко, 2010)

Важным фактором, который определяет стойкость полимера к биоразложению, является величина его молекул. В то время как мономеры или олигомеры могут быть поражены микроорганизмами и служат для них источником углерода, полимеры с большой молекулярной массой устойчивы к действию микроорганизмов (Крутько, 2014).

Биодеструкцию большинства технических полимеров, как правило, инициируют процессами небиологического характера (термическая, фотоокислительная, механическая деградация и т. п.). Упомянутые деградационные процессы приводят к снижению молекулярной массы полимера. При этом возникают низкомолекулярные биоассимилируемые фрагменты, имеющие на концах цепи гидроксильные, карбонильные или карбоксильные группы (Крутько, 2014).

Преимущества биоразлагаемых полимеров:

- 3 возможность переработки, как и обычных полимеров, на стандартном оборудовании;
  - 4 низкий барьер пропускания кислорода, водяного пара (оптимально для использования в области пищевой упаковки);
  - 5 стойкость к разложению в обычных условиях;
  - 6 быстрая и полная разлагаемость при специально созданных или естественных условиях – отсутствие проблем с утилизацией отходов;
- независимость от нефтехимического сырья (Крутько, 2014).

Биоразлагаемые полимеры могут быть подразделены на три категории (Рисунок 1). Биополимеры, входящие в категорию I – крахмал, целлюлоза, хитин-хитозан, давно используются самостоятельно и для модификации синтетических полимеров, однако к улучшению экологической ситуации их применение не привело. Из полимеров категорий II и III наибольшее распространение получили полилактид (ПЛА) и поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ). Эти полимеры – линейные полиэфиры (Тертышная, 2015).

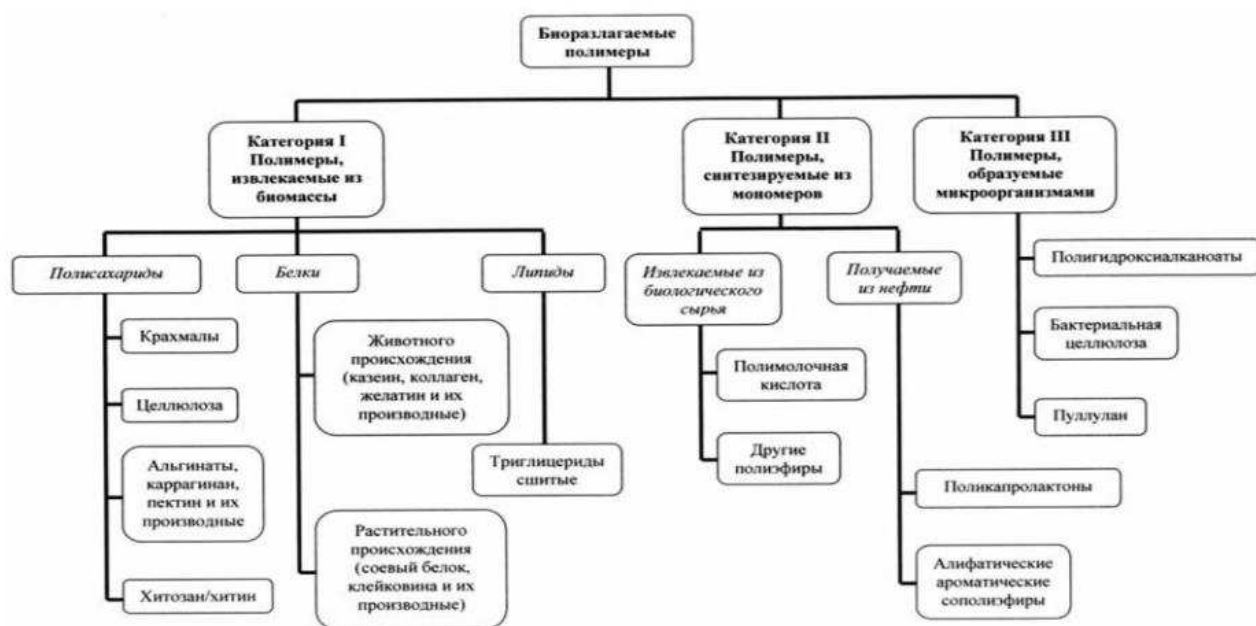


Рисунок 1 – Классификация биоразлагаемых полимеров (Тертышная, 2015)

## 1.2.2 Природные биоразлагаемые полимеры

### 1.2.2.1 Полисахариды

Направление по использованию природных полимеров – полисахаридов, белков для изготовления биоразлагаемых пластиков интересно прежде всего тем, что ресурсы исходного сырья постоянно возобновляемы и, можно сказать, не ограничены. Основная задача исследователей – это разработка композиционных биodeградируемых материалов, обеспечивающих необходимые свойства, приближающиеся к синтетическим многотоннажным полимерам.

### 1.2.2.2 Крахмал

Крахмал – полисахарид, накапливаемый в процессе жизнедеятельности растений в их клубнях, семенах, стеблях и листьях. В промышленных масштабах его получают из картофеля, кукурузы, пшеницы, риса.

Выбор крахмала в качестве основы для создания композиционных полимерных материалов обусловлен рядом причин:

- 3 доступностью и практически неисчерпаемой сырьевой базой;

- 4 наличием таких полезных свойств, которые отсутствуют у синтетических полимеров (повышенная гидрофильность, устойчивость к действию органических растворителей, легкость биохимического разложения, большая поглощающая способность по отношению к некоторым реагентам);
- 5 возможностью синтеза производных крахмала.

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, гликоль, сорбит) для превращения нативного крахмала в термопластичный крахмал (TPS), который устойчив к переработке экструзией, но чувствителен к влаге [9].

### **1.2.2.3 Целлюлоза**

Целлюлозные волокна отличаются белизной, гибкостью, прочностью, упругоэластичностью, т. е. способностью обратимо деформироваться без разрушения даже при больших механических напряжениях, нерастворимостью в воде и органических растворителях, неплавкостью.

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].

### **1.2.2.4 Хитин**

Хитин – природное соединение из группы азотсодержащих полисахаридов, представляет собой жесткий полупрозрачный материал.

Благодаря регулярности строения полимерной цепи хитина формируется высокоупорядоченная структура, обладающая признаками, характерными для

кристаллического фазового состояния полимеров. При этом кристаллические области структуры хитина могут существовать в трех кристаллографических (структурных) модификациях, отличающихся расположением молекулярных цепей в элементарной ячейке кристаллита (явление, известное под названием полиморфизма).

