

ТЕРМОГРАВИМЕТРИЧЕСКИЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД – ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ИЗ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

Н.В. Бычин, Д.С. Голубев, Е.А. Скиба

*Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) обладает уникальными физико-химическими свойствами и является многообещающим материалом для широкого круга применения. Целью данной работы является исследование зависимости физико-механических характеристик образцов БНЦ, синтезированных продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12, от способа получения питательных сред – ферментативных гидролизатов из плодовых оболочек овса. Образцы БНЦ были высушены на воздухе. Термогравиметрический анализ образцов БНЦ проведен на термогравиметрическом анализаторе ДТЖ-60; физико-механический анализ – на термомеханическом анализаторе ТМА-60. Методом термогравиметрического анализа показано, что в исследуемых образцах температура начала пиролиза варьирует от 268 °С до 334 °С, при этом при пиролизе теряется от 52 % до 78 %, чем выше данные показатели, тем чище образцы БНЦ и выше их термостабильность. Методом испытания образцов БНЦ на растяжение установлено, что механические свойства полимера существенно зависят от способа получения субстрата для ферментативного гидролиза и последующего биосинтеза БНЦ на полученной питательной среде. По модулю Юнга образцы БНЦ в зависимости от способа получения питательной среды из плодовых оболочек овса отличаются в 13,4 раза: от 933,3 МПа до 69,8 МПа; при этом, чем выше модуль Юнга, тем меньше величина относительного удлинения при пределе текучести, а его значения изменяются в 8,8 раза: от 0,6 до 5,3 %.*

*Ключевые слова: бактериальная наноцеллюлоза, *Medusomyces gisevii*, плодовые оболочки овса, химическая предварительная обработка, ферментативный гидролизат, термогравиметрический анализ, термомеханический анализ, модуль Юнга.*

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) – гомополимер, продуцируемый некоторыми штаммами *Komagataeibacter* (ранее *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*), *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* и *Alcaligenes*, обладает уникальными физико-химическими свойствами, такими как высокая чистота, ультратонкая структура, высокая кристалличность, превосходная механическая прочность, биосовместимость, высокая водоудерживающая способность [1, 2]. Из-за своих свойств БНЦ является многообещающим материалом для широкого круга использования, в качестве прочных полимеров [3], бумаги, искусственной кожи и кровеносных сосудов, диафрагм для акустических систем и электрических проводников [1-2].

Исключительные физико-химические характеристики БНЦ обусловлены трехмерной структурой, состоящей из волокон диаметром 2-4 нм, формирующих переплетенные ленты шириной 100 нм и длиной 1-9 мкм, что в

100 раз меньше, чем древесные волокна [1, 2]. Известно, что продуцент, способ культивирования [4], добавление различных химических реагентов [5], обработка щелочью с целью стерилизации [6], могут влиять на ее структуру и как следствие, на механические характеристики, что является интересным полем для исследований. Исследование термомеханических свойств особенно важно в технологии композитных материалов, выпускаемых на основе БНЦ [7, 8].

Целью данной работы является исследование зависимости физико-механических характеристик образцов БНЦ, синтезированных продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12, от способа получения питательных сред – ферментативных гидролизатов из плодовых оболочек овса (ПОО).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовались ПОО, полученные на ЗАО «Бийский элеватор». Из ПОО получали субстраты для последующего ферментатив-

ного гидролиза путём их предварительной химической обработки простыми химическими реактивами (разбавленными 4 %-ными растворами азотной кислоты и гидроксида натрия) на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН. Использованы авторские методики [9-11], все процессы проводили при атмосферном давлении в стандартном емкостном оборудовании объёмом 250 л. Предварительная химическая обработка ПОО проводилась в следующих вариантах:

– одностадийная обработка азотной кислотой с получением продукта азотнокислой обработки (ПАО) [9];

– двухстадийная обработка азотной кислотой с последующей обработкой гидроксидом натрия с получением технической целлюлозы азотнокислым способом (ТЦ АС) [10];

– одностадийная обработка гидроксидом натрия с получением продукта щелочной деглинизации (ПЦД) [11];

– двухстадийная обработка гидроксидом натрия с последующей обработкой азотной кислотой с получением технической целлюлозы комбинированным способом (ТЦ КС) [10].

