

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

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

МАГИСТЕРСКАЯ РАБОТА

Получение и исследование свойств композитных материалов на основе
разрушаемых полигидроксиалканоатов

06.04.01 – Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Руководитель	_____	<u>доцент, канд. техн. наук</u>	<u>С.В. Барановский</u>
	подпись, дата		должность, учёная степень, инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Н.Д. Ипатова</u>
	подпись, дата		инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>доцент, канд. техн. наук</u>	<u>М.А. Баяндин</u>
	подпись, дата		должность, учёная степень, инициалы, фамилия

Красноярск 2023

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему: «Получение и исследование свойств композитных материалов на основе разрушаемых полигидроксиалканоатов» содержит 64 страницы и включает в себя 64 литературных источника, 7 таблиц, 2 формулы, 24 рисунка.

БИОСИНТЕЗ, П(ЗГБ), КОМПОЗИТНЫЙ МАТЕРИАЛ, БИОДЕГРАДАЦИЯ.

Цель работы - получить композитные материалы на основе разрушаемых полигидроксиалканоатов с различными видами наполнителей и исследовать их свойства.

Пластики являются одними из самых производимых, используемых и универсальных материалов. Тем не менее, их самое большое преимущество, а именно долговечность, оказалось их самой большой проблемой, так как скорость их деградации не соответствует предполагаемому сроку службы и поэтому их накопление в окружающей среде неизбежно. Полигидроксиалканоаты (ПГА), синтезируемые микроорганизмами, могут стать отличной заменой синтетическим пластмассам. А Создание композитов, позволит снизить стоимость изделий из данного биополимера. Актуальность данной работы заключается в получении и исследования свойств композитных материалов на основе поли(3-гидроксибутирата), синтезируемого штаммом бактерии *Cupriavidus eutrophus* B10646. В качестве наполнителей использовали бактериальную целлюлозу, тальк и волокно древесины.

В результате проведённой работы была синтезирована партия поли(3-гидроксибутирата). Получены композитные материалы и исследованы их физико-химические и физико-механические характеристики. Исследовано влияние содержания наполнителей на деградацию композиций в почвенных микрэкосистемах. Изучен количественный состав микробного сообщества.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Биосинтез полигидроксиалканоатов	6
1.2 Характеристика полигидроксиалканоатов	8
1.3 Древесные полимерные композиты.....	10
1.4 Композиты на основе полигидроксиалканоатов и бактериальной целлюлозы.....	12
1.5 Биодegradация полигидроксиалканоатов	14
1.5.1 Микроорганизмы-биодеструкторы.....	17
1.5.2 Биодegradация полигидроксиалканоатов и композитов на их основе в почвенных средах	19
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
2.1 Объекты исследования.....	23
2.2 Биосинтез бактерий <i>Cupriavidus eutrophus</i> B10646.....	23
2.3 Получение композитных материалов.....	25
2.4 Исследование свойств поверхности	27
2.5 Дифференциальная сканирующая калориметрия.....	28
2.6 Исследование физико-механических свойств	29
2.7 Исследование биодegradации прессованных композитных форм	30
2.8 Методы выделения почвенных деструкторов.....	31
2.9 Статистическая обработка данных	32
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	33
3.1 Синтез П(ЗГБ)	33
3.2 Применение П(ЗГБ) для повышения гидрофобности прессованной древесины	34
3.2.2 Исследование свойств поверхности	36
3.3 Термический анализ полученных композитных материалов.....	39
3.4 Исследование свойств поверхности прессованных образцов.....	41
3.5. Исследование физико-механических свойств прессованных образцов.....	44
3.6 Дegradация прессованных образцов в почвенных микрoэcosystemах	46
3.6.1 Микробиологический анализ	49
ВЫВОДЫ	53
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	53
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	63
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	64

ВВЕДЕНИЕ

Одной из самых актуальных проблем в сфере жизнедеятельности человека является не разрушаемость синтетических полимерных материалов в природной среде. Синтетический пластик практичный, долговечный, недорогой, обладает стабильными физико-механическими свойствами. Однако его массовое использование и привело к одной из глобальных проблем человечества - загрязнению окружающей среды. Эффективность методов утилизации и сокращения и использования пластиковой упаковки значительно ниже, чем масштабы производства, поэтому сейчас идет поиск путей решения проблемы.

«Пластики» как синтетические полимеры появились около 100 лет назад и сегодня они являются одним из самых производимых, используемых и универсальных материалов. Тем не менее, их самое большое преимущество, а именно долговечность, оказалось их самой большой проблемой, так как скорость их деградации не соответствует предполагаемому сроку службы и поэтому их накопление в окружающей среде неизбежно. Загрязнение окружающей среды от пластика — это огромная проблема, учитывая, что только в 2018 году мировое производство пластика из ископаемых ресурсов достигло почти 360 миллионов тонн [24].

Биоразлагаемые полиэфиры гидроксикарбоновых кислот (полигидроксикарбоаты, ПГА), синтезируемые микроорганизмами, вместе с полилактидами могут стать отличной заменой синтетическим пластмассам. Свойства ПГА, такие как долгосрочная биоразлагаемость и возможность получения из них полимерных изделий в различных физических состояниях (порошки, растворы, расплавы), что позволяет применение ПГА в конструкционных изделиях с длительным сроком службы [26, 52]. Биополимер – это дорогой материал, поэтому поиск способов в снижении стоимости изделий из него, является на сегодняшний день актуальной проблемой. Создание композиционных материалов, позволит снизить

стоимость изделий без потери первоначальных физико-химических свойств ПГА.

Актуальность данной работы заключается в исследовании свойств композитных материалов на основе поли(3-гидроксибутирата) (П(ЗГБ)) – одного из наиболее перспективных для производства биоразрушаемых пластиков. Одним из таких свойств является биодеструкция в почвенной среде под влиянием биологических процессов, происходящие в почве при участии микроорганизмов. Подбор оптимального соотношения биополимера и наполнителя, а также давления при изготовлении композитов позволяет получить образцы с необходимым сроком биодegradации.

Цель работы - получить композитные материалы на основе разрушаемых полигидроксиалканоатов с различными видами наполнителей и исследовать их свойства.

Для достижения цели, поставлены следующие задачи:

1. Получить партию поли(3-гидроксибутирата).
2. Исследовать возможность использования раствора полимера в качестве гидрофобизатора для защиты изделий из древесного волокна.
3. Изготовить прессованные формы композитных материалов с различным соотношением полимер-наполнитель.
4. Исследовать физико-химические и физико-механические характеристики композитов.
5. Исследовать влияние наполнителей на деградацию образцов в почве и изучить количественный состав микробного сообщества.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биосинтез полигидроксиалканоатов

ПГА синтезируются в ходе сложного многоступенчатого биосинтетического процесса, каждую стадию которого катализируют специфические ферменты. Микроорганизмы способны культивировать ПГА при избытке углерода в среде и недостатке некоторых химических веществ. Некоторые бактерии могут синтезировать ПГА только при избытке углерода и недостатке питательных веществ, таких как N, P, Mg, K, O или S, например, *Bacillus Megatherium*, *Cupriavidus necator* [11, 21]. Другие же способны накапливать полимер в фазе роста и без нехватки питательных веществ, например, *Alcaliegenes Latus* и рекомбинантная *E. Coli*.

Наиболее распространенным для синтеза ПГА является двухстадийный процесс культивирования. Во время первого этапа бактерии растут без ограничений до определенной концентрации. Затем рост клеток ограничивают предельными питательными веществами при избытке углерода. На этой стадии и происходит накопление ПГА в продуцентах, что способствует их увеличению по размеру и весу, однако количественно культура не растет [1].

Различные виды бактерий накапливают внутриклеточные полигидроксиалканоаты в виде гранул как депо энергии и углерода. Бактерии способны накапливать ПГА до 90% от сухой клеточной массы [50]. Они хранятся во внутриклеточных гранулах внутри клетки, так как нерастворимы в воде. Путем полимеризации растворимых промежуточных продуктов в нерастворимые молекулы, клетка не претерпевает изменений осмотического состояния. Таким образом предотвращается утечка этих ценных соединений из клетки и питательное вещество останется доступным при минимальных затратах энергии [33]. Поверхность гранулы ПГА покрыта слоем фосфолипидов и белков. Фазины, класс белков, являются преобладающими

соединениями на поверхности гранул. Они влияют на количество и размер гранулы ПГА [35].

Наиболее изученный метаболический путь изучен на примере П(ЗГБ), он является характерным для большинства ПГА (рисунок 1). На первой этапе происходит образование ацетоацетила-КоА, путем объединения двух молекул ацетил-КоА 3-кетотиолазой. Ацетоацетил-КоА-редуктаза восстанавливает ацетоацетил-КоА с помощью НАДН до 3-гидроксибутирил-КоА. Затем происходит полимеризация 3-гидроксибутирил-СоА в П(ЗГБ) с помощью синтазы ПГБ, вместе с этим высвобождается коэнзим-А [36].

Во время нормального роста бактерий 3-кетотиолаза будет подавляться свободным коэнзимом А, выходящим из цикла Кребса. Однако при ограничении питательных веществ избыток ацетил-КоА направляется в биосинтез П(ЗГБ) [37].

