

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
**«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2023 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

Взаимодействие микрофлоры пищевых продуктов с поверхностью  
полимерных плёнок из полигидроксиалканоатов в качестве упаковки

Руководитель	_____	д.б.н., профессор	С. В. Прудникова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		Р.В. Гордеева
	подпись, дата		инициалы, фамилия

Красноярск 2023

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Взаимодействие микрофлоры пищевых продуктов с поверхностью полимерных плёнок из полигидроксиалканоатов в качестве упаковки» представлена в объеме 38 страниц текстового документа, включает в себя 8 иллюстраций, 1 таблицу и список литературы, состоящий из 54 источников.

Ключевые слова: полигидроксиалканоаты, пленки, пищевая упаковка, микрофлора пищевых продуктов.

Цель и работы: оценка возможности использования плёнок из полигидроксиалканоатов (ПГА) в качестве пищевой упаковки.

В задачи исследования входила оценка выживаемости клеток типовых видов бактерий мясных и молочных продуктов при контакте с плёнками из ПГА в течение 3-х суток, а также в модельном опыте исследовать динамику численности бактерий на образцах мяса птицы (куриного филе), упакованных в полимерные плёнки из ПГА, в течение 7 суток хранения при 30 °С и 4 °С.

Работа направлена на решение проблемы создания биоразлагаемой упаковки для пищевых продуктов, отвечающей санитарно-гигиеническим требованиям при хранении продуктов питания в течение регламентированного срока, и обеспечивающая их микробиологическую безопасность.

Основные выводы и результаты работы:

1. Пленки из ПГА проявляли сопоставимые свойства с контрольными образцами из ПЭВД, ингибируя развитие типичной микрофлоры пищевых продуктов. При контакте с суспензиями чистых культур бактерий их выживаемость в течение 3-х суток снижалась в 10-1000 раз от исходной. Образцы плёнок из гомополимера П(ЗГБ) показали более сильные сдерживающие свойства, чем у сополимера П(ЗГБ/ЗГВ).

2. При контакте суспензии смешанной культуры бактерий, выделенных из охлажденного филе курицы, с образцами полимерных плёнок из ПГА, количество микроорганизмов через 3 суток инкубации при 30 °С снижалось для П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) в 12,8 и 11,5 раз, соответственно, по сравнению с исходной численностью микроорганизмов; оба типа материала одинаково эффективно подавляли развитие смешанной культуры бактерий.

3. Хранение охлажденного филе курицы в плёнке из П(ЗГБ) более эффективно сдерживало развитие мезофильных и психротрофных бактерий в течение 5 суток по сравнению с плёнками из П(ЗГБ/ЗГВ) и ПЭВД.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	6
1.1 Синтетические пластики — глобальная экологическая проблема .....	6
1.2 Биоразлагаемые плёночные материалы.....	8
1.3 Перспективы полигидроксиалканоатов в качестве упаковки для пищевых продуктов .....	12
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	18
2.1 Объекты исследования .....	18
2.2 Исследование взаимодействия полимерных плёнок с чистыми культурами бактерий мясных и кисломолочных продуктов .....	18
2.3 Оценка выживаемости клеток смешанной культуры бактерий мясных продуктов при контакте с плёнками ПГА .....	19
2.4 Исследование динамики численности бактерий на поверхности образцов мяса птицы, упакованных в полимерные плёнки .....	21
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	22
3.1 Оценка выживаемости клеток чистых культур бактерий мясных и кисломолочных продуктов при контакте с плёнками ПГА .....	22
3.2 Оценка выживаемости клеток смешанной культуры бактерий куриного филе при контакте с плёнками ПГА .....	27
3.3 Исследование динамики численности бактерий на поверхности образцов мяса птицы, упакованных в полимерные плёнки .....	29
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	32
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	33

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время синтетические полимеры используются повсеместно, особенно нельзя представить без пластика сферу пищевой промышленности. Массовое использование полимерной упаковки создаёт большой объём пластиковых отходов. Из 500 миллиардов пластиковых пакетов перерабатываются только 3%, что приводит к экологическим проблемам, которые касаются не только ископаемых ресурсов, но и захоронения отходов и сжигание. Всё это приводит к загрязнению воздуха и воздействию на здоровье человека, поэтому разработка биоразлагаемой плёночной упаковки стала необходимостью [26].

Научные исследования в этой области сконцентрировались на разработке биополимеров, которые смогут продлить срок годности и качество пищевых продуктов, а также заменят экологически вредные пластики. Перспективными материалами для разработки упаковок являются полигидроксиалканоаты (ПГА), известные биоразлагаемостью, биосовместимостью и возможностью биологического получения из возобновляемых ресурсов путём бактериального синтеза [5]. Благодаря своим свойствам ПГА привлекают всё большее внимание со стороны промышленных отраслей и научно-исследовательских организаций.

В настоящее время приоритетной задачей в области питания является обеспечение населения здоровыми и безопасными продуктами. Одним из основных принципов решения вопроса является разработка методов для увеличения сроков хранения продукции. Риски для здоровья, связанные с микробной контаминацией, по-прежнему остаются одной из основных проблем в области обеспечения продуктами питания и использования пищевой упаковки. Мясные и кисломолочные продукты являются благоприятной средой для развития микроорганизмов, в том числе и болезнетворных, которые могут вызвать порчу мясного и молочного сырья, а также являться потенциальной угрозой для здоровья человека [19].

Исходя из вышеизложенного, одним из важнейших свойств упаковочных материалов является снижение скорости микробной контаминации для продления сроков хранения пищевых продуктов [13].