Полученные субстраты подвергались ферментативному гидролизу в одинаковых условиях, методика подробно описана в работе [12]. Готовые гидролизаты были стандартизованы по глюкозе путём их разбавления до содержания глюкозы 20 г/л. Гидролизаты отфильтровывались от остатков субстратов и использовались в качестве экстрагентов чёрного байхового чая, вносимого при 100 °С в количестве 15 г/л, что позволяло получить готовые питательные среды с концентрацией экстрактивных веществ чёрного байхового чая 1,6 г/л. Среда отфильтровывалась от остатков чая и использовалась для биосинтеза БНЦ.

Биосинтез БНЦ во всех вариантах проводился в установленных нами ранее оптимальных условиях [13]: температура – 27 °С; продолжительность – 8 суток, стационарные условия. Продуцент – *Medusomyces gisevii* Sa-12, доза инокулята – 10 %. В каждом варианте инокулят в течение 7 суток был адаптирован на тождественной варианту питательной среде.

После завершения культивирования гель-пленки БНЦ жёлто-коричневого цвета снимались с поверхности питательной среды и промывались согласно авторской методике [13], позволяющей получать чистые, жемчужно-белые гель-плёнки БНЦ. После этого

образцы высушивали на воздухе в расплавленном состоянии.

Получено 4 образца БНЦ:

- образец 1 – на среде ферментативного гидролизата ПАО,

- образец 2 – на среде ферментативного гидролизата ТЦ АС,

- образец 3 – на среде ферментативного гидролизата ПЦД,

образец 4 – на среде ферментативного гидролизата ТЦ КС.

Контролем служил образец БНЦ, полученный на синтетической питательной среде.

Термогравиметрический анализ образцов БНЦ проведён на термогравиметрическом анализаторе ДТЖ 60 в следующих условиях: масса навески – 1 мг, скорость нагрева 10 °С/мин, максимальная температура – 600 °С, инертная среда (азот). Прочность определяли по методике, в основе которой последовательность действий, изложенных в [14] на термомеханическом анализаторе ТМА-60, исследуемый образец растягивался со скоростью 5 г/мин до максимальной нагрузки 400 г, температура проведения опыта 23 ± 2 °С. Измерение толщины образцов проведено на толщиномере в соответствии с ГОСТ 17035-86. Испытания каждого образца повторялись не менее 5 раз. Работа выполнена при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 приведена термогравиметрическая кривая контрольного образца БНЦ, полученного на синтетической питательной среде. Характер кривой изменения массы и сопровождающих изменение массы тепловых эффектов можно разделить на три характерных участка. Первый участок кривой связан с испарением легколетучих компонентов образца (воды) в диапазоне температур от 25 °С до 150 °С. Второй участок характеризуется максимальным изменением массы образца, что связано с разложением БНЦ в результате пиролиза в диапазоне температур от 150 °С до 400 °С. На третьем участке наблюдается доразложение материала, которое связывают с деградацией полимерных цепей и шестичленной циклической структуры пирана [15], этот участок наблюдается в диапазоне температур от 400 °С до 600 °С. Каждое из трёх изменений массы сопровождается эндотермическим эффектом.

**ТЕРМОГРАВИМЕТРИЧЕСКИЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА
ПОЛУЧЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД – ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ
ИЗ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА**

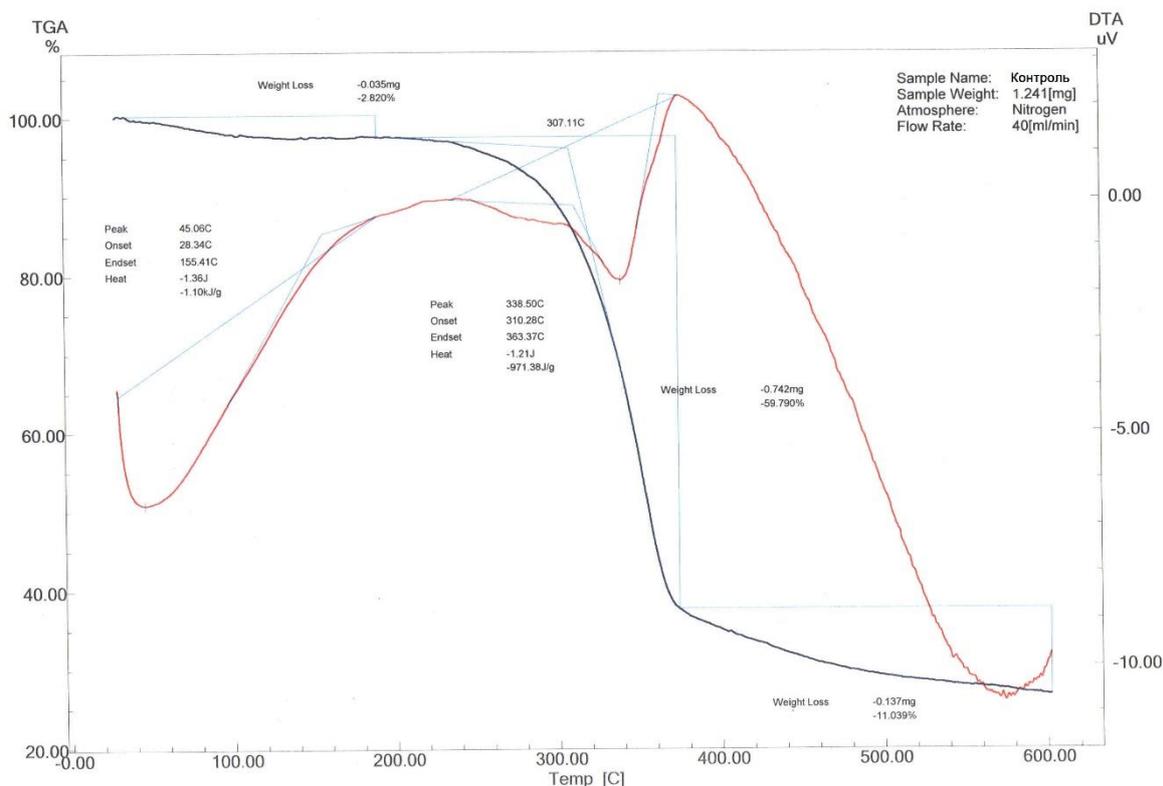


Рисунок 1 – Типичная термогравиметрическая кривая БНЦ на примере контрольного образца

Для опытных образцов получены аналогичные кривые (рис. 2), что хорошо коррелирует с литературными данными [15].

В таблице 1 приведены сводные данные термогравиметрического изменения массы образцов БНЦ. На поведение образца при термическом разложении влияют такие факторы, как молекулярная масса, кристалличность, ориентированность нановолокон, поэтому более резкое снижение массы образцов может быть обусловлено их более высокой кристалличностью, степенью полимеризации и компактностью переплетения структуры [16].

Критической является температура начала разложения или пиролиза (T_2): чем она выше, тем выше термостабильность образца, и тем образец чище. По повышению термостабильности и чистоты образцы можно расположить в ряд: ТЦ АС < контроль < ТЦ КС < ПАО < ПЦД. Кроме того, на повышение чистоты образцов в приведенном ряду указывает второй характерный показатель – изменение массы образца в диапазоне его разложения (ΔP_2). В представленном ряду при пиролизе теряется от 52 % до 78 %, чем изменение массы больше, тем образец чище. Соответственно, на рисунке 2, чем меньше

остаток неразложившейся БЦ, тем чище представленный образец и тем выше его термостабильность.

Можно предположить, что температура пиролиза указывает также на величину фибрилл волокна: чем она выше, тем крупнее волокно. Для образца 2 температура разложения минимальна – 268,3 °С (БНЦ, полученная на ферментативном гидролизате ТЦ АС), что свидетельствует о наименьших размерах его нанофибрилл из всех представленных образцов БНЦ.

На рисунке 3 представлены кривые деформации образцов БНЦ. Все кривые имеют аналогичный характер и показывают, что высушенные на воздухе образцы БНЦ являются материалом, не имеющим пределов текучести.

Однако, для таких материалов можно выделить условный предел текучести, согласно значениям которого образцы БНЦ можно расположить в порядке уменьшения показателя в ряд: контроль > ПАО > ТЦ КС > ТЦ АС > ПЦД (таблица 2), при этом значения первого и последнего образцов в ряду различаются в 3,1 раза.