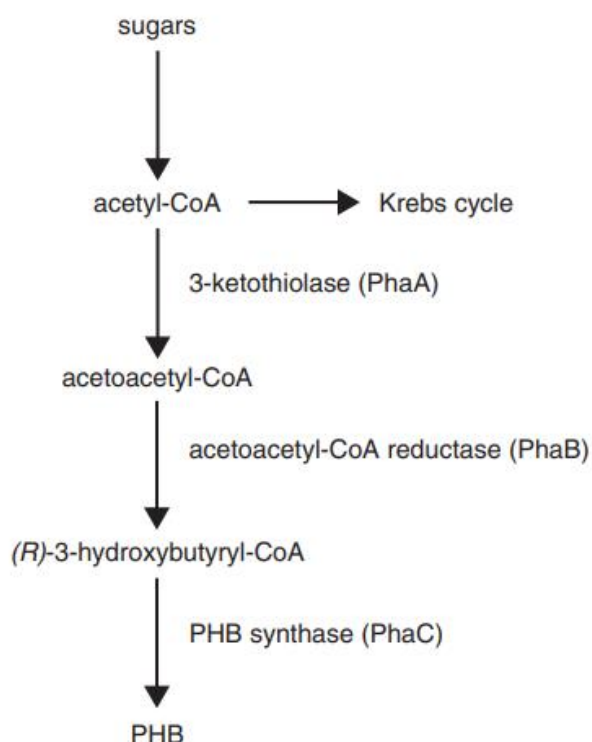


Рисунок 1 – Синтез П(ЗГБ) в бактериальной клетке.

1.2 Характеристика полигидроксиалканоатов

Полигидроксиалканоаты (ПГА) — это нормальные термопластичные алифатические биогенные полиэфиры, которые могут естественным образом накапливаться в микробных сообществах, и они различаются по своим свойствам в зависимости от их химического состава (гомо- или сополиэфир, содержащий гидроксильные ненасыщенные жиры). Структурная формула представлена на Рисунке 2.

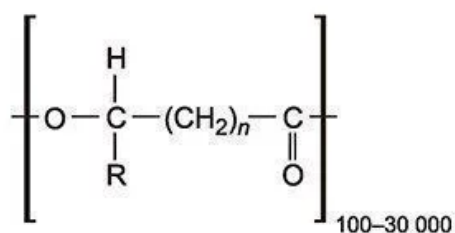


Рисунок 2 – Структурная формула полигидроксиалканоатов.

Свойства ПГА [28]:

- Нерастворимы в воде и относительно устойчивы к гидролитическому разложению;
- Обладают плохой устойчивостью к кислотам и щелочам, но хорошей – к ультрафиолету;
- Растворимы в хлороформе и других хлорированных углеводородах;
- Биосовместимы, поэтому подходит для применения в медицине;
- Тонут в воде, способствуя анаэробной биodeградации в осадке;
- Нетоксичны;
- Менее «липкие», чем традиционные полимеры при расплавлении.

ПГА являются бактериальными полимерами, которые могут быть получены из многочисленных возобновляемых источников углерода.

Из-за своих свойств ПГА подходят для замены нефтехимических пластмасс (полиэтилен, полипропилен и т. д.). Главное преимущество ПГА –

это полная деструкция до углекислого газа и воды, в отличие от синтетических пластмасс [28].

ПГА со средней длиной цепи могут применяться в качестве биоразлагаемых сырных покрытий, пакетов для газонов и листьев, подгузников, продуктов быстрого питания и одноразовых медицинских изделий [42]. ПГА также имеют потенциал для замены полиэтилена в некоторых областях применения. Например, пленки, используемые в сельском хозяйстве для остановки прорастания сорняков. Дополнительное преимущество – деградация в течение сезона и, следовательно, уменьшение сельскохозяйственных отходов [13].

Поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)) является основным и наиболее известным представителем семейства ПГА. П(ЗГБ) – это гомополимер D(-)-3-β-оксимасяной кислоты. Он представляет собой изотактический полиэфир с регулярными, повторяющимися единицами [61]. После некоторых модификаций условий процесса и использования специальных форм П(ЗГБ) можно обрабатывать литьем под давлением с использованием того же оборудования, которое используется для полипропиленовой упаковки. Физические свойства П(ЗГБ) часто сравнивают с полипропиленом (ПП), так как они имеют близкие точки плавления, степени кристалличности и температуры стеклования [41]. При сравнении свойств банок из П(ЗГБ) и полипропилена (ПП). П(ЗГБ) показал разницу в величине деформации, которая была примерно на 50% ниже, чем ПП. В холодильниках и морозильниках упаковка П(ЗГБ) демонстрирует свойства хуже, чем ПП, но лучше при более высоких температурах [42].

П(ЗГБ) биodeградирует как в анаэробных, так и в аэробных условиях. В почве на скорость деструкции влияет минеральный состав почвы, влажность, температура, кристалличность полимера, молекулярная масса полимера и др. Например, в плодородной садовой почве при температуре 30 °C и 80 % влажности через 28-35 суток достигают 100 % убыли массы [34].

1.3 Древесные полимерные композиты

На протяжении последних лет расширялось применение древесных пластиковых композитов (WPC) в целях решения проблем, связанных с накоплением пластиковых отходов на свалках и в окружающей среде, особенно в океане. WPC используется во многих областях экономики, от компонентов автомобильной промышленности до компонентов конструкции здания, таких как настил и перила. Наиболее распространенными являются полиэтилен, поливинилхлорид и полипропилен, они используются в коммерческих WPC [8]. Однако, такие композиты не способны к биологическому разложению и не подлежат вторичной переработке в текущем пластике из-за сложности материалов.

С ростом экологических проблем и накопления пластикового мусора, растет потребность замены полимеров на биоразлагаемые. Наибольший интерес представляют полигидроксиалканоаты (ПГА), которые синтезируются внутриклеточно многими бактериями и археями [9]. ПГА представляют семейство сложных полиэфиров, их физико-химические свойства наиболее близки к свойствам полипропилена. Они наиболее привлекательны для композитных материалов поскольку имеют более высокий поток расплава и, следовательно, обеспечивают лучшее перемешивание во времени по сравнению с полиолефинами на нефтяной основе [33].

Биокомпозиты на основе ПГВБ с добавлением 30 мас. % WP показал увеличение модуля Юнга на 70,4 % ($4,6 \pm 0,1$ ГПа) по сравнению с чистым ПГВБ ($2,7 \pm 0,2$ ГПа). Однако эта закономерность сохраняется для композитов с менее 30 мас. % WP, далее идет уменьшение упругости при растяжении. Такой же принцип работает для механических свойств биокомпозитов ПГБ / WP. При исследовании прочности на растяжение наблюдалось уменьшение от $33,4 \pm 1,2$ МПа для ПГВБ до $22,8 \pm 1,4$ МПа для биокомпозита 40 мас. % WP.

Увеличение древесного волокна способствует уменьшению прочности при разрыве, составляя от 3,0 до 0,6% для ПГВБ до 0,6 - 0,2 (%) для биокомпозита из 40 мас. % WP [47]. СЭМ-микрофотографии показали однородную дисперсию WP в матрице, что является важным параметром при определении конечных свойств биокомпозитов. Волокна были замечены в биокомпозитах, наиболее четко прослеживающиеся волокна с содержанием более чем 20 мас. % WP. Древесное волокно увеличивает процент поглощения воды пропорционально процентного содержания. Для чистого полимера и биокомпозитов с 10 и 20 мас. % WP поглощение воды оставалось ниже 2,5% в период 15 - 12 ч. Однако биокомпозиты с более высоким содержанием WP показали значительное увеличение абсорбции воды после 21 - 84 ч (5,5% для композиции 70/30 и 8,8% для композиции 60/40) из-за гидрофильного характера WP.

Биодеградация чистых образцов с содержанием 20 мас. % WP показали меньшую потерю в механических свойствах за 12 месяцев. Образцы, изготовленные с 50 мас. % WP выявили постепенное снижение прочности на растяжение композитов. Эти биокомпозиты были с выраженными дефектами поверхности, что объясняется деградацией древесных частиц в результате воздействия грибков, вызываемых влагой [10].

В настоящее время проводятся обширные исследования для лучшего понимания физических и механических свойств композитов ПГА / древесины. Среди всех ПГА наибольшую распространенность получили поли(3-гидроксibuтирата) (П(ЗГБ)) и сополимера поли(3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерат) (ПГВБ) для использования в WPS [47].

Для улучшения свойств ПГА используются нуклеирующие агенты для повышения скорости кристаллизации. Нитрид бора, тальк [398], лигнин [27], оротиновая кислота и сахарин [46] для ПГВБ, причем БН является наиболее эффективным агентом на сегодняшний день. В исследование волокон ПГВБ/бамбуковой целлюлозы (20% от массы) добавляли нитрат бора, что

способствовало зарождению и кристаллизации ПГВБ, о чем свидетельствует увеличение температуры кристаллизации.