### **1.2.2.5 Полигидроксиалканоаты**

Полигидроксиалканоаты – производные полигидроксималяной кислоты. Они являются полимерами природного происхождения, способными быстро разлагаться под действием микроорганизмов почвы и воды.

Способность ПГА к биоразложению – определяющая особенность, на которой основано его широкое применение как в чистом виде, так и в виде компонента смесей и сополимеров на его основе. Поэтому изделия, изготовленные из ПГБ, экологически чистые и не требуют специальной утилизации после использования.

Кроме того, привлекательна возможность захоронения изделий из ПГБ после их использования в почве или морской воде, где обеспечивается их полное биоразложение, что исключает загрязнение окружающей среды (Крутько, 2014).

## **1.3 ПГА и их характеристики**

Наиболее изучаемыми среди биоразрушаемых пластиков являются алифатические полиэфиры, особенно бактериально синтезированные, так называемые полигидроксиалканоаты (ПГА) (Волова, 2013).

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это полиэфиры, синтезируемые множеством микроорганизмов при культивировании в различных условиях питания и окружения (обычно при лимитировании азота, фосфора, серы, кислорода или магния, или при избытке предшественников полимеров). Полимеры ПГА могут различаться по своим свойствам в зависимости от их химического состава. Они нерастворимы в воде, устойчивы к УФ-излучению. К микроорганизмам, синтезируемым ПГА относятся некоторые Archaea и

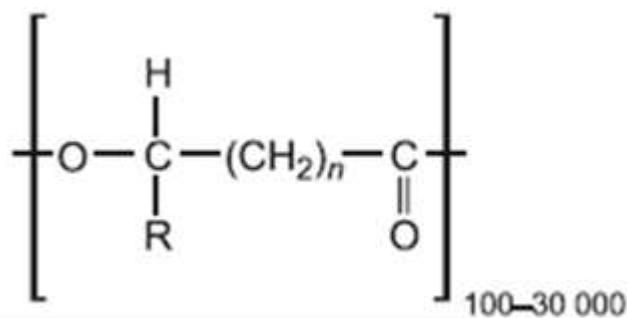


определенные грамположительные и грамотрицательные бактерии. Некоторые другие микроорганизмы способны накапливать ПГА даже в присутствии высоких концентраций питательных веществ (например, *Pseudomonasputida*, *Sphaerotilusnatans*, *Bacillusmycoides*, *Azotobactervinelandii*, *Alcaligeneslatus*). Продуценты ПГА накапливают эти полиэфиры внутриклеточно в виде подвижных, аморфных, жидких гранул, которые могут наблюдаться как светоотражающие отложения или электросветящиеся тельца, которые, при сверхпродукции, могут значительно изменять как размер, так и морфологию этих бактерий (Бессонова, 2016; Chen, 2015).

Это термопластичные линейные полиэфиры гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоаты, ПГА; в англоязычной литературе РНА). В отличие от полилактидов и полигликолидов ПГА не подвержены гидролитической деградации в водных средах, поэтому они характеризуются медленной (месяцы и годы) кинетикой биорезорбции (Бессонова, 2016; Chen, 2010).

Главными свойствами полигидроксиалканоатов являются биосовместимость и биоразлагаемость. Свойства ПГА определяются их строением, прежде всего, они зависят от строения боковых групп в полимерной цепи, а также от расстояния между эфирными группами в молекуле. В настоящее время идентифицировано свыше 150 ПГА. Несмотря на это многообразие, в сфере внимания исследователей в настоящее время всего несколько типов ПГА: поли-3-гидроксибутират, поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксипропионат, поли-3-гидроксибутират-со-4-гидроксибутират, поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксиивалерат, поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксигексаноат, поли-3-гидроксибутират-со-3-гидроксидеканоат. Свойства этих полимеров меняются очень значительно в зависимости от типа и соотношения мономеров в полимерной цепи. В результате этого на базе ПГА можно иметь спектр материалов с различными физико-механическими свойствами, пригодными для различных применений (Бессонова, 2016; Williams, 2005).

Основные структуры полигидроксиалканоатов можно иллюстрировать следующим образом



Полигидроксиалканоаты, синтезируемые природными и генетически модифицированными организмами чрезвычайно различаются между собой по структуре и свойствам (гибкости, кристалличности, температуре плавления и др.) в зависимости от таксономического положения и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов, условий биосинтеза и типа углеродного субстрата (Williams, 2005; Штильман, 2010).

Линейная структура молекул ПГА придает им свойство термопластичности и изменения прочности (возрастание по направлению растяжения). При нагревании молекулярные цепи в ПГА легко сдвигаются относительно друг друга, в результате этого материал размягчается и приобретает текучесть (Пахомов, 2018).

В последние годы область применения ПЗГБ стала более широкой: от медицинских имплантатов, мембран, пластин, клеточных носителей для тканевой инженерии к активному развитию новых систем доставки лекарственных препаратов (Стаценко, 2016).

На сегодняшний день описание в литературе ПГА, основана на исследованиях процессов биосинтеза, изучения структуры, температурных характеристик и кристаллизации. Среди данного класса полимеров хорошо изучены гомополимер – 3-гидроксивалерат и его сополимер с 3-гидроксивалератом. Из-за высокой кристалличности данных полимеров в литературе в основном представлены работы по пленочным матрицам и их биодеструкции в период от 90 до 180 суток. Ограниченная информация данных

по экструзии сополимера и влияние метода на его деградацию остается нерешенной задачей, для которой можно применить полимеры данного класса.

### 1.3.1 Синтез ПГА

Для производства ПГА могут быть использованы простые, возобновляемые ресурсы, такие как сахароза, крахмал и целлюлоза. Напротив, производство синтетических пластмасс требует затрат не возобновляемых ископаемых ресурсов, таких как нефть.

Для выбора потенциального продуцента ПГА в качестве критериев принято рассматривать следующие показатели: химический состав, выход полимера, затраты углеродного субстрата, концентрацию биомассы клеток в культуре, продуктивность процесса.

ПГА синтезируются в ходе сложного многоступенчатого биосинтетического процесса, каждую стадию которого катализируют специфические ферменты. Знание закономерностей структурно-функциональной организации внутриклеточного цикла ПГА дает возможности управления этим процессом и основу для синтеза полимеров с новыми свойствами.