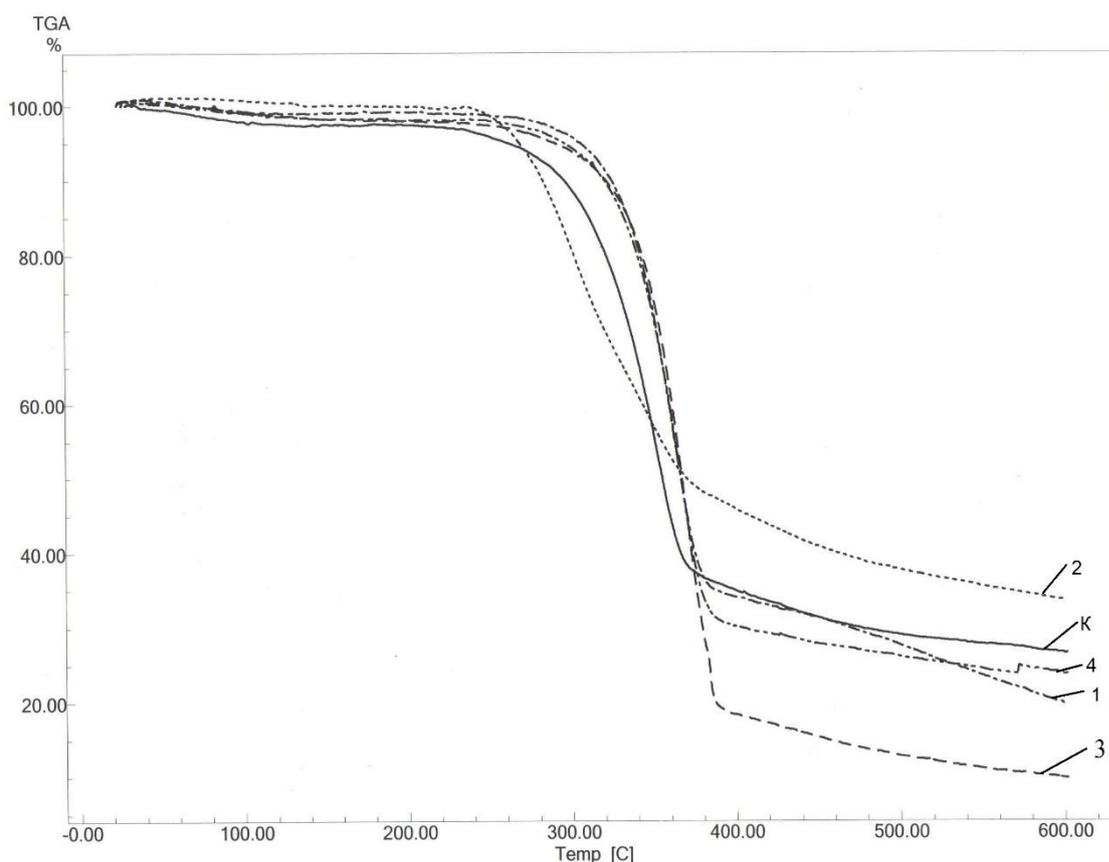


Рисунок 2 – Термогравиметрические кривые опытных и контрольного образцов БНЦ

Таблица 1 – Сводные данные термогравиметрического анализа образцов БНЦ

| № образца БНЦ | 1 | 2 | 3 | 4 | Контроль |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| $\Delta P_1, \%$ | 2,52 | 1,03 | 3,07 | 1,80 | 2,8 |
| $\Delta T_1, ^\circ\text{C}$ | 44,8-168,6 | 51,7-178,0 | 43,0-189,8 | 38,1-154,5 | 45,1-155,4 |
| $\Delta P_2, \%$ | 67,53 | 51,93 | 78,4 | 63,35 | 59,8 |
| $\Delta T_2, ^\circ\text{C}$ | 302,6-373,3 | 237,0-382,9 | 347,0-385,2 | 316,2-376,9 | 310,3-363,4 |
| $T_2, ^\circ\text{C}$ | 332,4 | 268,3 | 333,9 | 330,7 | 307,1 |
| $\Delta P_3, \%$ | 6,7 | 14,2 | 9,3 | 15,7 | 11,1 |
| $\Delta T_3, ^\circ\text{C}$ | 373,3-600,0 | 382,9-600 | 385,2-600,0 | 376,9-600 | 363,4-600 |
| Описание кривой ДТА | второй пик разложения двойной | второй пик разложения двойной | второй пик разложения двойной | второй пик разложения тройной | второй пик разложения двойной |

Примечание: ΔP_1 – изменение массы образца на первой стадии, %;
 ΔT_1 – диапазон температур первой стадии, $^\circ\text{C}$;
 ΔP_2 – изменение массы образца на второй стадии (в диапазоне разложения образца), %;
 ΔT_2 – диапазон температур второй стадии, $^\circ\text{C}$;
 T_2 – температура начала разложения, определённая по кривой изменения массы, $^\circ\text{C}$;
 ΔP_3 – изменение массы образца на третьей стадии, %;
 ΔT_3 – диапазон температур третьей стадии пика разложения образца, $^\circ\text{C}$.