Для достижения важных коммерческих свойств композитов используется экструзионная обработка. Увеличение содержания древесного волокна способствует уменьшению средней прочности на растяжение и увеличению среднего коэффициента упругости. Средняя прочность на растяжение и средний модуль упругости при растяжении были значительно уменьшены при обработке с наименьшей скоростью вращения шнека (5 об / мин) и самой низкой скоростью подачи (10 см³ / мин) [44].

После обработки экструзией было обнаружено, что молекулярная масса M_w матрицы ПГВБ в древесных композитах ПГВБ в среднем была ниже по различным композитам (M_w 350-500 кДа) по сравнению с чистым полимером (M_w 500-650 кДа) из-за более высокой скорости распада композита, что связано с добавлением древесных волокон. При измерении поведения тепловой деградации с помощью TGA было замечено, что древесное волокно влияет на термическое разложение. Начальная и пиковая температура разложения постепенно уменьшались с увеличением содержания древесного волокна. Эти результаты показывают, что термическая стабильность ПГВБ уменьшалась с добавлением древесных волокон. Однако это снижение было недостаточно значительным, чтобы привести к снижению механических характеристик матрицы ПГВБ. Кроме этого, древесные волокна, независимо от их соотношения, способствуют кристаллизации ПГВБ, которая отражается в увеличении скорости кристаллизации, не влияя на механические свойства [50].

1.4 Композиты на основе полигидроксиалканоатов и бактериальной целлюлозы

Бактериальная целлюлоза (БЦ) обладает прекрасными свойствами и очень широкими возможностями применения. Этот многообещающий

биоматериал будет играть активную роль в будущем в изучении нанокompозитов алифатических полиэфиров/БЦ с точки зрения взаимосвязи наноструктура-свойство.

Биополимеры, полученные из сельскохозяйственных ресурсов, таких как крахмал, целлюлоза, белки, лигнин, хитозан, некоторые полиамиды, поли(молочная кислота) или полигидроксиалканоаты, все чаще изучаются в качестве возможных заменителей материалов на основе нефти. Среди всего этого целлюлоза в ее наноформе испытала самый быстрый прогресс [3, 15].

Первоначально наноцеллюлоза подразделялась на три типа нанофибриллированная целлюлоза, полученная путем механической обработки в качестве основного процесса, нанокристаллы целлюлозы / нановискеры, полученные кислотным гидролизом и бактериальной целлюлозы. Наноцеллюлоза, полученная из раствора или расплава методом электропрядения с использованием электрических сил. В зависимости от источника целлюлоза может быть классифицирована как целлюлоза, синтезируемая высшими растениями, включая деревья, низшими растениями, такими как водоросли, некоторыми животными (оболочниками), грибами, амебами или некоторыми бактериями [31].

Бактериальную целлюлозу можно рассматривать как биоматериал с блестящим будущим во многих областях благодаря ее биосовместимости и биоразлагаемости, высокой чистоте, тонковолокнистой сетчатой структуре, высокой кристалличности, высокой водоудерживающей способности и хорошему соотношению прочности к весу.

Большое внимание также уделялось снижению затрат на производство БЦ за счет использования более дешевых источников углерода и питательных веществ, таких как промышленные отходы или побочные продукты агролесоводства [3].

Синтез целлюлозы микроорганизмами заключается в образовании цепей глюкозы и сборке/кристаллизации цепей целлюлозы. Во-первых, цепи целлюлозы, синтезированные в бактериях (около 16 цепей), прокручиваются

через поры, образуя первую сборку целлюлозы диаметром около 1,5 нм и протофибриллы диаметром 3–4 нм. Эти структуры собираются в кристаллические микрофибриллы (около 20 нм в ширину), которые, в свою очередь, объединяются в плоские ленты шириной 80-120 нм и длиной в сотни микрон (рисунок 3) [5].

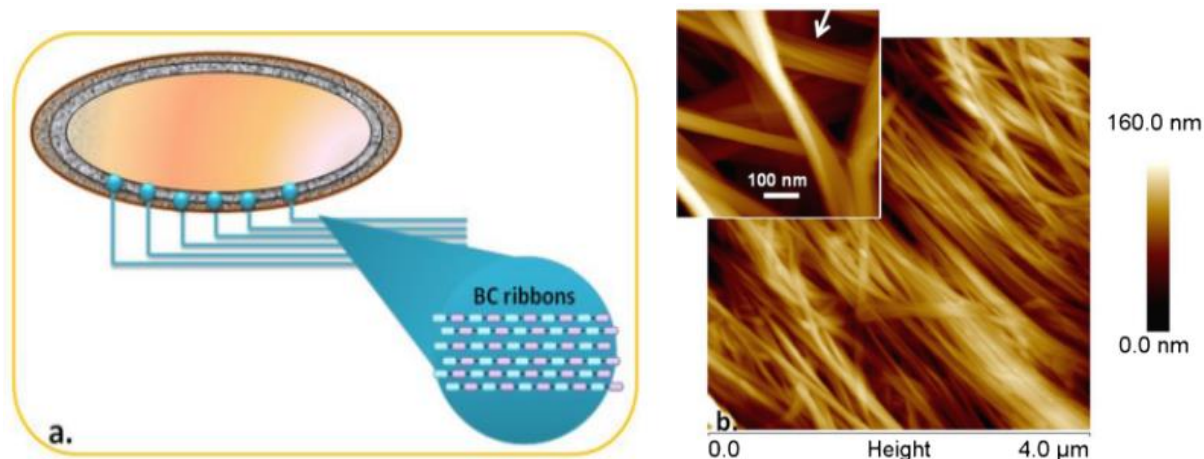


Рисунок 3 – (а) Схематическое изображение образования протофибрилл и сборки ленты в системе *Acetobacter xylinum*; (б) топографическое изображение сети бактериальной целлюлозы с помощью АСМ, вставка — деталь, показывающая иерархическую организацию целлюлозы: лента, отмеченная стрелкой, образована 4 микрофибриллами шириной около 20 нм.

Одним из наиболее многообещающих применений бактериальной целлюлозы является производство полимерных нанокомпозитов, большие надежды возлагаются на композиты бактериальной целлюлозы с полимерной матрицей, полученной из возобновляемых источников. Новые биоматериалы с улучшенными свойствами можно получить, используя преимущества как бактериальной целлюлозы, так и биополимера [32].

1.5 Биodeградация полигидроксиалканоатов

Одним из основных преимуществ ПГА по сравнению с обычными полимерами является его полное аэробное разложение на простые конечные продукты, которые затем можно свободно включать в глобальный материальный цикл. В природной среде практически все полимерные

материалы подвержены биодegradации, однако для большинства из них скорость degradation крайне мала. Это зависит от природы полимера и наличия в составе полимерного материала пластификаторов или наполнителей [63].

Определение срока службы биоразлагаемых полимеров начинается с определения механизмов, посредством которых происходит биоразложение. Под биодegradацией понимают полное разрушение материала в результате биологической деятельности, например, в результате воздействия микроорганизмов. Деструкторы ПГА, обнаруженные в большинстве природных сред, включая морскую среду, разлагают ПГА как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В аэробных условиях конечными продуктами биодegradации являются биомасса, CO₂ и вода, а в анаэробных условиях конечными продуктами являются биомасса, CO₂, метан и вода [44].

Известно, что биодegradация ПГА происходит главным образом за счет эрозии поверхности в результате гидролиза, катализируемого ферментами микроорганизмов [20, 29], что означает, что скорость потери массы объекта ПГА зависит от площади поверхности, доступной для ферментативного воздействия. Свойства полимера, такие как кристалличность, длина боковой цепи, морфология поверхности, а также свойства среды, в которой происходит биоразложение (температура, воздействие ультрафиолета, количество питательных веществ, сила механических воздействий, виды присутствующих бактерий, уровень pH и кислорода), могут влиять на скорость биодegradации [14, 29, 54]. Кроме того, по мере того как происходит биоразложение, поверхность полимера изменяется, образуются поры, и может происходить сдвиг механизма в сторону разложения по массе и автокаталитического гидролиза, а не просто разрушения поверхности. Все эти факторы действуют совместно, что приводит к сложному взаимодействию, которое влияет на скорость биодegradации (Рисунок 4) [29].

