

ИДЕАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ЕЕ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ

П.А. Горбатова^{1,2}, Н.А. Шавыркина^{1,2}

¹Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), г. Бийск

²Бийский технологический институт (филиал) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», Бийск

Целью проведенного исследования являлось изучение химической функционализации бактериальной наноцеллюлозы с получением нитратов бактериальной наноцеллюлозы. Два образца бактериальной наноцеллюлозы БНЦ-1 и БНЦ-2 со степенью полимеризации 3950 и 5750 соответственно были получены с использованием в качестве продуцента симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 на синтетической глюкозной среде. Нитрование проводилось промышленной серно-азотной кислотной смесью с последующей стабилизацией синтезированных нитратов целлюлозы. Полученные нитраты бактериальной наноцеллюлозы НБНЦ-1 и НБНЦ-2 характеризовались массовой долей азота 10,84 и 11,56 %, вязкостью ацетонового раствора 255 и 744 мПа*с, растворимостью в спиртоэфирной смеси 16,5 и 62,2 %, соответственно. Установлена зависимость показателей нитратов бактериальной наноцеллюлозы от степени полимеризации целлюлозы: чем выше степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы, тем ниже массовая доля азота и выше вязкость полученных нитратов бактериальной наноцеллюлозы. В ИК-спектрах нитратов бактериальной наноцеллюлозы зарегистрированы основные функциональные группы, подтверждающие, что синтезированные продукты являются низкозамещенными азотнокислыми эфирами целлюлозы: 1637 и 1657 см⁻¹, 1274 и 1281 см⁻¹, 825 и 836 см⁻¹, 747 и 749 см⁻¹, 681 и 691 см⁻¹. Методом РЭМ установлено, что сетчатая структура бактериальной наноцеллюлозы сохраняется и в ее нитратах. Установлено, что синтезированные нитраты бактериальной наноцеллюлозы являются наноструктурированными и высоковязкими нитратами целлюлозы, что объясняется свойствами исходной бактериальной наноцеллюлозы и является отличительными свойствами от нитратов целлюлозы растительного происхождения.

Ключевые слова: бактериальная наноцеллюлоза, *Medusomyces gisevii*, нитрование, серно-азотная смесь, нитраты бактериальной наноцеллюлозы

Введение. Актуальность темы работы обусловлена возрастающим интересом к бактериальной наноцеллюлозе (БНЦ) в качестве прекурсора нитратов целлюлозы (НