

И. А. Хадыко, Я. В. Казаков, Е. В. Новожилов,
А. В. Канарский

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОДЕГРАДАЦИИ МАТЕРИАЛОВ ЭКСПРЕСС МЕТОДОМ

Ключевые слова: пленка, крахмал, деградация, амилазы, гидролиз, прочность.

Экспериментально показано, что обработка коммерческой крахмалсодержащей упаковочной пленки амилолитическими ферментными препаратами способствует высвобождению из состава пленки крахмала. Установлено, что ферментативный гидролиз крахмала пленки Mater-Bi амилазами существенно уменьшает прочность материала пленки.

Keywords: film, starch, degradation, enzymatic preparation, hydrolysis, strength.

It is experimentally shown that the treatment of commercial starch packaging film by amylolytic enzyme preparations promotes the release of starch from the film composition. It is established that the enzymatic hydrolysis of starch of Mater-Bi film by amylolytic enzymes significantly reduces the strength of the film.

Актуальность. Разработка новых биоразлагаемых полимерных материалов для упаковочных целей в промышленности, сельского хозяйства, медицины представляет чрезвычайно актуальную научно-техническую задачу современной науки. С этим связана не менее важная задача по определению характеристик получаемых материалов, в том числе их биоразлагаемости. Одно из направлений получения биоразлагаемых материалов является получение композиций с использованием такого природного полимера как крахмал. Основными преимуществами замены традиционных полимеров, получаемых из продуктов нефтепереработки, на природные являются такие свойства последних как биоразлагаемость и возобновляемость [1,2].

Биологическая деструкция крахмала под действием ферментов при нахождении крахмалсодержащих материалов в природных условиях – это основной процесс, приводящий к разрушению и биоразложению подобных композитов [3,4]. Однако, определение пригодности материалов к биоразложению в естественных условиях является достаточно продолжительным процессом. В этой связи актуальна разработка экспресс методов определения биоразлагаемости материалов. При этом перспективно применение для этих целей ферментов, поскольку в природных условиях они играют решающую роль при разложении материалов.

Цель настоящей работы – определение возможности применения ферментов для оценки биоразложения крахмалосодержащих пленок

Объекты и методы

В качестве испытуемого материала была выбрана крахмалсодержащая пленка с коммерческим названием Mater-Bi производства итальянской фирмы Novamont, которая широко используется в качестве упаковочного материала. Содержание крахмала в совокупности с другими природными компонентами в данном материале составляет около 60 % [3]. Имеющиеся образцы пленки имели характеристики: толщина 15 мкм, плотность 1,38 г/см³, масса 1 м² 20,7 г.

На предварительном этапе были проведены эксперименты по определению содержания крахмала в пленке Mater-Bi. Используемые нами методы основаны на полном гидролизе крахмала до глюкозы и последующим определении ее концентрации в растворе. Количество глюкозы пересчитывали в содержание крахмала с коэффициентом 0,9 и выражали в массовых процентах от начальной массы навески.

Для определения крахмала использовали методику определения легкогидролизуемых полисахаридов древесины [5]. В коническую колбу помещали навеску измельченной с помощью ножниц пленки массой 200 мг и вливали 50 мл 2 %-ной HCl. Нагревали смесь на кипящей водяной бане 3 часа. Концентрацию глюкозы определяли методом Шомоди-Нельсона [6].

Для сравнения использовали также известные методики для определения крахмала в картоне и бумаге: методику SCAN-P 91:09 [7], а также методику, разработанную на кафедре биотехнологии и биотехнических систем Северного (Арктического) федерального университета (метод САФУ) [8].

Обе методики предусматривают щелочную экстракцию крахмала из образцов. При определении по методике SCAN-P 91:09 к навеске пленки массой 100 мг добавляли 50 мл дистиллированной воды и 5 мл 5 М раствора КОН, смесь нагрели на кипящей водяной бане до 95 °С и выдерживали 5 минут. По методике САФУ к навеске пленки массой 100 мг добавляли 50 мл 5 %-ного раствора NaOH и выдерживали при температуре 95 °С в течение 1 часа. После экстракции остаток материала отделяли на стеклянном фильтре, сушили, взвешивали и рассчитывали выход остатка и долю веществ, перешедших в раствор.

Фильтраты нейтрализовали 5М CH₃COOH до pH 5,0 и проводили ферментативную обработку. В данной работе использовали амилолитические ферменты компании Novozymes (Дания). Применяли альфа-амилазу BAN 480L (активность 480 KNU/g), глюкоамилазу Saczyme (активность 750 AGU/g) и препарат Duozyme, в состав которого входят два фермента: альфа-амилаза и глюкоамилаза.