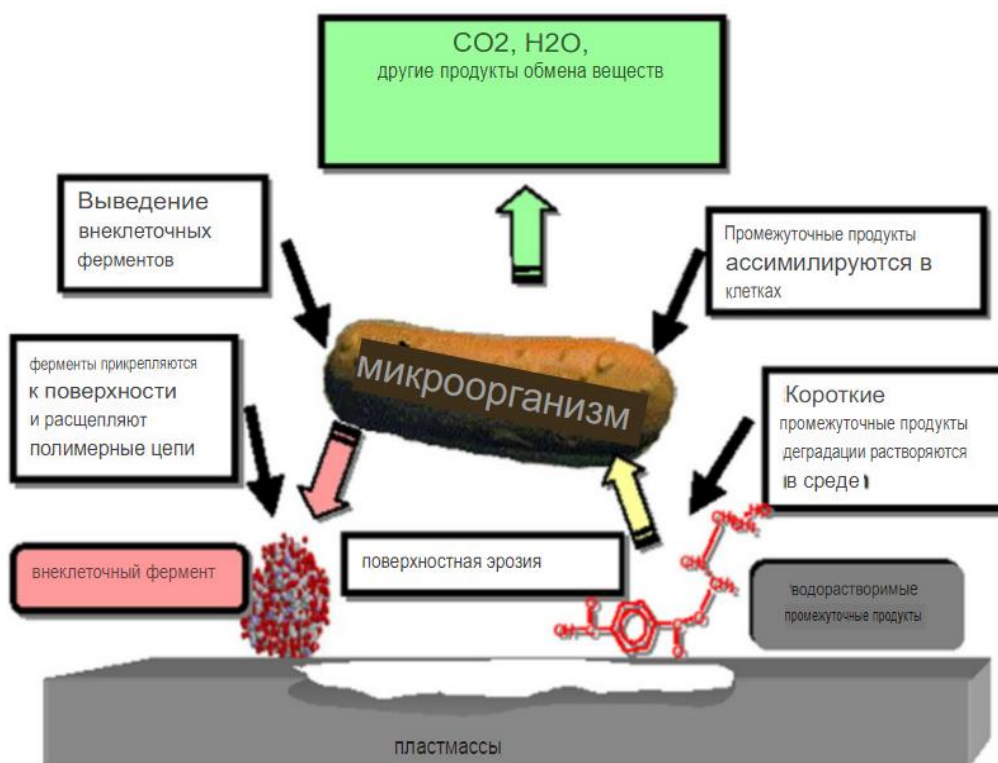


Рисунок 4 – Общий механизм биоразрушения пластика в аэробных условиях.

Упрощенный процесс биodeградации состоит из трех ключевых шагов, для каждого из которых может быть рассчитана скорость протекания [23, 30]. Следует отметить, что точные границы между каждым этапом размыты, поскольку они зачастую протекают одновременно и интегративно. Первым этапом происходит образование биопленки и, как следствие, биоповреждение материала. Биопленка представляет собой уникальную и сложную ассоциацию микробов, образованную связанными с поверхностью микробными клетками и продуцируемым ими внеклеточным матриксом, состоящим из полисахаридов, белков и захваченных органических и неорганических частиц [16]. Биопленка образуется не сразу при внесении образца полимера в среду, а с некоторой временной задержкой (в пределах от нескольких дней до нескольких недель), обусловленной тем, что для формирования биопленки и адаптации микробной популяции требуется время. Образование биопленки приводит к изменению химических и физико-механических свойств разрушаемого материала [29, 55].

Следующим этапом является катализируемая ферментами гидролитическая деполимеризация. На данном этапе внеклеточные деполимеразы катализируют расщепление гидролитических связей в полимере, что в конечном итоге приводит к образованию олигомеров, димеров и мономеров. Наконец, поглощение малых молекул клеткой во время биоассимиляции для роста, размножения или минерализации было объединено в отдельный этап. Получающиеся продукты этого процесса – клеточная биомасса и простые конечные продукты, такие как CO₂ в аэробных средах и метан в анаэробных средах. Установлено, что процессы образования биопленки и гидролитической деполимеризации ограничивают скорость биоразрушения полимерного материала в большей степени, что означает, что влияние любых факторов на минерализацию может считаться менее значительным. Для большей части процесса биоразложения, предполагается, что усвоение и минерализация ПГА происходит быстро. Объединение этого предположения с пониманием того, что ПГА разлагается с помощью механизма поверхностной эрозии, и интерес представляют только макроизменения целостности полимера в течение длительных периодов времени, приводит к выводу, что скорость биодеградации ПГА можно надлежащим образом оценить как линейную скорость потери массы со временем [12, 60].

1.5.1 Микроорганизмы-биодеструкторы

Биодеструкция полимерных материалов синтетического и природного происхождения может быть вызвана микроорганизмами различных систематических групп, относящихся к грибам и бактериям. Однако чаще всего в разрушении пластиков принимают участие смешанные ассоциации микроорганизмов, характеризующиеся широким разнообразием. К наиболее активным разрушителям полимеров, вызывающим их повреждение и деструкцию относятся несовершенные микроскопические грибы (рр. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Fusarium*). Разрастаясь на

поверхности полимерных материалов, мицелии этих видов грибов проникают в их толщу через микротрещины, а выделяемые ими различные ферменты и метаболиты агрессивно воздействуют на отдельные компоненты пластиков [39].

Среди гетеротрофных бактерий наибольшую активность при биодegradации проявляют стрептомицеты, микобактерии, нокардии, псевдомонады и бациллы. Среди конкретных видов микроорганизмов, активно разрушающих ПГА, разные исследователи выделяют *Alcaligenes faecalis* [4, 40, 45], *Pseudomonas stutzeri* [4, 45], *Rhodospirillum rubrum*, *Bacillus megaterium*, *Acinetobacter beijerinckii*, *Pseudomonas lemoignei* [4, 40] и другие. Способность всех этих микроорганизмов разрушать полимерные материалы связывают с разнообразием ферментов и метаболитов, секретируемых ими в окружающую среду. В результате действия внеклеточных ферментов и метаболитов полимерный материал переводится в растворимое состояние, образуются низкомолекулярные продукты распада, которые доступны микроорганизмам в качестве источников энергии и питания. Биодеструкция полимеров может ускоряться под воздействием окисленных форм ионов Fe и Mn, и хемолитотрофных микроорганизмов, генерирующих окисленные формы ионов в присутствии кислорода [39].

Относительно видового состава деструкторов ПГА интерес представляет недавнее исследование Sera et al. Авторами была выполнена большая и емкая работа по определению влияния двух температурных режимов (25 и 37°C) на скорость разрушения и микробиологический состав деструкторов нескольких видов коммерческих биоразрушаемых полимеров, среди которых так же был П(ЗГБ). Эксперимент проводили в лабораторных условиях, в заранее просеянной и очищенной от посторонних частиц почве с известными влажностью, величиной pH и другими показателями в течение 270 дней. В результате эксперимента, уже на 150 сутки для П(ЗГБ) был достигнут высокий уровень биодegradации, и конечные проценты варьировались между 85,8% и 96,4% при 25°C и 71,1% и 93,1% при 37°C.

Помимо того, что все исследованные образцы показали более высокую скорость биodeградации при температуре 37 °С, видовой и родовой состав деструкторов также отличался для разных температур. В случае П(ЗГБ) было установлено, что на уровне филума в бактериальных сообществах при обеих температурах преобладают *Proteobacteria*, затем *Actinobacteria*, а при 37 °С так же выделяются *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. В грибных сообществах на уровне филума полностью доминировали *Ascomycota*. На видовом уровне только ограниченное число видов составляло большинство грибных сообществ на П(ЗГБ) при температуре 25°С, причем термофильные грибы *Aspergillus fumigatus* полностью доминировали при температуре 37 °С. В целом, авторы сделали заключение, что грибы играли важную роль в биodeградации П(ЗГБ), что было подтверждено их высоким присутствием на поверхности полимера, которое было зафиксировано при помощи СЭМ [43].

1.5.2 Биodeградация полигидроксиалканоатов и композитов на их основе в почвенных средах

Были проведены многочисленные исследования по изучению биоразлагаемости биопластиков в различных условиях окружающей среды, таких как почва, компост, морская и другие водные среды. Среди этих исследований основную массу составляют исследования по биоразрушаемости в почвенных средах, что, вероятно, связано с их высоким микробиологическим разнообразием и, следовательно, более высоким потенциалом биоразрушения по сравнению с другими средами. Большое разнообразие микроорганизмов, присутствующих в почве, делает более вероятным обнаружение микробов, способных разрушать биоразлагаемые пластиковые отходы. Поскольку почва может содержать такие микроорганизмы, она считается средой с отличной способностью к разрушению ПГА [5, 18]. Несколько факторов, в том числе тип почвы и ее биоразнообразие, температура, влажность или рН, а также метод измерения,

могут влиять на воспроизводимость результатов [7]. Если ПГА является единственным доступным источником углерода для бактерий, испытания могут демонстрировать более высокую скорость биоразрушения по сравнению с таковыми в средах, где имеются другие, более поддающиеся разрушению, доступные источники углерода. Исследование биоразрушения ПГА в условиях естественных сред важно для лучшего понимания последствий пластикового загрязнения [18].

В литературе во многих исследованиях изучалась биоразлагаемость биопластиков ПГА и PLA в почве. С целью улучшения биоразлагаемости биопластика, были исследованы смеси различных биоразлагаемых материалов. В результате авторы обнаружили, что биodeградация биокompозита П(ЗГБ)/PPW-FR (отходы ферментации картофельных очистков) была более эффективной, чем для одного П(ЗГБ), поскольку волокна PPW-FR снижали кристалличность биокompозита на основе П(ЗГБ) [17, 56]. В другом исследовании добавление волокон пустых фруктовых гроздьев пальмы (EFB) увеличило скорость биodeградации биокompозита из П(ЗГБ) [17, 60].