Цель работы заключалась в оценке возможности использования пленок из полигидроксиалканоатов (ПГА) в качестве пищевой упаковки.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) Оценить выживаемость клеток чистых культур типичных бактерий мясных и молочных продуктов при контакте с плёнками из ПГА в течение 3-х суток;

2) Оценить выживаемость клеток смешанной культуры бактерий мясных продуктов (мясо птицы) при контакте с плёнками из ПГА в течение 3-х суток;

3) Исследовать динамику численности бактерий на образцах мяса птицы (куриного филе), упакованных в полимерные плёнки из ПГА, в течение 7 суток хранения при 30 °С и 4 °С.

## ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Синтетические пластики — глобальная экологическая проблема

Пластмассы являются одним из важнейших открытий человечества и сегодня их можно встретить повсеместно. Пластики на основе нефти и её производных универсальны, долговечны, а также отличаются дешевизной [43]. Эти материалы обладают широким спектром применения, например, использование в сфере здравоохранения, строительства, потребительских товаров. Более трети потребления приходится на производство упаковки для пищевых продуктов и напитков, что является самым крупным сегментом использования пластиков [27].

Распространение изделий из синтетических пластмасс напрямую связано с их незаменимостью в данный момент в некоторых сферах, что напрямую в совокупности с их характеристикой определяет высокий уровень использования человеком [17, 35].

Мировое производство пластика в 2017 году достигло 348 миллионов тонн. Около половины из них - одноразовый пластик (пакеты). В 1950 году производство не превышало пяти миллионов тонн. Ежегодно, производство пластических масс увеличивается на 8 процентов. Если нынешние тенденции в области производства и обращения с отходами сохранятся, к 2050 году примерно 12 000 тонн пластиковых отходов будут находиться на свалках или в естественной среде [33, 51, 53].

Пластмассы стали важной частью человеческой жизни, но неразлагаемость и одноразовые свойства пластика привели к падению его репутации за последние годы [37]. Со временем становится очевидно, что их достоинства превращаются в недостатки, изделия постепенно утрачивают потребительские свойства, а потребность избавиться от них представляет ряд трудностей и проблем [21]. Такие отходы не поддаются гниению и

саморазрушению; аккумулируются, загрязняя населённые пункты, лесонасаждения и водоёмы [49].

Нельзя не отметить тот факт, что пластмассы на основе нефтехимии можно назвать комплексной угрозой, включающей как физическое, бытовое загрязнение, так и химическую опасность, потому что отходы макропластиков — это не только мусорные полигоны, но и вода, которую мы пьём, воздух, которым мы дышим и изменённые в разной степени биоценоотические сообщества [4].

Макропластики являются отдельной проблемой, так как появляются в ходе постепенной фрагментации пластиковых отходов. В ходе дальнейшего разложения, когда речь идёт о фрагментах менее 5 мм, образуются микропластик. К сожалению, на данный момент повсеместность и широкое распространение микропластика известна даже в самых неожиданных и отдалённых местах нашей планеты, ведь попадая в толщу воды они быстро рассредоточиваются в мировом океане, в том числе, из-за разнообразия форм и плотности полимеров. Имеются многочисленные доказательства отложения микропластика в организмах водной фауны, попадающий туда посредством заглатывания. Это приводит как к физическим травмам, воспалительным процессам, так и к проникновению различных вредных веществ в организм (эндогенные пластичные добавки, металлы, патогенные микроорганизмы и др.) [34].

Начиная с этапа производства пластмасс в процессе переработки полимерных материалов происходит выделение газообразных продуктов, органических кислот, фенола, стирола, которые, безусловно, влияют на здоровье человека [12].

Переработка пластиковых отходов представляет собой отдельную экологическую проблему, вызванную экспоненциальным ростом его производства и накопления [18].

Захоронение как способ утилизации отходов пластических масс приводит к сокращению земельных угодий по причине долгого разложения пластика,

среднее время разложения пластмассовых изделий колеблется от 200 до 1000 лет [23]. Утилизация таким образом влечёт за собой ущерб окружающей среде. На полигонах в результате сбраживания образуется «свалочный газ», а в недрах полигона часто формируется токсичный фильтрат, поэтому уничтожение на свалках можно считать вынужденной мерой [24].

Чтобы преодолеть проблемы, связанные с производством и переработкой пластика, внимание исследователей сконцентрировалось на поиске безопасных, разлагаемых альтернативных вариантов для замены синтетических пластика [1].

## **1.2 Биоразлагаемые плёночные материалы**

В настоящее время решение проблемы утилизации «полимерного мусора» сосредоточено на поиске приоритетных путей решения этой глобальной задачи. Россия, США, страны Европы отдают предпочтение такой мысли: необходимо не маскировать проблему утилизации и переработки пластиковых отходов, а создать альтернативу, точнее, биodeградируемые полимерные материалы.

Учёные в области химии и физики полимеров развивают идею о благоприятном состоянии окружающей среды. В конце 20 века был представлен рынок био- и фоторазрушаемых полимеров, производители из Германии, США и Нидерландов представили первые полимерные материалы, способные разлагаться без ущерба для здоровья населения и природы.

Создание альтернативных пластмасс основывается на введении в цепь полимера активных добавок, содержащих функциональные группы. Суть заключается в том, что перспективные материалы способны разлагаться под действием микроорганизмов (биоразлагаемые) и ультрафиолетового излучения (фоторазлагаемые). Такой подход к разработке полимеров противоположен традиционному, так как его цель — сохранить метаболизм природных биосистем [15, 22].

Одним из перспективных материалов среди биodeградируемых полимеров считают полигидроксиалканоаты. Они являются резервными макромолекулами бактерий и синтезируются при условии ограниченного количества питательных веществ, но с избытком источника углерода. В первую очередь, эти полимеры можно считать высокотехнологичными материалами 21 века за счёт совокупности уникальных свойств, которые далее будут подробно рассмотрены [5, 44].