Рассмотрим метаболические пути биосинтеза на примере наиболее изученного из полиоксиалканоатов – полимера  $\beta$ -оксимасляной кислоты. Эти пути являются общими практически для всех бактерий-продуцентов. Фермент  $\beta$ -кетотиолаза катализирует образование углерод-углеродной связи двух ацетил-КоА остатков путем конденсации Кляйзена. Молекулы ацетил-КоА поступают при этом из гликолиза через образование пирувата. Далее НАДФН-зависимая ацетоацетил-КоА-редуктаза превращает ацетоацетил-КоА в 3-гидроксибутирил-КоА (Findlay R. H., 1983). На следующем этапе молекулы 3-гидроксибутирил-КоА связываются с ПГБ-полимеразой (рисунок 2). В неактивном состоянии она представляет собой мономерные субъединицы, которые растворены в цитоплазме. При связывании субстрата эти субъединицы димеризуются и с помощью этого гомодимера начинается синтез полимера. Связывание остатков 3-гидроксимасляной кислоты осуществляется

конститутивным остатком цистеина. По мере синтеза полимера и роста цепи, такие комплексы организуются в гранулы, внутри которых находятся гидрофобная цепь растущего ПГБ, а снаружи расположены молекулы ПГБ-полимеразы со вспомогательными белками, которые продолжают синтез на поверхности гранул (рисунок 3). При этом на одну молекулу мономера – 3-гидроксимасляной кислоты – приходится 2 молекулы ацетил-КоА (Shrivastav A., 2013). ПГБ-полимераза может существовать в двух формах: свободной, растворенной в цитоплазме и гидрофобной, связанной с полимерными гранулами. Во время роста при дефиците углерода фермент существует в растворенном состоянии, однако при наступлении стрессовой ситуации (например, азотного голодания) он переходит в ассоциированную с гранулами форму и приступает к синтезу запасного вещества – ПГБ. Биохимически синтез ПГБ контролируется соотношением НАДФН к НАДФ + в цитоплазме. Когда источник азота иссякает, это соотношение возрастает, что ингибирует ферменты цикла трикарбоновых кислот. Когда поток ацетил-КоА уменьшается, понижается уровень кофермента А и снимается ингибирование  $\beta$ -кетотиолазы и начинается синтез полимера (Lageveen R. G., 1988; Holmes P. A, 1985). Однако параллельно с анаболическими процессами протекают и катаболические реакции, то есть происходит также непрерывное разложение ПГБ до мономеров ферментов ПГБ-деполимеразой. Таким образом, регуляция процесса полимерного биосинтеза осуществляется путем смещения равновесия между прямой и обратной реакциями полимеризации и деполимеризации.

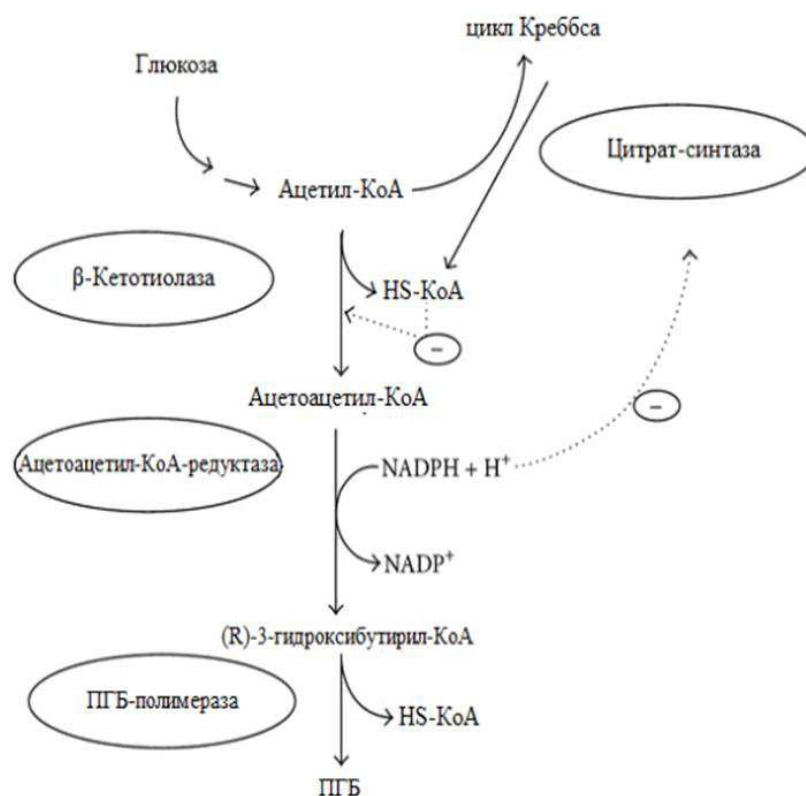


Рисунок 2 – Схема биосинтеза П(ЗГБ), проходящего в бактериальных клетках

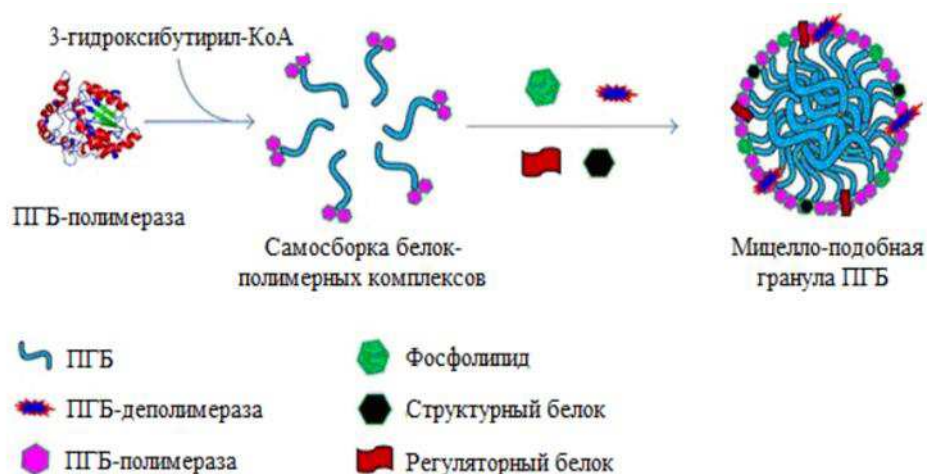


Рисунок 3 – Схема формирования полимерных гранул в цитоплазме бактериальных клеток при синтезе П(ЗГБ)

Фермент ПГБ-синтаза стереоспецифичен – только R-изомеры 3-гидроксимасляной кислоты могут участвовать в реакции. Также, у ПГБ-синтазы различных организмов могут включать в полимерную цепь не только остатки 3- гидроксibuтирата, но и, например, 3-гидроксивалерата и более длинноцепочечных 3-гидроксикарбоновых кислот (Shiraki M., 2006; Rehm В.Н.,

2002; Tsuge T., 2000). Именно за счет этого возможно получение сополимеров ПГА, обладающих уникальными свойствами.