Изменения температуры, pH, влажности и даже микробного состава почвы могут привести к различиям в скорости биоразрушения ПГА [58]. В исследовании, проведенном в почве во Вьетнаме, П(ЗГБ) (была измерена убыль массы) разрушился быстрее, чем П(ЗГБ-со-ЗГВ), что противоречит многочисленным исследованиям, показывающим, что сополимеры разрушаются быстрее гомополимера [6]. Авторы связали эти результаты с различиями в составе микробных сообществ и разнообразием ПГА-деполимераз у входящих в них микроорганизмов. В этой работе значительное падение молекулярной массы и увеличение полидисперсности ПГА указало на то, что исследованный полимер разложился на более мелкие фрагменты с различной степенью полимеризации [57].

В другой работе при слабокислом pH (около 5,48), скорость биоразрушения ПГА была выше, чем в почве со значением pH близким к

нейтральному (6,63), что может быть связано с различиями в микробном разнообразии и активности микроорганизмов. рН почвы действительно может определять микробную активность, поскольку некоторые виды имеют узкие пределы оптимальных значений рН и не могут проживать в кислых средах, а также потому, что рН может влиять на доступность почвенных питательных веществ (таких как, например, аммоний и нитраты), которые необходимы для ряда микробных видов [56, 58]. Однако слабокислые почвы предпочтительны для жизнедеятельности грибов, которые играли основную роль в биоразрушении ПГА в таких почвах, в то время как бактерии были доминирующими в почвах с нейтральным рН [56].

Влажность почвы повлияла на биоразрушение П(ЗГБ), которое, по-видимому, происходило интенсивнее в почвах с более высоким содержанием воды. Водопоглощающая способность исследуемого полимера вероятно также влияет на биоразрушение. Так, композиты из П(ЗГБ-со-ЗГГ) с волокнами кенафа, которые имели более высокое водопоглощение, чем один П(ЗГБ-со-ЗГГ), показали более высокий процент биоразрушения (определенный измерением убыли массы), чем П(ЗГБ-со-ЗГГ) [25, 56].

Другим фактором, влияющим на скорость биоразрушения изделий из ПГА в почве, выступает уровень их погружения. В работе Yew et al. скорость биоразрушения пленок из П(ЗГБ) (определенная через убыль массы) на поверхности почвы была на 50% ниже, чем когда пленки были погружены в почву [59]. Вероятно, это связано с тем, что, находясь на поверхности осадочных отложений, пленки из ПГА разрушаются медленнее, чем когда они погружены в них. Погруженные пленки полностью покрыты почвой и, следовательно, площадь поверхности, подверженной микробному воздействию, больше, в результате чего повышается скорость биоразрушения. Более того, микробные сообщества, населяющие погруженные и не погруженные пленки, различны по своему составу (т.к. первые взаимодействуют как с аэробными, так и с анаэробными

микроорганизмами), что также может влиять на скорость биоразрушения [49, 56].

Gallardo-Servantes et al. исследовали биоразрушаемость чистых ПГА и их композитов с добавлением волокон агавы в количестве 20 мас. % в почве смешанного состава (добавлен компост, овечий навоз и куриный помет) в лабораторных условиях. Результаты показали, что биокомпозиты достигли более высоких максимальных значений минерализации и, как следствие, разрушались быстрее, чем чистые матрицы, из-за наличия волокон, разрушающих структуру полимера. Предварительное пропионилирование волокон перед добавлением в композит снижало скорость разрушения из-за ограниченной влажности и диффузии микроорганизмов. Также было продемонстрировано, что чистый П(ЗГБ-со-ЗГВ) был минерализован в более значительной пропорции (40%), чем чистый П(ЗГБ) (34%), вероятно, потому что первый менее кристаллический из-за присутствия мономеров валерата, что позволяет микроорганизмам быстрее разрушать материал [20].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

В качестве объекта исследования взят поли(3-гидроксибутират), синтезированный бактериями *Cupriavidus eutrophus* B10646 в Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ.

В качестве наполнителей использовали три материала: бактериальная целлюлоза, тальк и волокно древесины. Бактериальная целлюлоза синтезирована бактериями *Komagataeibacter rhaeticus* в Лаборатории биотехнологии новых биоматериалов СФУ. Тальк марки ТРПН ГОСТ 19729-74 (ООО Баштальк, Россия) [64]. Специальное древесное волокно, полученное из отходов деревообрабатывающей промышленности, было предоставлено Сибирским государственным университета науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева. Типовой род волокна – сосна. Гидродинамическая обработка волокна позволяет существенно изменить размерно-качественные характеристики древесных частиц. При этом происходит измельчение данных частиц с одновременным их фибриллизацией, что позволяет увеличить поверхности контактов между древесными частицами и тем самым в процессе горячего прессования повысить аутогезионное взаимодействие [60, 62].

Для получения полимерного раствора использовали в качестве растворителя хлороформ (трихлорметан). Формула – CHCl_3 ; плотность – 1,49 г/см³; $M=119,38$ г/моль. Для осаждения полимера использовали этиловый спирт, формула – $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; плотность – 0,7893 г/см³; $M=46,069$ г/ моль.

2.2 Биосинтез бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646.

Получение биополимера производилось по технологии культивирования бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 в ферментере, используя стратегию ограничения азота.

При культивировании важным аспектом является соблюдение стерильности. Если произойдет контаминация культуры, то процесс биосинтеза не даст нужного результата, а также культура может вовсе погибнуть.

Необходима предварительная стерилизация всей посуды (колбы, пробирки) в автоклаве насыщенным водяным паром при давлении в 1 атм.

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

В качестве источника азота использовали мочевины концентрацией 60 г/л. Готовый раствор насосом перекачивают в ёмкость через стерилизующий фильтр.

Инокулят получали методом смыва музейной культуры с поверхности среды в стерильную колбу объемом 2 литра с 1 литром полной среды Шлегеля. Для культивирования бактерий за основу принята солевая среда Шлегеля: $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ – 9.1; KH_2PO_4 – 1.5; $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.025 (г/л) и сбалансированная кислотнo-солевая среда (Волова, 2004). Источником железа служит раствор лимоннокислого железа (5 г/л), который вводят из расчета 5 мл/л. Микроэлементы добавляли в среду по прописи Хоагланда из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды. Стандартный раствор микроэлементов содержит: H_3BO_3 – 0,228; $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,176; $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; NiCl – 0,008 (г/л).

Музейную культуру выращивают в жидкой солевой среде Шлегеля со стартовой концентрацией глюкозы или глицерина 10 г/л.

Далее колбы помещаются в шейкер инкубатор Innova 44 при температуре 30 °С и 250 об/мин в течение 20-22 часов. Оптическая плотность инокулята после смыва из пробирок должна составлять не менее 0,1 г/л, а перед культивированием в ферментере не менее 0,2 г/л [52].

Культивирование бактерий проводится на опытном производстве Сибирского Федерального Университета, с использованием ферментёра

Bioengineering NLF 22 с объемом аппарата 30 л и рабочем объеме от 10 до 20 л при температуре 30 °С. Оптическая плотность инокулята после смыва из пробирок должна составлять не менее 0,1 г/л, а перед культивированием в ферментере не менее 0,2 г/л.

При достижении необходимой концентрации полимера в клетке останавливают процесс биосинтеза. Культуральную жидкость концентрировали на ультрафильтрационной установке (АСФ 020, Россия). Далее концентрированную суспензию откручивали в центрифуге Avanti при 5000 оборотах. На выходе получили бактериальную пасту с влажностью 50-60%, которая лиофильно высушивали в сублимационной установке (IlshinBioBase, Корея). Высушенную биомассу с влажностью не более 0,5% помещали в экстрактор, в котором проводили экстракцию полимера метиленом хлористым при перемешивании с нагревом до 40 °С в течении суток. Далее раствор полимера отфильтровывали от клеточных стенок в герметичном фильтре через бельтинг. Полученный раствор полимера собирали в осадителе. Осаждение полимера из экстракта осуществляли этанолом в соотношении 1:2. Далее осажденный полимер отфильтровывали в пресс фильтре. Отжатый от растворителя полимер гранулировали на грануляторе (Fimar, Италия). Рост биомассы клеток в процессе культивирования регистрировали оптическими показателями культуры (фотоколориметр КФК-2МП, Россия). Концентрацию клеток X , г/л, регистрировали весовым способом. Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза образца на хромато-масс-спектрометрической системе «Agilent 7820» (США) [52].

2.3 Получение композитных материалов

Смешивание П(ЗГБ) и хлороформа проводили с помощью магнитной мешалки Heidolph (Рисунок 5) при 50 °С, со скоростью 150 об/мин. Далее в

раствор добавляли необходимое количество наполнителя и перемешивали в течении 30 мин (Heidolph).



Рисунок 5 – Магнитная мешалка Heidolph.

Размол наполнителей проводится ударно-сдвиговым воздействием на ультрацентрибежной мельнице ZM 200 (Retsch, Германия) (Рисунок 6); использовали сито с диаметром отверстий 0,5 мм; скорость вращения ротора 12000 об/мин.



Рисунок 6 – Ультрацентрибежная мельница ZM 200.

Для измельчения П(ЗГБ) использовали многостадийный размол с ситами с диаметром отверстий 2,0 и 1,0 мм; скорость вращения ротора составляла 18000 об/мин.