Полигидроксиалканоаты (ПГА, в англоязычной литературе PHA) новый класс природных полимеров, синтезируемых микроорганизмами. Это термопластичные линейные полиэфиры гидроксипроизводных алкановых кислот. В последние годы ПГА привлекли большое внимание из-за схожести свойств с нефтехимическими полимерами [25, 45].

Несмотря на привлекательную перспективу, по состоянию на 2019 год доля рынка биопластиков составляет примерно 1% от годового мирового производства пластмасс, составляющего около 359 тонн [31].

ПГА открыли в 1888 году, когда Мартинус В. Бейеринк, один из соучредителей экологической микробиологии, впервые обнаружил гранулы ПГА в цитоплазме. В течение следующих 80 лет ученые продолжали изучать микробный синтез различных полигидроксиалканоатов [48].

Биоразлагаемые полимеры были разработаны несколько десятилетий назад, однако, коммерческой зрелости достигали медленно. Это объясняется тем, что в большинстве случаев они более дорогие и менее прочные, чем традиционные пластмассы. Однако, с появлением новых крупномасштабных производственных систем их стоимость снижается, а за счет смешивания и сложных методов полимеризации полигидроксиалканоаты становятся прочнее [2].

Семейство полимеров ПГА считается биоразлагаемым, нетоксичным, экологически безопасным, а также могут производиться из возобновляемых ресурсов. Они обладают физико-химическими свойствами, практически не уступающими свойствам синтетических пластиков: барьерные свойства,

гибкость, пластичность. Более того, в естественных условиях ПГА подвергаются полному разложению за короткий промежуток времени, время разложения зависит от состава полимера [8, 32].

Результаты многих экспериментов показали, что с точки зрения спроса на энергию и выбросов парниковых газов производство и использование всех биопластиков более выгодно, чем синтетических пластмасс. Есть и обратная сторона медали, биопластики на основе крахмала и кукурузы оказывают сильное воздействие на окружающую среду из-за подкисления почвы и эвтрофикации поверхностных вод из-за удобрений и химикатов, используемых для выращивания сырья.

Среди различных типов биопластиков преимуществом ПГА является то, что в основном они производятся из отходов, что позволяет избежать возникновения вышеупомянутых негативных воздействий на окружающую среду [47].

В процессе расщепления ПГА основополагающую роль играют микроорганизмы, которые способны ассимилировать разнообразные органические соединения, обеспечивая самоочищение окружающей среды от загрязняющих веществ. Наряду с этим на деградацию могут влиять другие факторы, например, условия окружающей среды и такие свойства ПГА, как их состав, кристалличность, наличие добавок и площадь поверхности [7, 16].

Процесс распада в биологической среде до безопасных веществ зависит от ряда факторов, влияющих на скорость процесса разложения:

- микробными деполимеразами гидролизуются только эфирные соединения R-конфигурации, поэтому стереоконфигурация имеет важное значение для расщепления полимера;

- быстрее идёт распад полимеров с меньшей кристалличностью;

- чем ниже масса молекул полигидроксиалканоата, тем быстрее идёт разложение в окружающей среде;

- значимым фактором является состав полимера и наличие сополимеров в ПГА.

ПГА могут расщепляться как внутри-, так и внеклеточно. Первое происходит во время фазы накопления в отсутствие стабильного источника углерода под действием деполимераз (внутриклеточные ферменты). Внеклеточное же расщепление, напротив, происходит под действием внеклеточных гидролаз, которые с внутриклеточными ПГА не взаимодействуют по причине того, что внеклеточные гранулы – это высококристаллизованные полимеры [54].

Сферы применения природных полиэфиров оксикарбоновых кислот очень обширна: в промышленности, в качестве упаковочных материалов (биоразлагаемая упаковка), в медицине и фармакологии (лекарственные формы длительного действия, создание матриц и резервуарных мембран, микросферы для контролируемой доставки в организм лекарств широкого спектра применения, шовные и перевязочные материалы). Полигидроксиалканоаты также достаточно широко включены в предметы домашнего обихода, из них изготавливают дозаторы для мыла/шампуня, держатели для зубных щеток, корзины для бумаг, чашки и т.д. Упаковочные пленки ПГА были разработаны для сумок, ламинированных пленок, контейнеров, бумажных покрытий, одноразовых изделий (бритвы, посуда, пеленки, предметы женской гигиены, чашки, медицинские хирургические одежды, ковровое покрытие, крышки). Помимо перечисленного, производные ПГА мономеры могут использоваться в качестве источников энергии, таких как питательные вещества и биотопливо [28, 40, 46, 50].

Особое внимание хотелось бы обратить на то, что ПГА хорошо соответствуют большинству норм и требований для разработки в качестве эффективных упаковочных материалов как для продуктов с коротким, так и с длительным сроком хранения [14]. Их высокие барьерные свойства предотвращают окислительную порчу продуктов, и, согласно исследованиям, по сравнению с классическим упаковочным материалом HDPE (самый безопасный пластик), качество пищевых продуктов по меньшей мере такое же хорошее, когда используется ПГА [38].

Более низкое воздействие ПГА на окружающую среду делает их идеальной альтернативой нефтехимическим полимерам, особенно для создания упаковочных материалов. В настоящее время ПГА в основном применяются в виде контейнеров, пленок и упаковки [30, 39].

### **1.3 Перспективы полигидроксиалканоатов в качестве упаковки для пищевых продуктов**

Пищевая упаковка — одна из основных областей применения биопластиков. В контейнеры, пленку и пенопласты из этих материалов упаковывают мясо, молочные продукты, выпечку и овощи. Из таких пластиков делают также одноразовые бутылки и стаканы для воды, молока; тарелки, миски и подносы. Из них же изготавливают мешки для сбора и компостирования пищевых отходов, мешки для супермаркетов и сельскохозяйственную пленку. Производители продуктов питания и напитков, стремясь поднять авторитет в глазах населения, всё чаще стали задумываться о внедрении и использовании упаковки из биоразлагаемых пластиков [2].