Валериановая кислота включается в состав сополимера через путь  $\beta$  окисления: валерил КоА > 3 кетовалерил КоА > D 3 гидроксвалерил КоА > ГВ, то есть 3 кетовалерил КоА, промежуточный продукт  $\beta$  окисления валериановой кислоты, не расщепляется далее на ацетил КоА и пропионил КоА, а направляется на синтез ПГА при участии ацетоацетил КоА редуктазы.

### **1.3.2 Валерьяновая кислота в биосинтезе ПГА**

Как правило, для получения сополимера путем микробиологического синтеза, в качестве основных, либо дополнительных источников углерода используют органические кислоты или спирты с нечетным числом атомов углерода.

П(ЗГБ-со-ЗГВ) является наиболее широко изученным ПГА-сополимером. Его механические свойства зависят от мольной доли ЗГБ. Введение мономеров с 3-5 углеродными атомами в полимер, состоящий в основном из ЗГБ, приводит к снижению кристалличности и температуры плавления, но улучшает гибкость, прочность и упрощает процесс обработки, без ущерба для температуры разложения (Lee, 1996). П(ЗГБ-со-ЗГВ) сополимер намного более гибок, чем гомополимер П(ЗГБ), поскольку он демонстрирует пятикратное уменьшение модуля Юнга до 0,7 ГПа по мере увеличения доли ЗГБ-звеньев (Williams and Peoples, 1996). Сообщается также, что по мере увеличения доли сомономера возрастает относительное удлинение при разрыве (Lee, 1996).

Для сырьевых материалов, сополимер ЗГВ является более ценным, чем гомополимер ПГБ потому что, имеет больше полезных свойств, в частности температуру плавления, кристалличность, пластичность и способность к биodeградации.

Валериановая кислота включается в состав сополимера через путь  $\beta$  окисления: валерил КоА > 3 кетовалерил КоА > D 3 гидроксвалерил КоА > ГВ, то есть 3 кетовалерил КоА, промежуточный продукт  $\beta$  окисления валериановой

кислоты, не расщепляется далее на ацетил КоА и пропионил КоА, а направляется на синтез ПГА при участии ацетоацетил КоА редуктазы.

Описана технология синтеза ЗГВ бактериями *Ralstonia eutropha* в ферментёре объемом 5 л на среде с глюкозой в качестве основного ростового субстрата и соли валерата натрия в качестве субстрата предшественника. Использовалось несколько способов добавления валерата, для устранения ингибирования роста клеток. Варьируя концентрацию глюкозы, а также концентрацию соли валерьяновой кислоты, в периодическом режиме удалось оптимизировать процесс, позволяющий получать общий урожай биомассы и выход полимера, соответственно до 50 и 25 г/л; включение валерата в полимер составило около 11 мол. %.

Так же известен способ синтеза 3-компонентных ПГА - П(ЗГБ/ЗГВ/4ГБ) в культуре *Ralstonia eutropha* при культивировании в ферментере на глюкозе; обеспечивший высокий выход по биомассе (136 г/л) и сополимера (62%). Доминирующими в 3-компонентном сополимере были мономеры ЗГБ, а содержание мономеров ЗГВ и 4ГБ были на низком уровне, 2 и 5 мол. % соответственно.

Проводились исследования в которых использовали культуру *Alcaligenes eutrophus* Н16. Предварительно культуру бактерий выращивали в обогащенной азотом среде, содержащей 10 г / л дрожжевого экстракта, 10 г / л полипептона, 5 г / л мясного экстракта и 5 г / л сульфата аммония, в колбах объёмом 500 мл. Клетки центрифугировали и промывали для удаления остаточного азота. Далее клетки инокулировали на среду того же состава в 5-литровом ферментере (KMJ-5B, Mitsuwa, Japan). В качестве источников углерода использовали масляную и валериановую кислоту, и в качестве источника азота в культуре использовали сульфат аммония. При внесении жирных кислот, в концентрации 1,5 г/л включение мономеров ЗГВ в сополимере составило и 6,7 мол. %, общий выход сополимера – 40 %.

Недостаток способов аналогов – невысокий общий выход сополимера и невысокое содержание в них мономеров ЗГВ.

## 1.4 Экструзия биополимеров

Одним из перспективных методов получения упаковки является экструзия, но и тут есть свои проблемы (Ершов, 2015).

Экструдирование (экструзия) – это технология получения продуктов (экструдатов) путем образования из исходного сырья под действием высокой температуры и давления вязкого расплава и его последующего продавливания шнеком через формующее отверстие (Пахомов, 2018).

В настоящее время моделирование процесса течения расплава полимера в зоне дозирования шнека экструдера требует доработок и уточнений (Леваничев, 2015).

В однозаходном (классическом) шнеке твердая фаза плавится, сохраняя целостность до тех пор, пока не станет физически нестабильной и не разрушится. Образовавшиеся частицы полимера смешиваются с расплавом и продолжают плавиться за счет теплопроводности. Поскольку теплопроводность полимеров относительно низка, процесс плавления протекает медленно. В результате возможна ситуация, при которой частицы нерасплавленного полимера достигнут выходного сечения шнека и попадут в головку, вызывая колебания температуры расплава, что скажется на качестве конечного продукта (Ершов, 2015).

Очень часто теория в процессах переработки пластмасс отстает от практики, возможно одна из причин в том, что расплав рассматривается как жидкость, а реальное движение ближе к скольжению твердого тела по поверхности (Леваничев, 2015).

Слежение за процессом экструзии биополимеров осуществляется путем контроля, как минимум, трех параметров: влажности экструдированного сырья, температуры в различных зонах экструдера, а также скорости вращения шнека экструдера. При этом в экструдере, как правило, выделяют несколько зон – зону питания, зоны плавления и дозирования, а также головку экструдера с фильерой (Урубков, 2018).