При ферментативной обработке процесс деструкции крахмала под действием амилаз различного вида идет селективно. Альфа-амилаза произвольно расщепляет связи в макромолекулах крахмала, в результате его молекулярная масса быстро снижается, образуются водорастворимые низкомолекулярные декстрины. Глюкоамилаза отщепляет с концов макромолекул крахмала и продуктов его деструкции звенья глюкозы.

Пробы помещали в термостат с температурой 50 °С. Ферменты вносили ступенчато: сначала добавляли альфа-амилазу BAN 480L до концентрации 2,5 г/л, через 1 час добавляли глюкоамилазу Saczyme до концентрации 2,5 г/л, пробу выдерживали при температуре 50 °С еще 1 час. Концентрацию образовавшейся глюкозы определяли методом Шомоди-Нельсона [8].

Для изучения изменения свойств пленки при непосредственной обработке ферментами, ферментативный гидролиз образцов в лаборатории проводили в термостатируемых при 42 °С ячейках, помещенных на качалку. В ячейку вносили навески субстрата в виде полосок размером 100×15 мм и толщиной 15 мкм, 20 мл ацетатного буфера с pH 5,0, растворы амилаз и 20 мкл азида натрия для ингибирования роста микрофлоры. Использовали ферментные препараты BAN 480L, Saczyme и Duozyme при концентрации каждого из них в среде 2,5 г/л. Параллельно ставили холостой опыт в тех же условиях, но без внесения ферментов.

Количество крахмала, удаленного из пленки, определяли по количеству глюкозы в растворе через 2,5; 24; 48 и 72 часа ферментативного гидролиза. Глюкозу определяли методом Шомоди-Нельсона [7] и пересчитывали в содержание крахмала с коэффициентом 0,9, которое выражали в процентах от начальной массы навески.

После ферментативной обработки образцы пленки сушили до воздушно-сухого состояния и определяли потерю массы образцов. Проводили также оценку механической прочности образцов [9], для этого их испытывали на разрывной машине «Тестсистема 101». Условия испытаний на растяжение; длина образца – 25 мм; ширина образца – 15 мм; толщина образца – 15 мкм; скорость растяжения – 50 мм/мин. Обработку результатов испытаний на растяжение проводили по методике [10] с применением программного обеспечения [11].

Обсуждение результатов

Результаты определения содержания крахмала по методикам с обработкой образцов кислотами или щелочами представлены в таблице 1.

Растворение композитного материала пленки в щелочных растворах было значительно выше, чем в кислой среде. При примерно равном извлечении крахмала потеря массы навески при кислотном гидролизе была примерно в 2 раза ниже, чем при обработке горячим щелочным раствором по методике SCAN. Можно сделать вывод о существенном влиянии pH среды на способность к разрушению структуры крахмалосодержащей пленки.

Таблица 1 - Сравнение методик определения содержания крахмала

Метод	Удаление крахмала, % от материала	Потеря массы образца, %
Гидролиз 2%-ной HCl	14,3±1,2	22,7±1,3
Метод SCAN-P 91:09	16,0±0,2	52,5±2,5
Метод САФУ	6,0±1,4	31,8±2,0

Извлечение крахмала методом, основанным на горячей щелочной экстракции (метод SCAN), было в 2,5 раза больше, чем по методике САФУ. Это свидетельствует о том, что данный упаковочный материал не отличается термостойкостью и для эффективного удаления крахмала из пленки важным фактором является температура.

Данные о количестве удаленного крахмала и потере массы (%-ов от исходной абсолютно сухой массы (а. с. м.)) при обработке образцов пленки амилолитическими ферментами представлены на рис. 1. Некоторая часть материала пленки растворяется при обработке в буферном растворе (холостая проба без ферментов).

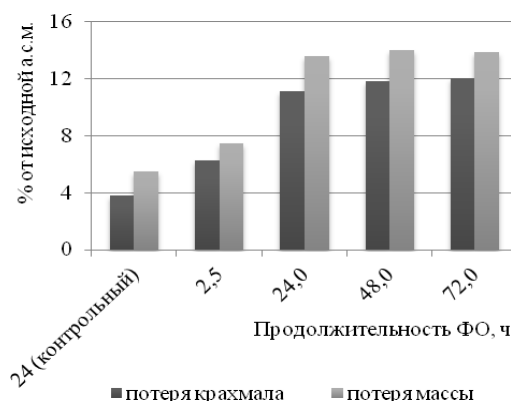


Рис. 1 - Влияние ферментативной обработки на растворение материала

За первые 24 часа ферментативной обработки гидролизует около 70 % крахмала от его количества, определенного по методике SCAN. Дальнейшее удаление крахмала замедляется, и достигает 80 % за 72 часа обработки. Малая толщина пленки (15 мкм) положительно сказывается на деструкции крахмала амилолитическими ферментами. В целом можно сделать вывод, что основная часть крахмала, содержащегося в материале, доступна для действия ферментов.