Существуют определённые требования, накладываемые на материалы, используемые в качестве упаковки для пищевых продуктов:

- материал должен защищать продукт от пыли, влаги, обезвоживания, микробного и химического загрязнения, УФ-излучения и механических повреждений;
- упаковочный материал не должен способствовать изменению органолептических свойств пищевых продуктов;
- упаковка должна способствовать сохранению чистоты пищевых продуктов;
- при экстремальных температурах (низких) соблюдение стабильности пищевых продуктов;

- поддержка измененной атмосферы (например, атмосферы азота) в свободном пространстве продукта, особенно для хранения готовых к употреблению закусок [36].

Наиболее распространенными пластиковыми материалами, используемых в качестве упаковки, является полиэтилен, полипропилен, поливинилхлорид, полистирол, полиэтилентерефталат и т. д.

Полиэтилен высокого давления имеет самый высокий выход, составляя приблизительно 48%, поэтому чаще всего полиэтилен выбирают в качестве экспериментального материала во многих исследованиях [20]. В настоящей работе ПЭВД использовался в качестве контроля.

Из основных характеристик полиэтилена можно выделить его гидрофобные свойства, биоинертность (полное отсутствие реакции тканей организма на материал), а также низкий предел текучести, что зачастую ограничивает его использование. Полиэтилен как высокой, так и низкой плотности легко поддается формованию. Молекулярная масса колеблется в пределах от 50 до 200 Да. До отсутствия альтернативных пластиков часто применялся в целях эндопротезирования (челюстно-лицевая хирургия), в настоящее время практически не используется в сфере медицины [15].

ПГА известны хорошей биоразлагаемостью, биосовместимостью и возможностью биологического получения из возобновляемых ресурсов путём бактериального синтеза [17].

Помимо этого, природные полиэфиры обладают следующими свойствами:

- Термопластичность
- Неопределенная стабильность на воздухе
- Антиоксидантность
- Оптическая активность
- Пьезоэлектрический эффект
- Нетоксичность

- Устойчивость к действию УФ-лучей
- Инертность
- Гидрофобность
- Нерастворимость в воде и относительная устойчивость к гидролитическому разложению
- Стойкость к жирам и маслам
- Легкая поддаваемость к окрашиванию [41, 39, 52].

Опираясь на вышеперечисленные свойства, можно сделать вывод, что ПГА являются конкурентоспособными кандидатами на замену нефтехимических пластиков. Они являются экологически чистыми материалами и широко используются в качестве упаковки для пищевых продуктов [49].

Среди биоразлагаемых материалов наиболее доступный и изученный представитель ПГА, поли-3-гидроксibuтират (П(ЗГБ)). Это первый изолированный полигидроксиалканоат, формула  $(C_4H_6O_2)_n$ , представляет собой гомополимер D(-)-3-п-гидроксимасляной кислоты и изотактический полиэфир с регулярно повторяющимися звеньями  $(C_4H_6O_2)$  Его отличие от синтетических полимеров заключается в том, что оптически активен и в растворе закручивается по спирали, кристаллизуясь в сферолиты [6].

Гранулы П(ЗГБ) образуют скопления в цитоплазме клетки, где находятся в подвижном аморфном состоянии. Они образованы фибриллами, представляющими собой двуцепочечные волокна правозакрученных лент. Ленты образуют поверхностно-активные полимерные кристаллы. В гранулах также можно обнаружить рестриктивные фосфолипидные мембраны, усиленные белковыми структурами, расположенные монолинейно у полимерных цепей. Отличаются высокой гидрофобностью [20].

По характеристике физико-механических свойств, поли-3-гидроксibuтират обладает высокой хрупкостью и недостаточной эластичностью, степень кристалличности выше 70%. Эти факторы влияют на его использование в качестве упаковочных материалов.

Получение других типов ПГА требует достаточно сложных решений, включая поиск новых продуцентов, подбор питательных сред и условий культивирования либо конструирование генетически модифицированных штаммов [42]. ПЗГБ обладает рядом схожих физико-механических свойств с полипропиленом. При похожих значениях температуры плавления и кристаллизации, стеклования и других процессах ПЗГБ обладает меньшей молекулярной массой, благодаря чему после воздействия высоких температур становится хрупким и быстрее разрушается, поэтому требует введения пластификаторов, либо схожих модификационных процессов.

Один из основных подходов по модификации механических свойств П(ЗГБ), увеличению его эластичности и механической прочности является получение композитов с другими материалами синтетического и природного происхождения. Общее требование, представляемое к материалам синтетического происхождения, является биосовместимость, сопоставимая с биосовместимостью ПГА [3].

Природный полиэфир, являющийся сополимером, поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат) [П(ЗГБ-со-ЗГВ)] – востребован и хорошо охарактеризован из-за его высокого коммерческого потенциала. Однако применение ПГА, и, в частности, П(ЗГБ-со-ЗГВ), ограничено их высокой ценой [9].

Большую обеспокоенность в области питания также представляет решение вопроса об обеспечении населения здоровыми и безопасными продуктами. Одним из основных принципов решения проблемы является разработка методов для увеличения сроков хранения продукции. Риски для здоровья, связанные с микробной контаминацией, по-прежнему остаются одной из основных проблем в области использования пищевой упаковки [11, 19].

Если раньше цель упаковки заключалась в защите продукта от загрязнения, то в нынешних реалиях она выполняет множество функций, таких как презентабельный вид, информативное содержание информации о товаре, обеспечение наилучших условий при проведении технологических и

логистических процессов (охлаждение, складирование и/или размещение при холодильном хранении, поддержание оптимальной среды в процессе хранения), удобство использования продукта для потребителей (легкость вскрытия и возможность повторного закрытия, пригодность к доведению до кулинарной готовности и разогреванию). Полимерная упаковка существенно изменяет сроки годности пищевых продуктов, но не устраняет главные насущные проблемы.