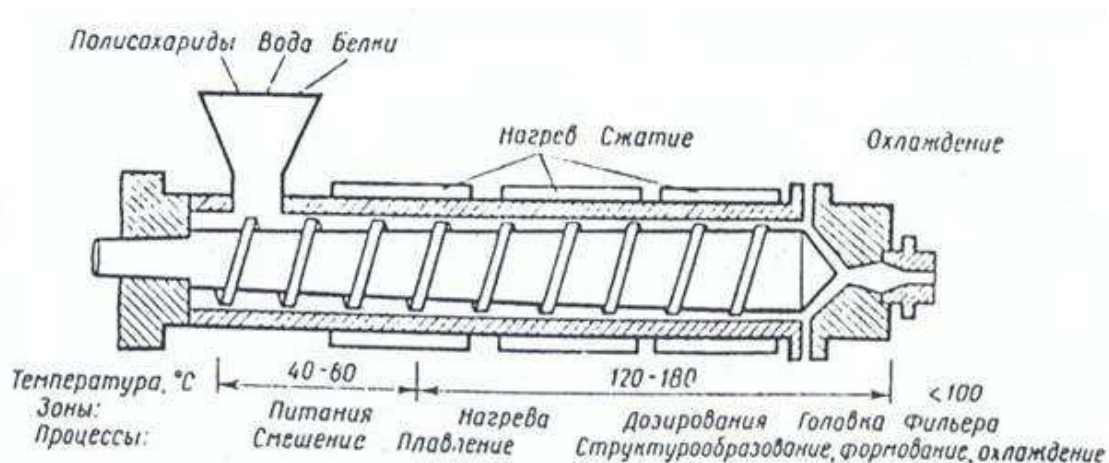


Рисунок 4 – Схема экструзионной установки (Урубков, 2018)

При использовании одношнековых машин предварительно увлажненное и перемешанное сырье попадает в зону питания, где оно дополнительно перемешивается и сжимается с помощью шнека. В зоне питания осуществляется нагрев экструдруемого сырья. В зоне плавления, в которой температура обычно поддерживается около 190 °С, материал переходит в вязко-текучее состояние, образуя расплав биополимеров. В зоне дозирования завершаются процессы перехода биополимеров в вязко-текучее состояние (Урубков, 2018).

Необходимыми условиями получения экструзионных продуктов питания являются: увлажнение и пластификация сырья, получение расплава биополимеров, структурирование расплава под действием сил сдвига и растяжения, его охлаждение и формование. Следует отметить, что наиболее важным из перечисленных условий является получение расплава биополимеров, то есть переход биополимеров в условиях экструзии в вязко-текучее состояние. Способность биополимеров переходить в вязко-текучее состояние обеспечивает проведение самого процесса и отражено в названии процесса экструзии как термопластической (Урубков, 2018).

Переход из одного физического состояния процессы плавления и кристаллизации происходят при определенных значениях температур, знание и использование которых необходимо при выборе режимов переработки полимеров. Так, в зависимости от температуры стеклования и плавления

(текучести) изменяются время охлаждения изделия, температура формы и рабочих узлов экструзионных агрегатов. Большое практическое значение имеют такие характеристики, как скорость кристаллизации, температура плавления, а также изменение размеров и конфигурации структурных образований кристаллизующихся полимеров в зависимости от условий формования и охлаждения изделий (Бортников, 1983).

## 2 Материалы и методы исследования

### 2.1 Синтез и выделение ПГА

Бактерии выращивали в условиях, разработанных для синтеза ПГА (Волова с соавт., 1992). Инокулят получали в строго стерильных условиях в периодическом режиме с использованием шейкера-инкубатора «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США) в стеклянных колбах. Посевной материал получали ресуспендированием музейной культуры, хранящейся на агаризованной среде. Музейную культуру выращивали в жидкой солевой среде Шлегеля при стартовой концентрации глюкозы или фруктозы 10 г/л.

Для выращивания бактерий за основу принята солевая среда Шлегеля:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  – 9.1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1.5;  $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  – 0.2;  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$  – 0.025 (г/л) и сбалансированная кислотно-солевая среда, готовящаяся на основе (Волова, 2004). Источником железа служил раствор железа лимоннокислого (5 г/л), который вводят из расчета 5 мл/л. Микроэлементы вводили по прописи Хоагланда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 литр среды. Стандартный раствор содержит:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 0.288;  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.030;  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0.08;  $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.008;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.176;  $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.050;  $\text{NiCl}_2$  – 0.008 (г/л). В качестве источника азота использовали хлористый аммоний и 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
Карбамид ( $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ )	ГОСТ 6691-77
Натрий фосфорнокислый двузамещенный ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	ГОСТ 4172-76

Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	ГОСТ 4198-75
Магний сернокислый (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	ГОСТ 4523-77
Железо лимоннокислое (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Fe·H <sub>2</sub> O)	ТУ6-09-01719-87
Купорос медный (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	ГОСТ 19347-99
Марганец хлористый (MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	ГОСТ 612-75
Никель хлористый (NiCl <sub>2</sub> )	ГОСТ 4038-79
Купорос цинковый (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	ГОСТ 8723-75
Кобальт хлористый (CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	ГОСТ 4525-77
Кислота борная (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	ГОСТ 9656
Дихлорметан (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	ГОСТ 9968-86
Гексан (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> )	ТУ 2631-003-05807999-98
Бутандиол-1,4 (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> )	ТУ 6-09-2822-78

Выделение и многократную очистку полимера из экстракта бактериальной биомассы *Cupriavidus eutrophus* проводили с помощью хлороформа с последующим осаждением полимера гексаном и высушивали при 40 °С.

## 2.2 Объекты исследования

В качестве материалов исследования был выбран сополимер 3-гидроксимасляной и 3-гидроксивалериановой кислоты, с включением 3-гидроксивалерата 10% и 18%. Поли (3-гидроксibuтират-со-3гидроксивалерат) [П(ЗГБ-со-ЗГВ)] синтезирован микроорганизмами – бактериями *Cupriavidus eutrophus*.

Основными физико-химическими свойствами полимера состава П(ЗГБ/ЗГВ) 90-10 соответственно являются: молекулярная масса (Мч) равная 300 ± 4,7 кДа; температура плавления (Тпл) равная 169,0 ± 0,5; а также кристалличность (Сх) равная 58 ± 1,0 %;

Основными физико-химическими свойствами полимера состава П(ЗГБ/ЗГВ) 82-18 соответственно являются: молекулярная масса (Мч) равная  $315 \pm 4,2$  кДа; температура плавления (Тпл) равная  $166,0 \pm 0,5$ ; а также кристалличность (Сх) равная  $48 \pm 1,0$  %;

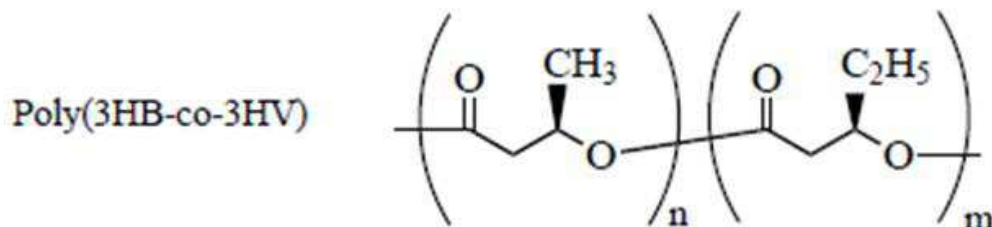


Рисунок 5 – Структура поли(ЗГБ-со-ЗГВ)

Пластификатор триацетин («Acros organics», Германия) добавляли к П(ЗГБ/ЗГВ) для снижения температур плавления и кристаллизации. Плотность – 1,16 г/мл; Ткип = 258 °С; М = 218,21.