Измельченным смесям придавали форму с помощью гидравлического прессы Avto series Plus - Carver Inc, США (Рисунок 7). Формование образцов проводилось при температуре 170 °С (температура плавления поли(3-гидроксибутирата), под давлением 2000 Па в течении 5 минут, с возможностью контроля давления и температуры.



Рисунок 7 - Гидравлический пресс Avto series Plus - Carver Inc.

2.4 Исследование свойств поверхности

Свойства поверхности образцов проводили с помощью анализатора формы капли DSA-25E «Krüss», Германия (Рисунок 8) и программного обеспечения DSA-4. Капли воды и дийодметана по очереди помещали на поверхность образца, далее делали снимок, по изображению капли измеряли углы контакта жидкостей с поверхностью. Для оценки поверхностных свойств рассчитывали значения краевых углов смачивания, полярную и дисперсную составляющие поверхностного натяжения.

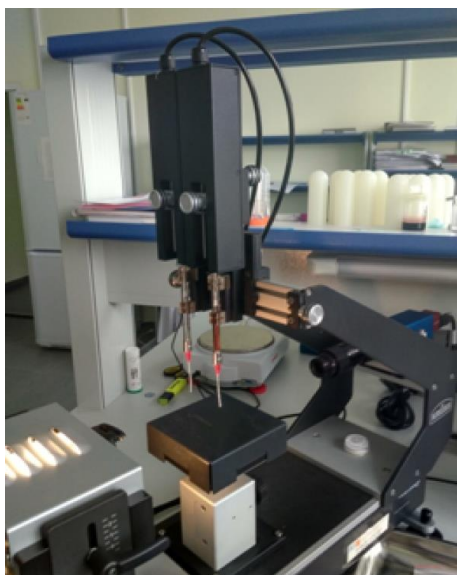


Рисунок 8 – Анализатор формы капли капли DSA-25E.

В работе исследовалась влагоемкость изделий из П(ЗГБ). Объектами исследований являлись кубики из древесины, предварительно обработанные 4 %-м раствором П(ЗГБ) и выдержаны в дистиллированной воде в течение 1, 2 и 3 часов. Влагоемкость образцов измеряли на анализаторе влажности Mettler Toledo, Швейцария (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Анализатор влажности Mettler Toledo.

2.5 Дифференциальная сканирующая калориметрия

Термический анализ исходных материалов и смесей выполнялся при использовании дифференциального сканирующего калориметра DSC-1

(Mettler Toledo, Швейцария) (Рисунок 10). Исследуемые образцы (до $12 \pm 0,2$ мг каждый) помещаются в алюминиевый тигель перед измерением. Каждый образец измеряется не менее 3 раз. Образцы нагреваются со скоростью $5 \text{ }^\circ\text{C} / \text{мин}$ до $320 \text{ }^\circ\text{C}$, затем охлаждаются до $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, выдерживаются в течение 3 минут при данной температуре и вновь нагреваются до $320 \text{ }^\circ\text{C}$. Температура кристаллизации ($T_{кр}$), плавления ($T_{плав}$) и термического разложения ($T_{дегр}$) определяется по пикам на термограммах с использованием программного обеспечения «StarE».



Рисунок 10 – Дифференциально сканирующий калориметр DSC-1.

2.6 Исследование физико-механических свойств

Физико-механические свойства прессованных образцов исследовали с помощью универсальной электромеханической испытательной машины Instron 5565, 5KN, Великобритания (Рисунок 11). Скорость испытания – 3 мм/мин . Испытания проводили для каждого типа композита по 5 образцов. Предварительно измеряли толщину образцов с помощью микрометра EDM-25-0.001 («Legioner», Германия). С помощью программного обеспечения Bluehill 2 («Elancourt», Франция) были рассчитаны значения модуля Юнга (МПа), предел прочности (МПа), деформация при разрушении (%). Погрешность измерения не превышала 10% .

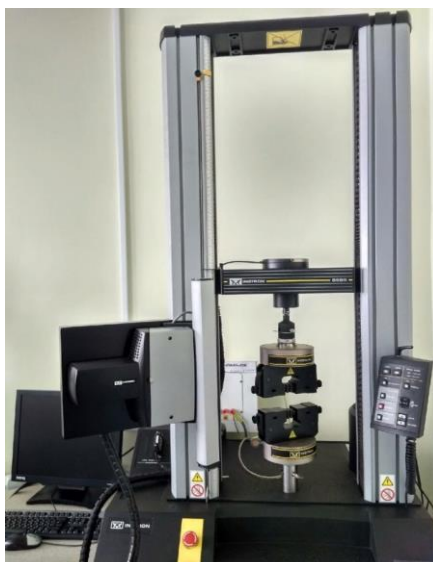


Рисунок 11 - Универсальная электромеханическая испытательная машина Instron 5565, 5 KN.

2.7 Исследование биodeградации прессованных композитных форм

Деградация образцов исследовалась в почвенных микроэкосистемах (Рисунок 12). Контейнеры заполняли влажной землей (150 гр), в центре которых были заложены образцы в 3-х кратной повторности в мешочках из органзы на глубине 1 см. Инкубировали при комнатной температуре (21-23 °С) с поддержанием влажности на постоянном уровне 50 %. Образцы извлекались каждые 2 месяца, очищались от остатков земли и после высушивания взвешивались на лабораторных весах Ohaus PA-512C. Процент убыли массы определяли по формуле:

$$m = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

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



Рисунок 12 – Фото почвенных микроэкосистем.

2.8 Методы выделения почвенных деструкторов

Для анализа почвенной микрофлоры использовались общепринятые микробиологические методы. Посев образцов почвы осуществлялся на твердые питательные среды для определения численности грибов и бактерий. Мясопептонный агар использовали для определения бактерий, Сусло агар – для определения грибов. Для посева бактерий использовали два разведения 10^4 , 10^5 , для грибов 10^2 , 10^3 . Инкубировали в течение 7 дней: бактерии при 30 °С, грибы при 25 °С. Через 7 суток был сделан подсчет выросших колоний и на основании полученных данных были вычислены средние величины КОЕ по формуле:

$$X = \frac{a \times b}{c \times d} \quad (2)$$

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

Для выявления микроорганизмов-деструкторов методом смыва с прессованных форм были взяты пробы, которые высевали на специализированную среду, где в качестве источника углерода был 0,25 % порошкообразный ПГА. Рост микроорганизмов, обладающих

деполимеразной активностью, сопровождался образованием вокруг колоний на поверхности агаризованной среды характерных прозрачных зон. Количество микроорганизмов в исследуемых образцах определяли по формуле 2.

2.9 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов проводилась по стандартным методикам с использованием программного пакета анализа данных Microsoft Excel. Эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях. Проводили расчет среднего значения, среднего квадратичного отклонения и доверительного интервала.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изъяты страницы 33-52 в связи с авторским правом.

ВЫВОДЫ

1. Проведено культивирование и получена партия поли(3-гидроксибутирата). За 60 часов процесса культивирования биомасса бактерий составила 88 г/л, содержание П(ЗГБ) - 82,0 %.

2. Использование раствора П(ЗГБ) в качестве гидрофобизатора позволила снизить влагопоглощение образцов изделий из древесного волокна в 3 раза по сравнению с контролем.

3. Получены образцы прессованных форм композитных материалов с различным соотношением полимер-наполнитель (бактериальная целлюлоза, тальк и волокно древесины).

4. Исследованы их физико-химические и физико-механические характеристики. Добавление наполнителей не оказало существенного влияния на температуры плавления. Добавление наполнителей волокна древесины и талька повышает температуры кристаллизации более чем на 10 и 20 °С, соответственно, а так же снижает температуры деградации более чем на 10 °С. Добавление бактериальной целлюлозы к П(ЗГБ) приводит к увеличению температуры деградации смеси более чем на 30 °С. Установлено, что увеличение содержания П(ЗГБ) в композиции приводит к возрастанию величины угла контакта жидкости с поверхностью. Определение физико-механических характеристик образцов композитов показало, что добавление наполнителей приводит к увеличению их прочности, при неизменной эластичности. Наибольшие значения модуля Юнга имеют композиты, где в качестве наполнителей использовались бактериальная целлюлоза и волокно древесины.