По уменьшению модуля Юнга образцы БЦ можно расположить в ряд: контроль > ПАО > ТЦ КС > ПШД > ТЦ АС, при этом значения первого и последнего образцов в ряду различаются в 13,4 раза (от 933,3 МПА до 69,8 МПА). По относительному удлинению образцы можно

расположить в ряд в обратной последовательности: ТЦ АС > ПШД > ТЦ КС > ПАО > контроль, при этом значения относительного удлинения при максимальной нагрузке отличаются в 5,5 раза (от 8,3 % до 1,5 %), а при пределе текучести – в 8,8 раза (от 5,3 % до 0,6 %).

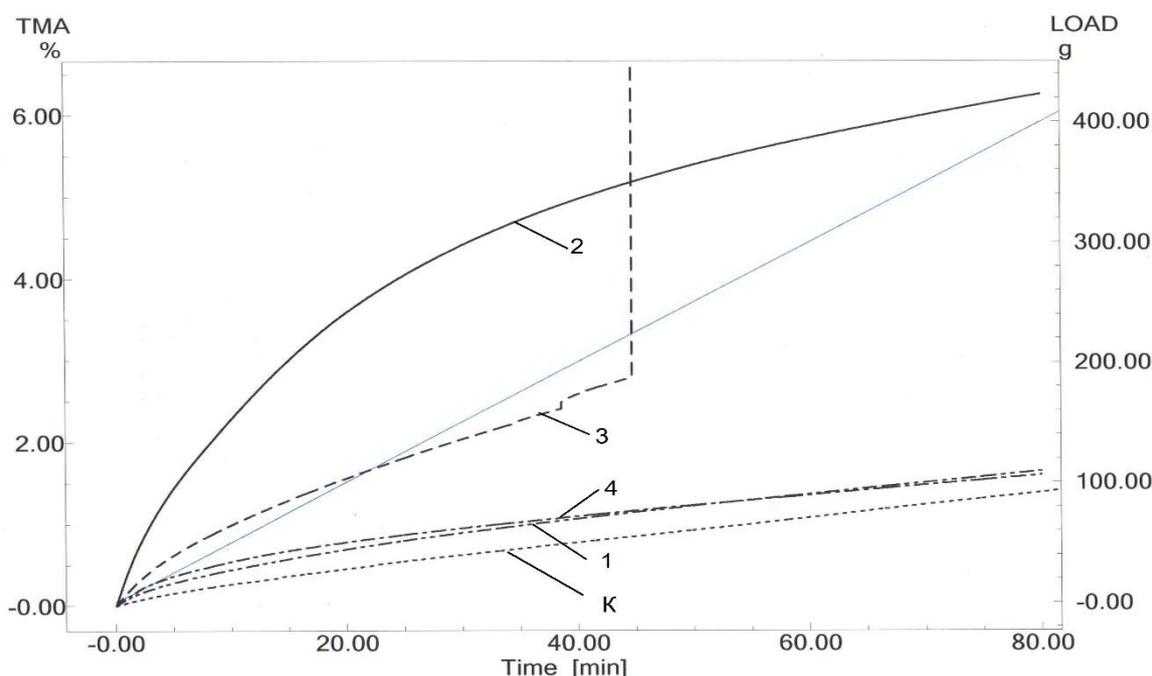


Рисунок 3 – Кривые деформации образцов БНЦ

Таблица 2 – Результаты испытаний прочности образцов БНЦ

| № образца БНЦ | 1 | 2 | 3 | 4 | Контроль |
|---|-------|------|-------|-------|----------|
| Прочность при разрыве, МПа | 56,7 | 26,2 | 10,7 | 45,3 | 33,16 |
| Условный предел текучести, МПа | 4,7 | 3,7 | 1,8 | 4,4 | 5,6 |
| Относительное удлинение при максимальной нагрузке (%) | 1,6 | 8,3 | 2,8 | 1,7 | 1,5 |
| Относительное удлинение при пределе текучести (%) | 0,7 | 5,3 | 1,2 | 0,8 | 0,6 |
| Толщина образца, мкм | 20 | 50 | 20 | 30 | 20 |
| Модуль Юнга, МПа | 671,4 | 69,8 | 150,0 | 550,0 | 933,3 |

Полученные данные свидетельствуют о различной микроструктуре, размере и компоновке волокон в полученных образцах. Образцы отличались только способом получения субстрата, предназначенного для ферментативного гидролиза, следовательно, полученные различия свидетельствуют о сложности биотехнологического процесса получения БНЦ, неоднозначности и непредсказуемости результата, поэтому критерием адекватности может быть только практика.