На данный момент можно выделить новые и перспективные решения в области развития упаковочных материалов, которые в будущем, в идеале, можно применить к созданию биоразлагаемых плёночных материалов:

- получение новых плёночных материалов с антимикробными и антиокислительными свойствами;
- введение в упаковку новых элементов, обеспечивающих ей дополнительные функции по контролю различных параметров, связанных с обеспечением прослеживаемости, безопасности и качества упакованного продукта.

Успехи упаковки очевидны, но не окончательны. Многие отечественные и зарубежные ученые прогнозируют выход упаковки продуктов питания на качественно новый уровень, в том числе, благодаря открытию биоразлагаемых плёночных материалов [19].

Особое значение уделяется упаковке для мясных продуктов, так как мясо – это благоприятная среда для развития многочисленных микроорганизмов, в том числе и болезнетворных, вызывающих порчу мясного сырья. Это обусловлено присутствием в мясе значительного количества воды и всех питательных веществ, необходимых для развития подавляющего числа микроорганизмов [20].

Технический прогресс в области переработки кисломолочных продуктов так же не может осуществляться в полной мере без разработки новейших способов хранения и упаковки [10]. ПГА уже нашли своё применение для

упаковки молочной продукции, их используют для покрытия её внутренней поверхности [31].

Исходя из вышеизложенного, одним из важнейших свойств упаковочных материалов является снижение скорости микробной контаминации для продления сроков хранения пищевых продуктов. Для сохранения мяса в охлажденном состоянии применяются разные способы упаковки из полимерных материалов. В основном применяются синтетические полимеры пищевого назначения [13, 29].

Полигидроксиалканоаты подают большие надежды, и, преодолев барьеры, связанные с экономической составляющей производства, станут одной из наиболее перспективных и привлекательных систем для экологически чистой упаковки следующего поколения. Также, улучшив барьерные свойства против газов / водяных паров и сбалансировав механические свойства, массовое производство упаковочных материалов из ПГА станет более реализуемым. Однако, на данный момент практическому применению биоразлагаемой упаковки для пищевых продуктов на рынках по-прежнему препятствуют перечисленные затруднения [43].

## ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

Объектами исследования служили два типа пленок из ПГА: гомополимер поли(3-гидроксибутират) [П(ЗГБ)]; сополимер поли(3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат) [П(ЗГБ/ЗГВ)] с содержанием ЗГВ 15%. ПГА пленки были получены методом экструзии расплава полимеров с применением лабораторного миниэкструдера «Brabender E 19/25 D» в Лаборатории инновационных препаратов и материалов ИФБиБТ.

В качестве контроля использовали плёнки из полиэтилена высокого давления (ПЭВД).

В настоящей работе проведены эксперименты, позволяющие оценить выживаемость клеток микроорганизмов при контакте с плёнками. Для исследований в качестве тестовых микроорганизмов были использованы:

1) чистые культуры типовых видов микрофлоры мясной и молочной продукции: *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* и *Lactobacillus acidophilus*;

2) смешанная культура бактерий, выделенная с поверхности образцов мяса птицы: охлаждённое куриное филе производства ООО Межениновская птицефабрика;

3) микроорганизмы образцов куриного филе, упакованных в полимерные пленки и хранящихся при температуре 4 °С в течение 7 суток.

### 2.2 Исследование взаимодействия полимерных плёнок с чистыми культурами бактерий мясных и кисломолочных продуктов

Для исследования использовали суспензии суточных культур тестовых микроорганизмов *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens* и *Lactobacillus acidophilus*. Культуры бактерий *B. subtilis*, *M. luteus*, *P. fluorescens*

выращивали на скошенном мясопептонном агаре Nutrient agar («HiMedia», Индия), культуру *L. acidophilus* – на селективной среде лактобакагар (Оболенск) при 30 °С, затем делали смыв стерильным изотоническим раствором NaCl. Оптическую плотность суспензий определяли с помощью денситометра DEN-1 («Biosan», Латвия), и доводили по стандарту мутности МакФарланда до 0,5 единиц, что соответствовало  $1 \times 10^8$  клеток/мл.

Исследование выживаемости микроорганизмов при контакте с поверхностью полимерных пленок проводили с использованием техники принудительной контаминации. Из образцов пленок вырезали диски диаметром 1 см, дезинфицировали 70% этанолом, трижды промывали стерильной водой и раскладывали в 24-луночные планшеты («TPP», Швейцария). На поверхность пленочных образцов асептически наносили 200 мкл суспензии бактерий, распределяя каплю по поверхности, затем помещали планшеты в термостат и инкубировали при 30 °С в течение 3-х суток. Через 36, 48 и 72 часа экспозиции пленки помещали в пробирки типа Эппендорф с коническим дном, встряхивали в стерильном изотоническом растворе NaCl на шейкере Bio Vortex V1 («Biosan», Латвия) в течение минуты и делали высев смывов на МПА или лактобакагар, соответственно, из разведений  $10^1$ - $10^5$ . Количество выросших колоний учитывали через 2-3 суток инкубирования. Эксперимент проводили в 3-кратной повторности.

В ходе работы был произведён подсчёт выросших колоний, определено среднее количество микроорганизмов на  $1 \text{ см}^2$  и высчитана ошибка среднего. По полученным данным были построены диаграммы для сравнения выживаемости микроорганизмов с разными типами плёнок.

### **2.3 Оценка выживаемости клеток смешанной культуры бактерий мясных продуктов при контакте с плёнками ПГА**

В работе использовали смешанную культуру бактерий КМ-1, выделенную из образца мяса птицы (ООО Межениновская ПФ). В состав смешанной

культуры входили грамположительные палочки и кокки (рис. 1). Идентификацию бактерий смешанной культуры проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) с использованием масс-спектрометра Microflex («Bruker», Германия).