5. Исследование процесса биodeградации в почве показало, что композиты с бактериальной целлюлозой разрушались в 2 - 3 раза быстрее, по сравнению с композитом из волокна древесины. В процессе биodeградации в почве образцов доля общего количества бактерий и микромицетов увеличилась, что указывает на стимулирующее влияние полимера как

источника углерода на почвенную микрофлору. К концу эксперимента численность бактерий-деструкторов значительно выросла, и превышала исходное значение в 1,6 и 3 раза у композитов П(ЗГБ)/ волокно древесины и П(ЗГБ)/бактериальная целлюлоза, соответственно. Численность грибов-деструкторов незначительно возросла.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akaraonye E. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice / E. Akaraonye, T. Keshavarz, I. Roy // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. - 2010. - № 85. - P. 732–743.
2. Altaee N. Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil / N. Altaee, G.A. El-Hiti, A Fahdil // *SpringerPlus*. – 2016.- V. 5 – P. 762.
3. Beatriz Melendez-Rodriguez. High-Oxygen-Barrier Multilayer Films Based on Polyhydroxyalkanoates and Cellulose Nanocrystals / Beatriz Melendez-Rodriguez, Sergio Torres-Giner, Inmaculada Angulo // *Nanomaterials*. – 2021. - V 11. - P 14.
4. Bátori, V. Anaerobic degradation of bioplastics: A review / V. Bátori, D. Åkesson, A. Zamani, M.J. Taherzadeh // *Waste Management*. – № 80. – 2018. C. 406–413.
5. Boyandin, A.N. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates by soil microbial communities of different structures and detection of PHA degrading microorganisms. / A.N. Boyandin, S.V. Prudnikova, M.L. Filipenko, E.A. Khrapov, A.D. Vasil'ev, T.G. Volova // *Applied Biochemistry and Microbiology*. –Т.1. – № 48. – 2012. C. 28-36.
6. Boyandin, A.N. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils / A.N. Boyandin, S.V. Prudnikova, V.A. Karpov, V.N. Ivonin, T.H. Nguyen, T.G. Volova и др. // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – № 83. – 2013. C. 77-84.
7. Briassoulis, D. Key parameters in testing biodegradation of biobased materials in soil / D. Briassoulis, A. Mistriotis // *Chemosphere*. – № 207. – 2018. C. 18-26.
8. Chan C. Mechanical and physical stability of polyhydroxyalkanoate (PHA)-based wood plastic composites (WPCs) under natural weathering / C. M.

Chan, S. Pratt, P. Halley, D. Richardson, A. Werker, B. Laycock, L.J. Vandi // Polymer Testing – 2018. – P. 1-34.

9. Chan, C. M. Mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate-co 3-hydroxyvalerate)/wood flour composites: Effect of interface modifiers / C. M. Chan, L.J. Vandi, S. Pratt, P. Halley, D. Richardson, A. Werker, B. Laycock // Journal of applied polymer science. –2018 – V. 135 – P. 46828.

10. Chan, C. M. Wood-PHA Composites: Mapping Opportunities / C.M. Chan, L.J. Vandi, S. Pratt, D. Richardson, A. Werker, B. Laycock // Polymers. – 2018 – V. 10 – P. 1 – 15.

11. Chiara S. Extraction of polyhydroxyalkanoates from mixed microbial cultures: impact on polymer quality and recovery / S. Chiara, F. Abbondanzi, P. Galletti, L. Giorgini, L. Mazzocchetti, C. Torri, E. Tagliavini // Bioresource Technology. - 2015. - № 189. - P.195 — 202.

12. Chinaglia, S. Biodegradation rate of biodegradable plastics at molecular level / S. Chinaglia, M. Tosin, F. Degli-Innocenti // Polymer Degradation and Stability. – № 147. – 2018. C. 237–244.

13. Dharmalingam S. Biodegradation and Photodegradation of Polylactic Acid and Polylactic Acid/Polyhydroxyalkanoate Blends Nonwoven Agricultural Mulches in Ambient Soil Conditions/ S. Dharmalingam //University of Tennessee – 2014.

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

15. Denis Mihaela. Nanostructured biocomposites from aliphatic polyesters and bacterial cellulose / Denis Mihaela, Panaitescu Adriana, Nicoleta Frone, Ioana Chiulan // Industrial Crops and Products. - 2016 - V 93. - P 251-266.

16. Dilkes-Hoffman, L.S. The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study / L.S. Dilkes-Hoffman, P.A. Lant, B. Laycock, S. Pratt // Marine Pollution Bulletin – 2019. – № 142. - C. 15–24.

17. Emadian, S.M. Biodegradation of bioplastics in natural environments. / S.M. Emadian, T.T. Onay, B. Demirel // Waste management. – № 59. – 2017. C. 526-536.
18. Fernandes, M. Factors affecting polyhydroxyalkanoates biodegradation in soil / M. Fernandes, M. Alves, A.A. Vicente // Polymer Degradation and Stability. – 2020. C.109408.
19. Gallardo-Cervantes, M. Biodegradability and improved mechanical performance of polyhydroxyalkanoates/agave fiber biocomposites compatibilized by different strategies / M. Gallardo-Cervantes, Y. González-García, A.A. Pérez-Fonseca, M.E. González-López, R. Manríquez-González, D. Rodrigue, J.R. Robledo-Ortíz // Journal of Applied Polymer Science. – 2021. –T.15. – №138. C. 50182.
20. Guerin, P. Degradation of natural and artificial poly[(R)-3-hydroxyalkanoate]: From biodegradation to hydrolysis / P. Guerin, E. Renard, V. Langlois // Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications. Microbiology Monographs. – Berlin: Springer-Verlag, 2010. C. 283-321.
21. Hanson A. J. Community proteomics provides functional insight into polyhydroxyalkanoate production by a mixed microbial culture cultivated on fermented dairy manure / A. J. Hanson, N. M. Guho, A. J. Paszczynski, E. R. Coats // Applied Microbiology Biotechnology. - 2016. - №100. — P. 7957 – 7976.
22. Harmaen, A.S. Thermal and biodegradation properties of poly(lactic acid)/fertilizer/oil palm fibers blends biocomposites. / A.S. Harmaen, A. Khalina, I. Azowa, M.A. Hassan, A. Tarmian, M. Jawaid // Polymer Composites. – № 36. – 2015. C. 576-583.
23. Haider, T.P. Plastics of the future? The impact of biodegradable polymers on the environment and on society / T.P. Haider, C.Völker, J. Kramm, K. Landfester, F.R. Wurm // Angewandte Chemie – International Edition, 2018.
24. Jeremic S. Understanding bioplastic materials – Current state and trends / Jeremic S., Milovanovic J., Mojicevic M., Bogojevic SS., [et al.] // Journal of the serbian chemical society – 2020. – V 85. N 12. - P. 1507-1538.

25. Joyyi, L. Composite properties and biodegradation of biologically recovered P (3HB-co-3HHx) reinforced with short kenaf fibers / L. Joyyi, M.Z.A. Thirmizir, M.S. Salim, L. Han, P. Murugan, K.I. Kasuya, F.H. Maurer, M.I.Z. Arifin, K. Sudesh // *Polymer Degradation and Stability*. – № 137. – 2017. C. 100-108.
26. Koller M. *Poly(hydroxyalkanoates) for Food Packaging: Application and Attempts towards Implementation*. - 2014.
27. Kovalcik A. Effect of surface modification of beech wood flour on mechanical and thermal properties of poly (3-hydroxybutyrate)/wood flour composites / A. Kovalcik, R. Wimmer, H. Marta, M. Koller // *Holzforschung*. – 2009. – V. 63(5) – P. 565 – 570.
28. Kumar S. *Biodegradable and Recyclable Packaging Materials: A Step Towards a Greener Future*/ S.Kumar, P.Singh, S.Gupta, J.Ali, S. Baboota // *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. - 2019.
29. Laycock, B. prediction of biodegradable polymers / B. Laycock, M. Nikolik, J.M. Colwell, E. Gauthier, P. Halley, S. Bottle, G. George // *Program Polymer Science*. – № 71. – 2017. C. 144–189.
30. Lucas, N. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques – a review / N. Lucas, C. Bienaime, C. Belloy, M. Queneudec, F. Silvestre, J.E. Nava-Saucedo // *Chemosphere*. – № 73. – 2008. C. 429–442.
31. Mariano Pracella. Polyhydroxyalkanoate Nanocomposites with Cellulose Nanocrystals as Biodegradable Coating and Packaging Materials / Mariano Pracella, Claudio Mura, Giancarlo Galli // *ACS Applied Nano Materials*. – 2021. - V 4. - P 260-270.
32. Mariia Stepanova. Modification of Cellulose Micro- and Nanomaterials to Improve Properties of Aliphatic Polyesters/Cellulose Composites: A Review. – 2022. - V 14. N 7. - P 1477.
33. Martínez-Tobón D. Polyhydroxybutyrate (PHB) biodegradation using bacterial strains with demonstrated and predicted PHB depolymerase activity / D.

Martínez-Tobón, M. Gul, A. Elias, D. Sauvageau // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. - V.102. – P. 8049–8067.

34. Meereboer K.W. Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites/ K. W. Meereboer, M. Misra, A. K. Mohanty// *Green Chemistry* – 2020. – №17.

35. Peters, V. and Rehm, B.H.A. In vivo monitoring of PHA granule formation using GFP-labeled PHA synthases / *FEMS Microbiol Lett* -2005.- V.248 – P. 93–100.

36. Potter M. Regulation of phasin expression and PHA granule formation in *Ralstonia eutropha* H16 / M Po'tter, M.H. Madkour, F Mayer, A. Steinbu'chel // *Microbiology*. -2002.- V. 148 – P. 2413–2426.

37. Potter, M. and Steinbu'chel, A. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation / *Biomacromolecules*. -2005.- V. 6 – P. 552–560.

38. Ratledge, C. and Kristiansen, B. *Basic Biotechnology*, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. P. – 568.