В качестве растворителя для П(ЗГБ/ЗГВ) использовали дихлорметан.

Для осаждения растворов П(ЗГБ/ЗГВ) использовали охлажденный этиловый спирт (3 части спирта к 1 части раствора).

В работе использовали четыре состава для получения гранул: №1 – П(ЗГБ/ЗГВ) состава 90-10, №2 – П(ЗГБ/ЗГВ) состава 82-18, №3 – П(ЗГБ/ЗГВ) состава 90-10 + триацетин, П(ЗГБ/ЗГВ) состава 82-18 + триацетин.

## 2.2 Получение гранул методом влажного гранулирования

Процедура получения гранул для экструзии состояла из нескольких этапов. Сначала полимер в виде порошка растворяли в 400 мл дихлорметана (5% раствор) и ставили на мешалку с подогревом (40°С) до полного растворения полимера. Далее полученный раствор осаждали по частям в охлажденном этаноле. 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 для получения влажной полимерной массы. Далее из полученной полимерной массы изготавливали гранулы при

помощи ручного гранулятора. Гранулы помещали на металлические подносы и высушивали при комнатной температуре в течение суток.

### 2.3 Определение плотности гранул

Для определения плотности гранул использовали метод вытеснения воды. Для этого несколько полученных гранул, предварительно взвесив, помещали в мерную пробирку с 15 мл воды и отмечали, на сколько делений поднялся объем воды. Плотность гранул определяли по формуле:  $\rho = m/V$ , где  $m$  – масса гранул в граммах,  $V$  – объем вытесненной гранулой жидкости в миллилитрах.

### 2.4 Подбор режима экструдирования

Экструзию выполняли на одношнековом экструдере Brabender Kompaktextruder KE19 с подбором режима экструдирования.

Оптимальный режим экструзии для П(ЗГБ-со-ЗГВ), был найден экспериментальным путем согласно имеющейся информации по теме (Vandi, 2019; Rivas, 2017; Wang, 1996).

### 2.5 Получение филамента и гранул методом экструзии

Полученные гранулы методом влажного гранулирования далее использовали для получения филамента на одношнековом экструдере Brabender Kompaktextruder KE19 (Германия) (Рисунок 6).



Рисунок 6 – одношнековый экструдер Brabender Kompaktextruder KE19 с линией транспортера

На компьютере в программном обеспечении WINEXT для Windows устанавливали значения температурного профиля экструзии в 4 зонах,

ориентируясь на литературные данные (Rivas, 2017; Giles, 2004; Asrar, 2003) Температурные значения, при которых были получены удовлетворительные филаменты.

Полимер в виде гранул засыпали в загрузочный бункер. Через время, когда гранулы расплавились, из сопла экструдера выходил филамент, который поступал на движущийся транспортер.

Ориентируясь на цвет, консистенцию и структуру прутка, производили регулировку температурного профиля и скорость вращения шнека в ходе процесса экструзии. При уменьшении температуры наблюдалось неравномерное плавление гранулята, вследствие чего филамент выходил с нерасплавленным полимером. При увеличении температуры наблюдалась деградация полимерного материала, сопровождавшаяся потемнением полимерного прутка.

После экструзии, полученные филаменты (Рисунок 7) визуально сравнивались на наличие пузырьков воздуха, равномерность и шероховатость.

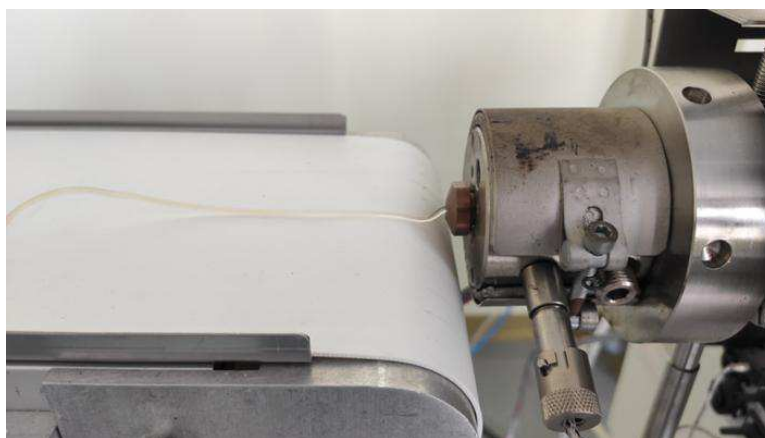


Рисунок 7 – Получение филамента методом экструзии

Полученный экструзией филамент из П(ЗГБ/ЗГВ) 90-10 был немного желтоватого цвета, не имел вкраплений, гладкий и блестящий, вне зависимости от добавления пластификатора.

Филамент из П(ЗГБ/ЗГВ) 82-18 имел почти прозрачный, немного беловатый оттенок, равномерный без вкраплений, гладкий и блестящий, вне зависимости от добавления пластификатора.

Полученные филаменты далее гранулировали на автоматическом грануляторе Brabender (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Автоматический гранулятор Brabender

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.

## **2.6 Исследование свойств полученных гранул из П(ЗГБ/ЗГВ)**

### **2.6.1 Определение плотности полимерных гранул**

Определяли плотность гранул методом обмера и взвешивания, описанным в ГОСТ 15139-69 [52]. 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:

$$\rho = m/V \quad (1)$$

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 Дифференциально-сканирующая калориметрия (ДСК)**

Термический анализ образцов 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  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $320^{\circ}\text{C}$ .

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 ( $T_{\text{дегр}}$ ).

### **2.6.3 Исследование динамики деградации пленок и гранул из П(ЗГБ/ЗГВ) и из П(ЗГБ/ЗГВ)/пластификатор в лабораторных почвенных экосистемах**

Деградацию гранулированных форм исследовали в лабораторных почвенных микросистемах. 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 ( $\text{pH} - 7,2$ ). 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  $26^{\circ}\text{C}$  и влажности 60 %. Эксперимент проводился в течение 7 месяцев с экспериментальными точками в конце каждого месяца (всего 7 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  $32^{\circ}\text{C}$  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).