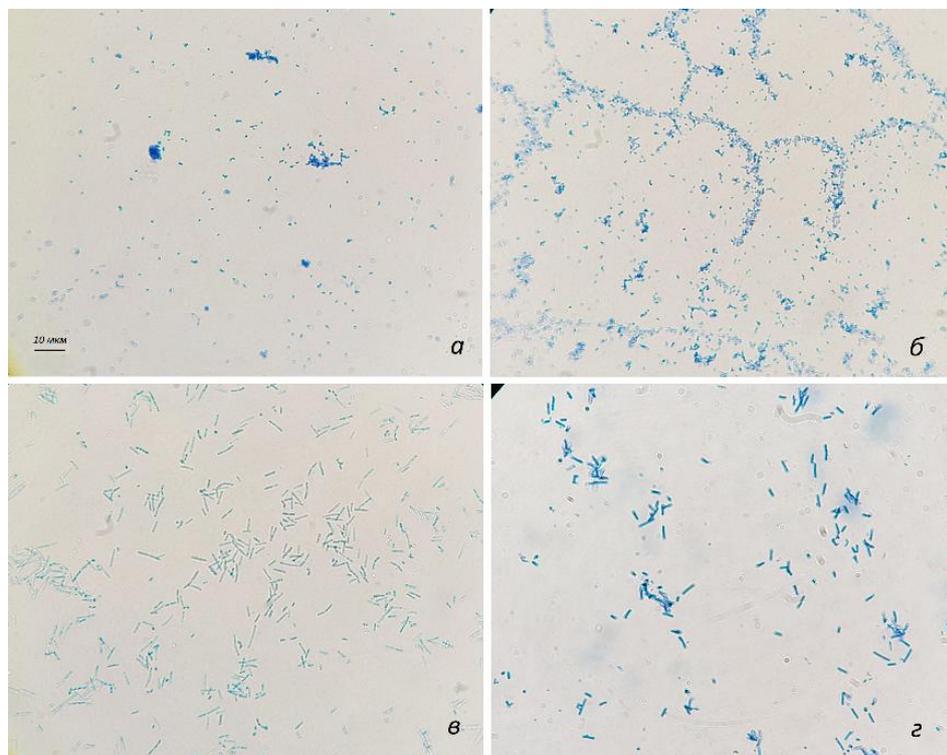


Рисунок 1 – Микрофотографии бактерий смешанной культуры КМ-1:  
*а* – *Aeromonas*, *б* – *Carnobacterium*, *в* – *Clostridium*, *z* – *Lactobacillus*  
(прижизненные препараты, окраска метиленовым синим)

Смешанную культуру бактерий мяса птицы выращивали на скошенном мясопептонном агаре при 30 °С в течение суток, затем делали смыв стерильным изотоническим раствором NaCl. Исследование выживаемости микроорганизмов смешанной культуры КМ-1 проводили аналогично чистым культурам, как описано в разделе 2.2.

В ходе работы был произведён подсчёт выросших колоний, определено среднее количество микроорганизмов на 1 см<sup>2</sup> и высчитана ошибка среднего. По полученным данным были построены диаграммы для сравнения выживаемости микроорганизмов с разными типами плёнок.

## **2.4 Исследование динамики численности бактерий на поверхности образцов мяса птицы, упакованных в полимерные плёнки**

Для изучения динамики численности бактерий на поверхности мяса птицы, упакованного в полимерные пленки, в процессе хранения использовали образцы охлажденного куриного филе (ООО Межениновская ПФ), приобретенные в розничной сети. Кусочки куриного филе весом 1 г асептически отрезали стерильным скальпелем, упаковывали в соответствующую пленку (П(ЗГБ), П(ЗГБ/ЗГВ) или ПЭВД) и помещали в стерильные 12-луночные планшеты («ТРР», Швейцария). Затем планшеты выдерживали в течение 7 суток в холодильнике при 4°C. Определяли исходное количество микроорганизмов в образцах куриного филе, а также на 3, 5 и 7-е сутки хранения в холодильнике. Для этого кусочки филе (1 г) помещали в пробирки типа Эппендорф с коническим дном, встряхивали в стерильном изотоническом растворе NaCl на шейкере Bio Vortex V1 в течение минуты и делали высев на МПА из разведений  $10^1$ - $10^5$ . Для учета количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ) чашки Петри инкубировали в термостате при 30 °С, подсчет колоний производили на 2-3 сутки в соответствии с ГОСТ 10444.15-94. Для учета психротрофных бактерий чашки помещали в холодильник при 4 °С, подсчет выросших колоний производили 10 суток в соответствии с ГОСТ ISO 17410-2013. Эксперимент проводили в 3-кратной повторности.

## **ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **3.1 Оценка выживаемости клеток чистых культур бактерий мясных и кисломолочных продуктов при контакте с плёнками ПГА**

Страницы 22-31 изъяты в связи с авторским правом

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы было установлено:

1. Пленки из ПГА проявляли сопоставимые свойства с контрольными образцами из ПЭВД, ингибируя развитие типичной микрофлоры пищевых продуктов. При контакте с суспензиями чистых культур бактерий их выживаемость в течение 3-х суток снижалась в 10-1000 раз от исходной. Образцы плёнок из гомополимера П(ЗГБ) показали более сильные сдерживающие свойства, чем у сополимера П(ЗГБ/ЗГВ).

2. При контакте суспензии смешанной культуры бактерий, выделенных из охлажденного филе курицы, с образцами полимерных плёнок из ПГА, количество микроорганизмов через 3 суток инкубации при 30 °С снижалось для П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) в 12,8 и 11,5 раз, соответственно, по сравнению с исходной численностью микроорганизмов, оба типа материала одинаково эффективно подавляли развитие смешанной культуры бактерий.