Отметим, что за равный период культивирования наиболее толстый образец получен на среде ферментативного гидролизата из ТЦ АС – 50 мкм, далее следует образец из ТЦ КС (30 мкм), а образцы из ПАО и ПЩД, а также контроль имеют толщину 20 мкм, то есть по толщине образцы отличаются в 2,5 раза. При этом образцы 1, 2, 4 и контроль представляют собой прозрачно-белые однородные пластины, имеющие развитую складчатую структуру, плотные на ощупь; а

образец 3 (среда ферментативного гидролизата из ПЩД) имеет неоднородную, слоистую поверхность и характеризуется высокой хрупкостью, что полностью подтверждается инструментально (на рисунке 3 видно, что для образца 3 через 45 мин нагружения наблюдается разрушение образца вследствие его хрупкости).

Полученные опытные данные хорошо согласуются с литературными: например, в работе [17] получены значения прочности и относительного удлинения образца БНЦ, полученного на синтетической питательной среде, аналогичные этим показателям для образца 1 и контроля, представленных в данной работе (при близкой толщине образцов). В работах [4, 15] БНЦ получены на синтетических средах, при этом значения модуля Юнга варьируют в диапазоне от 286 МПа до 2,7 ГПа; в работе [18] БНЦ получена на средах ферментативных гидролизатов подсолнечного шрота, что

ближе всего относится к данной работе, при этом Модуль Юнга варьирует от 970 МПа до 1,64 ГПа. Таким образом, полученные данные не противоречат мировым результатам в области исследования БНЦ и хорошо с ними согласуются.

ВЫВОДЫ

Методом термогравиметрического анализа показано, что по температуре начала пиролиза и изменению массы образцов бактериальной наноцеллюлозы в диапазоне разложения образцы можно расположить в ряд: ТЦ АС < контроль < ТЦ КС < ПАО < ПЦД, оба показателя указывают на повышение чистоты образцов в ряду по мере увеличения их численных значений.

Методом испытания образцов бактериальной наноцеллюлозы на растяжение установлено, что бактериальная наноцеллюлоза, высушенная на воздухе является материалом, не имеющим предела текучести. Показано, что механические свойства бактериальной наноцеллюлозы существенно зависят от способа получения субстрата для ферментативного гидролиза и последующего биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы на полученной питательной среде. По модулю Юнга образцы бактериальной наноцеллюлозы можно расположить в ряд: контроль > ПАО > ТЦ КС > ПЦД > ТЦ АС, при этом значения первого и последнего образцов в ряду снижаются в 13,4 раза: от 933,3 МПа до 69,8 МПа; относительное удлинение при пределе текучести в данном ряду изменяется в обратной зависимости и увеличивается в 8,8 раза: от 0,6 % до 5,3 %

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Gama, M. Bacterial nanocellulose. From Biotechnology to Bio-Economy / M. Gama, F. Dourado, S. Bielecki. – Amsterdam: Elsevier, 2016. – 240 p.
- 2 Campano, C. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review / C. Campano, A. Balea, A. Blanco, C. Negro // Cellulose. – 2016. – V. 23. – P. 57–91.
- 3 Miao, C.W. Cellulose reinforced polymer composites and nanocomposites: a critical review / C.W. Miao, W.Y. Hamad // Cellulose. – 2013. – V. 20. – P 2221–2262.

- 4 Krystynowicz, A. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose / A. Krystynowicz, W. Czaja, A. Wiktorowska-Jezi-erska, M. Gonçalve- Miśkiewicz, M. Turkiewicz, S. Bielecki // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. – 2002. – V. 29. – P. 189–195.

- 5 Yamanaka, S., Structural modification of bacterial cellulose / S. Yamanaka, M. Ishihara, J. Sugiyama // Cellulose. – 2000. – V. 7. – P. 213–225.