Удаление крахмала из образца происходит селективно. Разница между удаленным крахмалом и потерей массы образцов при ферментативной обработке составляет около 15 %. При обработке химическими реагентами растворяется значительно больше материала пленки. В работе [4] потери выхода при ферментативной обработке аналогичного материала также были относительно небольшими, в то время как при компостировании в течение 70

дней растворялось около 60 % материала пленки, который был представлен крахмалом в совокупности с другими природными добавками. Близкие значения потерь выхода, 52,5 %, получены при горячей щелочной экстракции по методике SCAN (табл.1).

Визуальных признаков деструкции пленки после ферментативной обработки обнаружить не удалось. Для оценки степени деструкции образцы испытывали на разрывной машине «Тестсистема 101» и получили диаграммы растяжения, показывающие зависимость растягивающей силы от удлинения образца. На прочностные характеристики влияет направление образцов пленки (продольное или поперечное), что свидетельствует о ее анизотропии. На рис. 2 представлены характерные диаграммы растяжения для более прочного продольного направления.

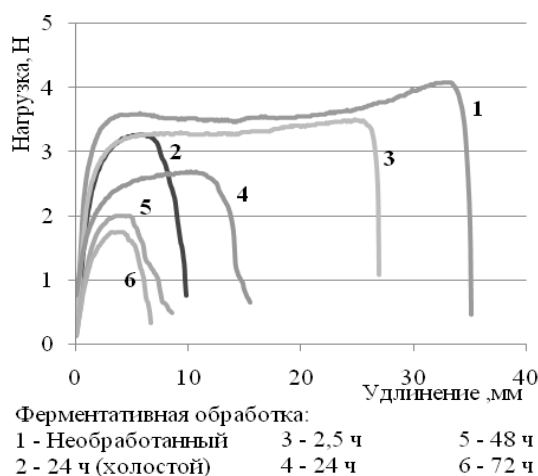


Рис. 2 - Диаграммы растяжения (продольное направление)

Как видно из полученных зависимостей, характер деформаций меняется при увеличении продолжительности обработки образцов. Жесткость образцов постепенно уменьшается, также снижается способность к растяжению образца.

Достаточно 2,5 часов ферментативной обработки, чтобы произошло уменьшение прочности и увеличение хрупкости пленок (рис. 3).

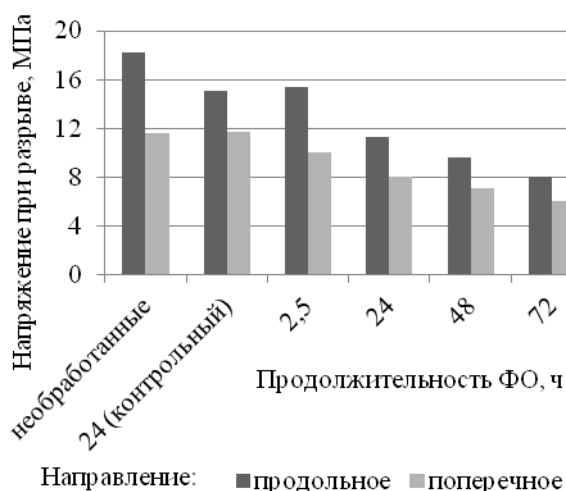


Рис. 3 - Влияние ферментативной обработки на прочность образцов (разрушающее напряжение)

Очевидно, что деструкция крахмала вызывает разрушение структуры пленки, после 72 часов ферментативной обработки прочность пленки уменьшается в 2 раза. Следовательно, крахмал играет существенную роль не только в придании материалу свойства биоразлагаемости, но и в обеспечении прочности, и особенно растяжимости данной полимерной пленки.