3. Хранение охлажденного филе курицы в плёнке из П(ЗГБ) более эффективно сдерживало развитие мезофильных и психротрофных бактерий в течение 5 суток по сравнению с плёнками из П(ЗГБ/ЗГВ) и ПЭВД.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бессонова В.А., Ануфриева К.М. Полигидроксиалканоаты - новые биоматериалы [Электронный ресурс]: Современные научные исследования и инновации [сайт] – 2016. – Режим доступа: <https://web.snauka.ru/issues/2016/07/69516> (Дата обращения: 03.04.2023).
2. Борисов Е. В центре внимания— биоразлагаемые полимеры //The Chemical Journal. – 2005. – №. 5. – С. 68.
3. Бояндин А.Н., Николаева Е.Д., Шабанов А.В., Васильев А.Д. Получение и исследование полимерных смесей на основе поли-3-гидроксибутирата // Журнал СФУ. Биология. 2014. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/poluchenie-i-issledovanie-polimernyh-smesey-na-osnove-poli-3-gidroksibutirata> (дата обращения: 14.04.2023).
4. Булгаков Д. А., Санкова Е. А. ВРЕД ПЛАСТИКА НА ПРИМЕРЕ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТ// Геоэкологические проблемы современности и пути их решения. – 2020. – С. 114-122.
5. Верхованцев, В. В. Водные краски на основе синтетических полимеров / В.В. Верхованцев. – Москва: Наука, 2008. – 200 с.
6. ВИНОГРАДОВА О. Н., СЫРВАЧЕВА Д. А. Синтез биодegradуемых биополимеров с улучшенными эксплуатационными свойствами //Химия в интересах устойчивого развития. – 2014. – Т. 22. – №. 5. – С. 505-508.
7. Волова, Т. Г. Разрушаемые микробные полигидроксиалканоаты в качестве технического аналога неразрушаемых полиолефинов// Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. – 2015. – Т. 8. – № 2. – С. 131-151.
8. Демиденко, А. В. Технология биосинтеза полигидроксиалканоатов на глицерине и реализация опытного производства : специальность 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» : диссертация на

- соискание ученой степени кандидата биологических наук / Демиденко Алексей Владимирович ; Сибирский федеральный университет. – Красноярск, 2018. – 142 с.
9. Жила Н. О. и др. Биосинтез поли (3-гидроксибутирата-со-3-гидроксивалерата) бактериями *Cupriavidus necator* В-10646, культивируемыми на смеси из олеиновой кислоты и предшественников 3-гидроксивалерата. – 2020.
  10. Касьянов Г. И. Биоразрушаемая упаковка для пищевых продуктов //Вестник науки и образования Северо-запада России. – 2015. – Т. 1. – №. 1. – С. 112-119.
  11. Корчинова Н. В., Политаева Н. А. Влияние обработки животного сырья раствором хитозана на увеличение срока хранения //Инновации в технологии продуктов здорового питания. – 2017. – С. 83-90.
  12. Липчанский Д. С. Переработка и утилизация отходов пластмасс// Прогрессивные технологии и экономика в машиностроении: сборник трудов VI Всероссийской научно-практической конференции для студентов и учащейся молодежи. – 2015. – С. 800-802.
  13. Лисагорский В. М. Упаковка мяса в полимерные пленки: плюсы и минусы //Мясные технологии. – 2011. – №. 5. – С. 48-50.
  14. Минь Т. Т. и др. БИОРАЗРУШЕНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНА ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ И ПОЛИКАПРОАМИДА //Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов. – 2012. – С. 119-120.
  15. 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.
  16. Онг С. Й., Чее Д. Й., Судеш К. Дегградация полигидроксиалканоатов (ПГА): обзор. – 2017.
  17. Переработка пластиковых отходов [Электронный ресурс]: Cleandex [сайт] – 2018. – Режим доступа:

[http://www.cleandex.ru/articles/2008/03/18/residue\\_utilization20](http://www.cleandex.ru/articles/2008/03/18/residue_utilization20) (Дата обращения: 20.04.2023)

18. Потапова Елена Владимировна Проблема утилизации пластиковых отходов // Известия БГУ. 2018. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/problema-utilizatsii-plastikovyyh-othodov> (дата обращения: 11.05.2023).
19. Семенова А. А. и др. Достижения и перспективы развития полимерной упаковки мяса и полуфабрикатов //Техника и технология пищевых производств. – 2018. – Т. 48. – №. 3. – С. 161-174.
20. Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс] : электрон. учеб. пособие / Н. А. Войнов, Т. Г. Волова, Н. В. Зобова и др. ; под науч. ред. Т. Г. Воловой. – Электрон. дан. (12 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2009. – (Современные проблемы и методы биотехнологии : УМКД № 13232008 / рук. творч. коллектива Т. Г. Волова). ISBN 978-5-7638-1769-0 (учебного пособия).
21. Соловьянов, А. А. Пластики и окружающая среда / А. А. Соловьянов // Твердые бытовые отходы. – 2010. – № 8(50). – С. 38-41.
22. 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.
23. Чемодин Ю.А. Анализ особенностей управления твердыми бытовыми отходами на современном этапе в российской федерации и за рубежом / Чемодин Ю.А. // Московский экономический журнал. – 2018. –№5(1). – С.200- 205.
24. Шевцова А.А. Утилизация изделий из пластика // Современные научные исследования и инновации. 2016. № 1 [Электронный ресурс]. URL: <https://web.snauka.ru/issues/2016/01/62753> (дата обращения: 10.05.2023).