- 6 McKenna, B.A. Mechanical and structural properties of native and alkali-treated bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524 / B.A. McKenna, D. Mikkelsen, J.B. Wehr, M.J. Gidley, N.W. Menzies // Cellulose. – 2009. – V. 16. – P. 1047–1055.

- 7 Хапёрских, С.А. Исследование влияния модификации шпона эластомером на предел прочности при растяжении / С.А. Хапёрских, Е.А. Головина // Ползуновский вестник. – 2017. – № 1. – С. 106-110.

- 8 Коньшин, В.В. Использование древесной зелени сосны обыкновенной для изготовления плитных материалов / В.В. Коньшин, А.Н. Афаньков, Н.В. Коренева, М.В. Вододохова // Ползуновский вестник. – 2015. – № 2. – С. 92-94.

- 9 Skiba E.A. Dilute nitric-acid pretreatment of oat hulls for ethanol production / E.A. Skiba, V.V. Budaeva, O.V. Baibakova, V.N. Zolotukhin, G.V. Sakovich // Biochemical Engineering Journal. – 2017. – Т. 126. – P. 118-125.

- 10 Budaeva, V.V. Integrated flowsheet for conversion of non-woody biomass into polyfunctional materials / V.V. Budaeva, E.I. Makarova, Yu.A. Gismatulina // Key Eng. Mater. – 2016. – V. 670. – P. 202-206.

- 11 Skiba, E.A. Pilot technology of ethanol production from oat hulls for subsequent conversion to ethylene / E.A. Skiba, O.V. Baibakova, V.V. Budaeva, I.N. Pavlov, M.S. Vasilishin, E.I. Makarova, G.V. Sakovich, E.V. Ovchinnikova, S.P. Banzaraktsaeva, N.V. Vernikovskaya, V.A. Chumachenko // Chemical Engineering Journal. – 2017. – Т. 329. – P. 178-186.

- 12 Makarova, E.I. Enzyme kinetics of cellulose hydrolysis of miscanthus and oat hulls / E.I. Makarova, V.V. Budaeva, A.A. Kukhlenko, S.E. Orlov // 3 Biotech. – 2017. – 7: 317.

- 13 Gladysheva, E.K. Study of the conditions for the biosynthesis of bacterial cellulose by the producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 / E.K. Gladysheva, E.A. Skiba, V.N. Zolotukhin, G.V. Sakovich // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2018. – Т. 54. – № 2. – P. 179-187.

ТЕРМОГРАВИМЕТРИЧЕСКИЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБА
ПОЛУЧЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД – ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ
ИЗ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

14 ГОСТ 14236-81 (СТ СЭВ 1490-79).
Пленки полимерные. Метод испытания на растяжение. Введ. 01.07.81. – М.: Изд-во стандартов, 1989. – 8 с.

15 Cheng, K.-C. Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis / K.-C. Cheng, J.M. Catchmark, A. Demirci // Journal of Biological Engineering. – 2009. – 3:12.

16 Um, I.C. Wet spinning of silk polymer II. Effect of drawing on the structure characteristics and properties of filament / I.C. Um, C.S. Ki, H.Y. Kweon, K.G. Lee, D.W. Ihm, Y.H. Park // Int. J. Biol Macromol. – 2004. – № 34. – P. 107-119.

17 Громовых, Т.И. Перспективы направленного использования бактериальной целлюлозы в медицине / Т.И. Громовых, С.В. Луценко, Т.Н. Данильчук, Н.Б. Фельдман, Фан Ми Хань // Интер-Медикал. – 2015. – № 7 (13). – С. 4-9.

18 Tsouko, E. Bacterial cellulose production from industrial waste and byproduct streams / E. Tsouko, C. Kourmentza, D. Ladakis, N. Kopsahelis, I. Mandala, S.123 Papanikolaou, F. Paloukis, V. Alves, A. Koutinas // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Vol. 16, № 7. – P. 14832-14849.

Бычин Николай Валерьевич, научный сотрудник лаборатории физико-химических основ создания энергетических конденсированных систем, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), ees08988@mail.ru, тел. (3854) 30-59-85.

Голубев Дмитрий Сергеевич, инженер лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), reklatekoy@gmail.com, тел. (3854) 30-59-85.

Скиба Екатерина Анатольевна, кандидат технических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), ees08988@mail.ru, тел. (3854) 30-59-85.