#### 2.6.4 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 посеvy 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/ЗГВ) для выделения деструкторов (разведения  $10^5$ ,  $10^6$ ). Состав сред приведен в Таблице 2.

Таблица 2 – Состав элективных сред для деструкторов ПГА

Среда для бактерий-деструкторов ПГА	
Компонент	Масса (на 1 л), г
П(ЗГБ/ЗГВ)	2,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,488
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4,686
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
Цитрат железа	0,05
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,005
Дрожжевой экстракт	0,05

Гидролизат казеина	0,1
Агар	20,0
Вода водопроводная	1 л

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

$$X=(a \times b)/(c \times d) \quad (3)$$

где а – среднее количество колоний на чашке, b – разведение, из которого сделан высев, с – количество вносимой суспензии (мл), d – масса исследуемой почвы, г (или объём суспензии, мл).

### **2.6.5. Исследование микроструктуры поверхности**

Микроструктуру образцов полученных полимерных 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.

### **2.7 Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам (Волова, 1996) с использованием программного пакета Microsoft Excel 2010 для Windows 10. 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 12 страниц

## Выводы

В гетеротрофных условиях синтезированы и исследованы образцы полимеров различного химического состава: сополимер поли-3-гидроксibuтирата - 3 гидроксивалерата с включением 3 ГВ 10мол.% и 18 мол.%; Доказано, что увеличение добавки валерата калия приводит к увеличению содержания 3ГВ и снижению концентрации биомассы;

Получена серия гранул из сополимера поли-3-гидроксibuтирата-3-гидроксивалерата с включением 3ГВ 10мол.% и 18 мол.% с добавлением 15 % пластификатора триацетина. Доказано в лабораторных почвенных экосистемах, что пластификатор незначительно влияет на деградацию гранул, однако включение 3ГВ приводит к более быстрой деградации гранул в 1,5 раза.

Методом экструзии получены гранулы на основе сополимера: П(3ГБ/3ГВ) 10мол.%, П(3ГБ/3ГВ) 10мол.% + триацетин, П(3ГБ/3ГВ) 18мол.%, П(3ГБ/3ГВ) 18мол.% + триацетин. Установлено, что разная концентрация 3ГВ приводит к изменению внешних характеристик гранул;

Из образцов, использованных в исследовании биodeградации, были идентифицированы такие штаммы микроорганизмов как *Aspergillus fumigatus*, *Pseudomonas putida*, род *Penicillium*, *Variovorax paradoxus*, *Roseomonas massiliae*, *Delftia acidovorans*. Для гранул П(3ГБ/3ГВ) 10мол.% и П(3ГБ/3ГВ) 10мол.% + триацетин характерна меньшая численность бактериальных деструкторов по сравнению с гранулами П(3ГБ/3ГВ) 18мол.%, П(3ГБ/3ГВ) 18мол.% + триацетин.

На основании полученных данных о деградации гранул 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.

## Список использованных источников

1. Литвяк, В. В. Перспективы производства современных упаковочных материалов с применением биоразлагаемых полимерных композиций // Промышленная и аграрная экология, 2019; 2:84–94
2. Описание и технологии переработки: Экструзия [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.polymerbranch.com/termoplast/view/5.html> Дата обращения: 9.04.2020.
3. Pinchuk LS (Belarus), Lashkina EV (Belarus), Ermolovich OV(Belarus), Stepanenko AB (Belarus), Litvyak V.V (Belarus), authors; Institute of Metal-Polymer Systems V. A. Belogo National Academy of Sciences of Belarus, assignee. A method manufacturing a biodegradable film. Patent № 18675. BY, МПК7 В 29С 47/08, С 08J 5/18; application № 20120072; 2014 Oktober 30. Afitsyny buleten. 2014:5 p. Russian.
4. Hablot, E. Thermal and thermo-mechanical degradation of poly(3-hydroxybutyrate)-based multiphase systems / E. Hablot, P. Bordes, E. Pollet, L. Averous // Polymer Degradation and Stability, 2008. –№ 93. – С.413–421.
5. Асякина Л. К., Дышлюк Л. С., Бабич О. О. Исследование устойчивости к внешним воздействиям биоразлагаемых полимерных материалов //Верстка: Шишкова АВ| Редактор/корректор: Савченко ЕС Редакция журнала «Современные научные исследования и разработки», – 2017. – С. 36.
6. Богатова И. Б. Получение биосинтетических полимерных упаковочных материалов решение проблемы полимерного мусора //Вестник Волжского университета им. ВН Татищева. – 2015. – №. 1 (23).
7. Зубова О. А., Сакаева Э. Х. Биоразлагаемые полимеры и перспектива их применения //химия и инженерная экология-ХVIII. – 2018. – С. 42-45.
8. ГОСТ 12302-2013 Пакеты из полимерных пленок и комбинированных материалов. Общие технические условия, введ. 01.01.2014

9. МЗ России № 880-71 Санитарно-химические исследования изделий, изготовленных из полимерных и других синтетических материалов, предназначенных для контакта с пищевыми продуктами

10. Асякина Л. К. Технологическая схема производства биоразлагаемой упаковки и исследование хранимоспособности пищевых продуктов в такой упаковке //Успехи современного естествознания. – 2016. – №. 12-1. – С. 9-13.

11. Кадыров Ш. Т., Хайруллин Р. З. Обзор основных тенденций в производстве биоразлагаемой гибкой полимерной упаковки //Научный альманах. – 2017. – №. 4-3. – С. 286-289.

12. Кадырова А. Т., Хайруллин Р. З. Оценка целесообразности использования биодеструктурируемых добавок при производстве гибкой полимерной упаковки //Научный альманах. – 2017. – №. 4-3. – С. 290-293.

13. Курманбаева К. Биоразлагаемая упаковка как один из путей решения проблем экологии //Скиф. Вопросы студенческой науки. – 2018. – №. 4 (20).

14. Дышлюк Л. С., Просеков А. Ю. ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет» Поступила в редакцию 18.04. 2018 г. – 2019.

15. Клинков А. С., Соколов М. В., Беляев П. С. Утилизация и вторичная переработка полимерных материалов. – федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования" Тамбовский государственный технический университет", 2005.

16. Пономарева В. Т., Лихачева Н. Н., Ткачик З. А. Использование пластмассовых отходов за рубежом //Пластические массы. – 2002. – №. 5. – С. 44-48.