25. Шишацкая, Е. И. Клеточные матриксы из резорбируемых полигидроксиалканоатов / Е. И. Шишацкая // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 2, № 2. – С. 68-75.
26. Akaraonye E., Keshavarz T., Roy I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice //Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2010. – Т. 85. – №. 6. – С. 732-743.
27. Andrady A. L., Neal M. A. Applications and societal benefits of plastics //Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.
28. Boyandin, Anatoly Nikolayevich et al. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils / A. N. Boyandin // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2013. – Т. 83. – С. 77-84.
29. Branciforti M. C. et al. Crystallinity study of nano-biocomposites based on plasticized poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with organo-modified montmorillonite //Polymer testing. – 2013. – V. 32. – №. 7. – P. 1253-1260.
30. Briassoulis D., Tserotas P., Athanasoulia I. G. Alternative optimization routes for improving the performance of poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) based plastics //Journal of Cleaner Production. – 2021. – Т. 318. – С. 128555.
31. Bulantekin Ö., Alp D. Perspective Chapter: Development of Food Packaging Films from Microorganism-Generated Polyhydroxyalkanoates //Food Processing and Packaging Technologies-Recent Advances. – IntechOpen, 2022.
32. Fernandes M. et al. Factors affecting polyhydroxyalkanoates biodegradation in soil //Polymer Degradation and Stability. – 2020. – V. 182. – P. 109-408.
33. Geyer R., Jambeck J. R., Law K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made //Science advances. – 2017. – Т. 3. – №. 7. – С. e1700782.
34. Hahladakis J. N. et al. An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling //Journal of hazardous materials. – 2018. – Т. 344. – С. 179-199.
35. Hester R.E., Harrison R.M. Marine Pollution and Human Health// Royal Society of Chemistry. – 2011. – P. 84-85.

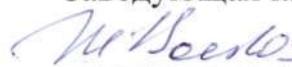
36. Israni N., Shivakumar S. Polyhydroxyalkanoates in packaging //Biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates. – 2019. – C. 363-388.
37. Katyal D., Kong E., Villanueva J. Microplastics in the environment: impact on human health and future mitigation strategies// Environ. Health Rev. – 2020. – P. 27-31.
38. Keskin G. et al. Potential of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymers family as substitutes of petroleum based polymers for packaging applications and solutions brought by their composites to form barrier materials //Pure and Applied Chemistry. – 2017. – T. 89. – №. 12. – C. 1841-1848.
39. Kim D. Y. et al. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates //Journal of microbiology. – 2007. – T. 45. – №. 2. – C. 87-97.
40. Lin-Ping Wu. Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Biosynthesis, Industrial Production and Applications in Medicine// Nova publisher. – New York. – 2014. – P. 349.
41. Laycock, Bronwyn & Halley, Peter & Pratt, Steven & Werker, Alan & Lant, Paul. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates // Progress in Polymer Science. – 2013. – T. 38. – №. 3-4. – C. 536-583.
42. Madison L., Hydroxyalkanoates: From DNA to plastic. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1999. –V. 63 (1). – P. 2–53.
43. Mangaraj S. et al. Application of biodegradable polymers in food packaging industry: A comprehensive review //Journal of Packaging Technology and Research. – 2019. – T. 3. – C. 77-96.
44. Morishita M., Lowman A.M., Takayama K., Nagai T., Peppas N.A. Elucidation of the mechanism of incorporation of insulin in controlled release systems based on complexation polymers. J Control Release. 2002. – P. 25–32.
45. Możejko-Ciesielska J., Kiewisz R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? //Microbiological research. – 2016. – T. 192. – P. 271-282.

46. Pandey A. et al. Sustainable applications of polyhydroxyalkanoates in various fields: A critical review //International Journal of Biological Macromolecules. – 2022.
47. Policastro G., Panico A., Fabbicino M. Improving biological production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)(PHBV) co-polymer: A critical review //Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. – 2021. – Т. 20. – С. 479-513.
48. Production, use, and fate of all plastics ever made [Электронный ресурс]: research article — plastics // «Science Advances» - Режим доступа: [https://www.researchgate.net/publication/318567844\\_Production\\_use\\_and\\_fate\\_of\\_all\\_plastics\\_ever\\_made](https://www.researchgate.net/publication/318567844_Production_use_and_fate_of_all_plastics_ever_made)
49. Raza Z. A., Abid S., Banat I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2018. – Т. 126. – С. 45-56.
50. Riaz S., Rhee K. Y., Park S. J. Polyhydroxyalkanoates (PHAs): biopolymers for biofuel and biorefineries //Polymers. – 2021. – Т. 13. – №. 2. – С. 253.
51. Shen M. Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution?/ M.Shen, B.Song, G.Zeng, Y.Zhang, W.Huang, X.Wen, W.Tang // Environmental Pollution. – 2020. – P. 263.
52. Volova T.G. Microbial polyhydroxyalkanoates - plastic materials of the 21st century (biosynthesis, properties, applications). New York: Nova Science Pub. Inc., USA, 2004.
53. What to do with plastic waste? [Электронный ресурс]: Plastic Soup [сайт] – 2018. – Режим доступа: [www.url:https://www.plasticsoupfoundation.org/en/files/what-to-do-with-plastic-waste](https://www.plasticsoupfoundation.org/en/files/what-to-do-with-plastic-waste) (Дата обращения: 23.04.2023)
54. Yean O. S., Yee C. J., Kumar S. Degradation of polyhydroxyalkanoate (PHA): a review //Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2017. – Т. 10. – №. 2. – С. 211-225.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой

 Т.Г. Волова

«21» июня 2023 г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 – Биология

Взаимодействие микрофлоры пищевых продуктов с поверхностью полимерных  
плёнок из полигидроксиалканоатов в качестве упаковки

Руководитель



д.б.н., профессор

С. В. Прудникова

Выпускник



Р. В. Гордеева

Красноярск 2023