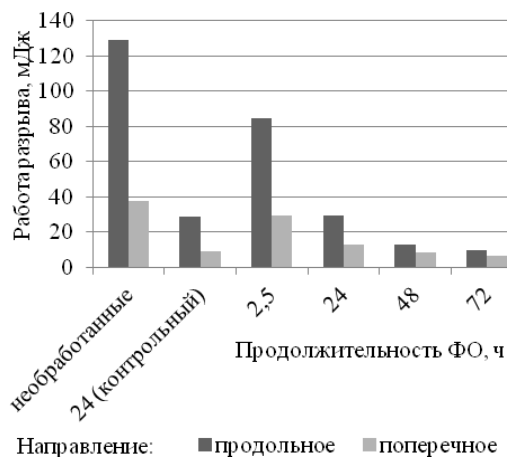


Рис. 4 - Влияние ферментативной обработки на прочность образцов (работа разрушения)

Работа разрыва является интегральной характеристикой прочности материала, поскольку учитывает и его прочность и растяжимость. Как видно из рис. 4, работа разрыва зависит главным образом от продолжительности ферментативной обработки, при обработках более 24 часов резко снижается растяжимость материала за счет исчезновения участка дополнительной вытяжки, что приводит к снижению работы разрушения. Это связано с тем, что на увеличение хрупкости пленки Mater-Bi, наряду с извлечением из нее крахмала, сильно влияет выдерживание пленки в жидкой среде при повышенной температуре, хрупкость увеличивается как при обработке ферментами, так и в холостом опыте.

Доступность крахмала в пленке Mater-Bi для действия амилалитических ферментов дает, таким образом, возможность оценивать биоразлагаемость подобных композитных материалов.

Выводы

Ферментативную обработку амилазами предложено использовать как экспресс метод оценки способности крахмалосодержащих пленок к биоразложению, определяя степень растворения крахмала, потерю массы материала и изменение прочностных характеристик материала.

Работа выполнена при поддержке Программы развития САФУ им. М.В. Ломоносова с использованием оборудования инновационно-технологического центра «Современные технологии переработки биоресурсов Севера»

Литература

1. А.Ш. Закирова, З.А. Канарская, О.С. Михайлова, С.В. Василенко. Вест. Казан. технол. унив. № 9. С. 155-162. (2014).
2. А.Ш. Закирова, З.А. Канарская, О.С. Михайлова, С.В. Василенко. Вест. Казан. технол. унив. № 10. С. 114-123. (2014).
3. M. Vikman, M. Itavaara, K. Poutanen, J. of Environmental Polymer Degradation. 3. P. 23-29. (1995).
4. Р.З. Агзамов, Д.В. Руссков, А.С. Сироткин, Р.Р. Спиридонова, А.М. Кочнев. Вест. Казан. технол. унив. № 8. С. 70-75. (2010).
5. А.В. Оболенская, З.П. Ельницкая, А.А. Леонович. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: Уч. пос. для вузов. Экология. М. 320 с. (1991).
6. А.П. Сеницын, В.М. Черноглазов, А.В. Гусаков. Методы исследования и свойства целлюлолитических ферментов, ВИНТИ, М. Т.25. С. 30–37. (1990).
7. Paper, board and process waters. Starch content. SCAN-P 91:09. SCAN-W 13:09 Accepted (2008).
8. Е.В. Новожилов, Е.В. Смирнов, И.В. Тышкунова, Д.Г. Чухчин., 15-ая Меж. научн.-техн. кон.. «Использование и разработка инновационных экологически безопасных технологий переработки макулатуры при производстве всего спектра бумажно-картонной продукции». Караваево. С. 13-20. (2014).
9. ГОСТ 10354-82. Пленка полиэтиленовая. Технические условия. – Введ. 1983-07-01. – М.: Стандартинформ, 2007. – 22 с.
10. В.И. Комаров, Я.В. Казаков. Лесной вестник МГУЛ, 12, 3, 52-62 (2000).
11. Я.В. Казаков, В.И. Комаров Свид. № 2001610526. РФ.; заявитель и правообладатель ГОУ ВПО АГТУ (RU). № 2001610250. (2001).

© **И. А. Хадыко** – стажер-исследователь каф. биотехнологии и биотехнических систем Северного (Арктического) федерального университета, satrianin@gmail.com; **Я. В. Казаков** – к.т.н., зав. каф. технологии целлюлозно-бумажного производства Северный (Арктический) федеральный университет, j.kazakov@narfu.ru; **Е. В. Новожилов** – д.т.н., зав. каф. биотехнологии и биотехнических систем Северный (Арктический) федеральный университет, e.novozhilov@narfu.ru; **А. В. Канарский** – д-р техн. наук, проф. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, alb46@mail.ru.

© **I. Khadyko** – trainee-researcher of department of biotechnology and biotechnical systems of Northern (Arctic) Federal University, satrianin@gmail.com; **Y. Kazakov** – candidate of engineering science, the head of the department of technology of pulp and paper production of Northern (Arctic) Federal University, j.kazakov@narfu.ru; **E. Novozhilov** – Doctor of engineering science, the head of the department of biotechnology and biotechnical systems of Northern (Arctic) Federal University, e.novozhilov@narfu.ru; **A. Kanarskii** – д-р техн. наук, проф. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, alb46@mail.ru.