39. Ren H. Effects of Lignophenols on Mechanical Performance of Biocomposites Based on Polyhydroxybutyrate (PHB) and Polypropylene (PP) Reinforced with Pulp Fibers / H. Ren, Z. Liu, H. Zhai, Y. Cao // *Bioresources*. – 2014. – V.10. – P.432-447.

40. Reddy, C.S.K. Polyhydroxyalkanoates: an overview / C.S.K. Reddy, R. Ghai, K.V.C. Rashmi // *Bioresource Technology*. – № 87. – 2003. - C. 137–146.

41. Requena R. Effect of plasticizers on thermal and physical properties of compression-moulded poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalerate)] films/ R. Requena, A. Jiménez, M.Vargas, A. Chiralt// *Polymer Testing* – 2016. – V 56. – P. 45-53.

42. Rydz J. Present and Future of Biodegradable Polymers for Food Packaging Applications Elsevier/ J.Rydz, M. Musioł, B. Zawidlak-Węgrzyńska, W.Sikorska//*Biopolymes for Food Design* - 2018. – C 431–467.

43. Šerá, J. Accelerated biodegradation testing of slowly degradable polyesters in soil / J. Šerá, L. Serbruyns, B. De Wilde, M. Koutný // *Polymer Degradation and Stability*. – T. 171. – № 109031. – 2020.
44. Shah, A.A. Biological degradation of plastics: a comprehensive review / A.A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, S. Ahmed // *Biotechnology Advances*. – № 26. – 2008. C. 246–265.
45. Shima, M. Biodegradation of plastics // *Current Opinion in Biotechnology*. – № 12. – 2001. C. 242–247.
46. Silva D.A.K. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/wood powder biocomposites: Thermal and mechanical properties and water absorption profile / D.A.K. Silva, V. da Silva, K. Batista, A.J. Zattera // *Journal of Reinforced Plastics and Composites*. – 2014. – V. 33(8) – P.741-748.
47. Singh S. Wood fiber reinforced bacterial bioplastic composites: Fabrication and performance evaluation / S. Singh, A. K. Mohanty, M. Misra // *Composites Science and Technology* – 2007. – V. 67 – P. 1753–1763.
48. Srubar W.V. Mechanisms and impact of fiber–matrix compatibilization techniques on the material characterization of PHBV/oak wood flour engineered biobased composites / W.V. Srubar, S. Pilla, Z.C. Wright, C.A. Ryan, J.P. Greene, C.W. Frank, S.L. Billington // *Composites Sci. Technol.* – 2012. – V.72 – P.708-715.
49. Sridewi, N. Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem / N. Sridewi, K. Bhubalan, K. Sudesh // *Polymer Degradation and Stability*. – 2006 –T. 12. – № 91. - C. 2931-2940.
50. Steinbüchel, A. and Lu'tke-Eversloh, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms / *Biochem Eng.* – 2003.- V 16.- P. 81–96.
51. Vandi L.J. Extrusion of wood fibre reinforced poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) biocomposites: Statistical analysis of the effect of

processing conditions on mechanical performance / L.J. Vandi, C. M. Chan, A. Werker, D. Richardson, B. Laycock, S. Pratt // *Polymer Degradation and Stability*. – 2018. – P. 1–35.

52. Volova T. A Glucose-Utilizing Strain, *Cupriavidus euthrophus* B10646: Growth Kinetics, Characterization and Synthesis of Multicomponent PHAs / E. Kiselev, O. Vinogradova, E. Nikolaeva, A. Chistyakov // *PLOS ONE*. – 2014. – V. 9. - P. 1–15.

53. Volova T. Degradable Polyhydroxyalkanoates of Microbial Origin as a Technical Analog of Non-Degradable Polyolefines / *Journal of Siberian Federal University. Biology* – 2015. - P.131-151.

54. Wang Y. Preparation and Characterization of Controlled Release Poly (MelamineFormaldehyde) Microcapsules Filled with 2,4-D Isooctyl / Y. Wang, C. Qian, X. Yan, H. Liu // *Ester. Int. J. Polym. Mat. Polym. Biomater.* – 2017 – V. 66 – P. 963–969.

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

56. Woolnough, C.A. Surface changes in polyhydroxyalkanoate films during biodegradation and biofouling. / C.A. Woolnough, T. Charlton, L.H. Yee, M. Sarris, L.J.R. Foster // *Polymer International*, № 57, 2008. C. 1042-1051.

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

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

59. Zhalnina, K. Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment / K. Zhalnina, R. Dias, P.D. de Quadros, A. Davis-

Richardson, F.A. Camargo, I.M. Clark, S.P. McGrath, P.R. Hirsch, E.W. Triplett // *Microbial ecology*. –Т. 2. – № 69. – 2015.

60. Влияние гидротермической обработки древесины на свойства древесных прессованных материалов / Н. Г. Базарнова [и др.] // *Химия растительного сырья*. – 1997. – № 1. – С. 11-16.

61. Волова, Т.Г. Биоразрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение: монография / Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая // Красноярск: Красноярский писатель. - 2011. – С. 400.

62. Казицин, С. Н. Разработка режима горячего прессования плит без связующих веществ из механоактивированных древесных частиц / С. Н. Казицин, В. Н. Ермолин, М. А. Баяндин, А. В. Намятов // Красноярск: Хвойные Бореальной Зоны. – 2016. – Том XXXVII. – N 5-6. – С. 315 – 318.

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

64. ТРПН ГОСТ 19729-74. Тальк, молотый для производства резиновых изделий и пластических масс. Технические условия: внесен Министерством промышленности строительных материалов СССР: дата введения — 1974—04 — 25: М.: Издательство стандартов - 1992- 7 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Приложение А – Физико-механические характеристики прессованных композитных форм

Образец	Модуль Юнга, МПа	Предел прочности, МПа	Толщина, мм	Деформация при разрушении, %
П(ЗГБ)	3615,10±100,12	39,13±5,9	4,25±0,19	1,59±0,35
П(ЗГБ)/талък:				
70:30	454,39±103,68	4,05±1,97	9,12±0,42	2,36±0,21
60:40	521,26±107,23	3,63±2,61	9,71±0,53	2,08±0,13
50:50	613,15±101,48	3,84±1,34	9,16±0,11	2,14±0,52
П(ЗГБ)/бактериальная целлюлоза:				
70:30	692,9 ±201,31	12,98±1,21	4,27±0,23	2,58±0,65
60:40	928,21±248,46	13,41±1,11	4,19±0,19	2,34±0,26
50:50	1808,76±308,51	14,38±1,09	4,24±0,14	2,01±0,08
30:70	1823,56±234,92	14,24±1,28	4,32±0,17	2,03±0,13
10:90	2582,15±298,17	23,47±1,97	4,31±0,11	2,08±0,24
Бактериальная целлюлоза	2929,31±301,24	33,54±2,76	4,25±0,13	2,39±0,37
П(ЗГБ)/волокно древесины:				
70:30	1031,96±276,45	12,80±0,95	4,43±0,31	4,12±1,14
60:40	1293,42±134,22	13,51±1,01	4,38±0,16	3,56±1,11
50:50	1459,53± 114,67	14,22±1,64	4,42±0,11	2,58±0,45
30:70	1724,81± 172,64	18,19±1,16	4,39±0,17	2,93±0,38
10:90	1843,57± 203,78	19,48±1,85	4,42±0,14	3,34±1,05
Волокно древесины	1971,28±254,31	17,76±1,98	4,43±0,12	2,33±0,93

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Приложение Б.1 – Показатели остаточной массы в течении 240 дней экспозиции в полевой почве, для композита П(ЗГБ)/ВД

Время экспозиции, сут	Остаточная масса образцов, %				
	ВД 100%	ВД 90%	ВД 70%	ВД 50%	ВД 30%
0	100	100	100	100	100
60	76,2	81,3	89,2	88,8	91,5
120	60,7	73,1	85,6	86,9	89,8
180	54,8	61,2	78,3	83,2	87,1
240	51,1	53,4	56,6	54,7	58,7

Приложение Б.2 – Показатели остаточной массы в течении 240 дней экспозиции в полевой почве, для композита П(ЗГБ)/БЦ


Время экспозиции, сут	Остаточная масса образцов, %				
	БЦ 100%	БЦ 90%	БЦ 70%	БЦ 50%	БЦ 30%
0	100	100	100	100	100
60	89,5	80,7	84,8	91,4	94,5
120	64,1	70,6	63,1	83,7	89,4
180	54,5	50,9	54,1	48,1	54,2
240	18,5	25,5	36,1	39,4	43,5

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

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова
« 26 » июня 2023 г.

МАГИСТЕРСКАЯ РАБОТА

Получение и исследование свойств композитных материалов на основе
разрушаемых полигидроксиалканоатов

06.04.01 – Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

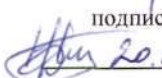
Руководитель

 22.06.23

доцент, канд. техн. наук С.В. Барановский

должность, учёная степень, инициалы, фамилия

Выпускник

 20.06.23

Н.Д. Ипатова

инициалы, фамилия

Рецензент

 21.06.23

доцент, канд. техн. наук М.А. Баяндин

должность, учёная степень, инициалы, фамилия

Красноярск 2023