17. Тертышная Ю. В., Шибряева Л. С. Биоразлагаемые полимеры: перспективы их масштабного применения в промышленности России //Экология и промышленность России. – 2015. – Т. 19. – №. 8. – С. 20-25.

18. Тертышная Ю. В., Подзорова М. В., Попов А. А. Вторичное использование полимерных материалов: смеси полиэтилен–полилактид //Экология и промышленность России. – 2016. – Т. 20. – №. 7. – С. 22-25.

19. Мяленко Д. М., Шалаева А. В., Пряничникова Н. С. Анализ возможности и направлений разработки биоразлагаемой упаковки для молочной продукции //Эстафета поколений. – 2010. – С. 22-24.
20. Крутько Э. Т., Прокопчук Н. Р., Глоба А. И. Технология биоразлагаемых полимерных материалов: учебно-методическое пособие для студентов вузов по специальности 1-48 01 02" Химическая технология органических веществ, материалов и изделий" специализации 1-48 01 02 04" Технология пластических масс". – 2014.
21. 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, А. J. Sinskey // Высокомолекулярные соединения, Серия А, 2013, том 55, № 7, с. 775–786.
22. Бессонова, В.А. Полигидроксиалканоаты – новые биоматериалы / В.А. Бессонова, К.М. Ануфриева. // – 2016. – №7.
23. Chen G. *Plastics from Bacteria Natural Functions and Applications (Microbiology Monographs Volume 14)*. – 2010.
24. Шишацкая Е. И. Клеточные матрицы из резорбируемых полигидроксиалканоатов //Гены и клетки. – 2007. – Т. 2. – №. 2.
25. Önder Ö. С., Yilgör E., Yilgör I. Fabrication of rigid poly (lactic acid) foams via thermally induced phase separation //Polymer. – 2016. – Т. 107. – С. 240-248.
26. Chanprateep S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates //Journal of bioscience and bioengineering. – 2010. – Т. 110. – №. 6. – С. 621-632.
27. Williams S. F., Martin D. P. Applications of polyhydroxyalkanoates (PHA) in medicine and pharmacy //Biopolymers online. – 2005.
28. Штильман М. И. Полимеры медико-биологического назначения //Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2010. – Т. 52. – №. 9. – С. 1551-1569.
29. Пахомов В. И. и др. Технологии и оборудование для экструдирования растительного сырья. – 2018.



30. Ершов С. В., Черняев В. В. Исследование влияния барьерного гребня на процесс экструзии полимеров // Вестник Пермского национального исследовательского политехнического университета. Механика. – 2015. – №. 2.
31. Леваничев В. В. Разработка модели движения расплава полимера в экструдере // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2015. – №. 5 (5). – С. 7-13.
32. Урубков С. А. Разработка диетических экструдированных поликомпонентных продуктов со льном // Ползуновский вестник. – 2018. – №. 4. – С. 84-88.
33. Бортников В. Г. Основы технологии переработки пластических масс: Учебное пособие для вузов. – Л.: Химия .1983. – 304 с.
34. Asrar, J., Pierre, J. R. PHA compositions and methods for their use in the production of PHA films. U.S. Patent No. 6,620,869. 16 Sep. 2003.
35. 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, 2017. – Vol. 27. – №2. – P.122-128.
36. Giles Jr, H. F. Extrusion: the definitive processing guide and handbook. / H. F. Giles Jr, M. Mount III Eldridge, R. W. Jr. John // William Andrew, 2004.
37. Findlay R. H., White D. C. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium* //Applied and Environmental Microbiology. – 1983. – Т. 45. – №. 1. – С. 71-78.
38. Shrivastav A., Kim H. Y., Kim Y. R. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system //BioMed research international. – 2013. – Т. 2013.
39. Lageveen R. G. et al. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates //Applied and environmental microbiology. – 1988. – Т. 54. – №. 12. – С. 2924-2932.

40. Holmes P. A. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic //Physics in technology. – 1985. – Т. 16. – №. 1. – С. 32.
41. Tsugawa N. et al. Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for  $\gamma$ -carboxylation of osteocalcin //The American journal of clinical nutrition. – 2006. – Т. 83. – №. 2. – С. 380-386.
42. Fiedler S., Steinbüchel A., Rehm B. H. The role of the fatty acid  $\beta$ -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the *fadBA* operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes *phaJ* from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida* //Archives of microbiology. – 2002. – Т. 178. – №. 2. – С. 149-160.
43. Tsuge T. et al. Molecular cloning of two (R)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis //FEMS microbiology letters. – 2000. – Т. 184. – №. 2. – С. 193-198.
44. Lee R. T., Ashforth B. E. A meta-analytic examination of the correlates of the three dimensions of job burnout //Journal of applied Psychology. – 1996. – Т. 81. – №. 2. – С. 123.
45. Jurado L. A. P. et al. Molecular definition of the chromosome 7 deletion in Williams syndrome and parent-of-origin effects on growth //American journal of human genetics. – 1996. – Т. 59. – №. 4. – С. 781.
46. Волова Т. Г. и др. Влияние условий роста на накопление полиоксибутирата водородными бактериями //Прикладная биохимия и микробиология. – 1992. – Т. 28. – №. 2. – С. 221-230.
47. Vandi L.J., Chan C.M., Werker A., Richardson D., Laycock B., Pratt S. Extrusion of wood fibre reinforced poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)(PHBV) biocomposites: Statistical analysis of the effect of processing conditions on mechanical performance // Polymer degradation and stability, Vol. 159, 2019. С. 1-14.

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

49. Wang Y.D., Yamamoto T., Cakmak M. Processing characteristics and structure development in solid- state extrusion of bacterial copolyesters: Poly (3- hydroxybutyrate- co- 3- hydroxyvalerate) // *Journal of applied polymer science*, Vol. 61, № 11, 1996. С. 1957-1970.

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

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

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

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

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г.Волова  
подпись инициалы, фамилия

« 18 » июня 2021 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Исследование свойств и кинетики биодеструкции полимерных гранул на основе сополимера поли(3-гидроксисбутирата-со-3-гидроксивалерата) и пластификаторов  
тема работы

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный  
руководитель

  
подпись, дата

К.Т.Н., доцент  
должность, ученая степень

С. В. Барановский  
инициалы, фамилия

Выпускник

  
подпись, дата

А.А. Савченко  
инициалы, фамилия

Рецензент

 17.06.2021  
подпись, дата

К.Т.Н., доцент  
должность, ученая степень

В.А. Кожухов  
инициалы, фамилия

Красноярск 2021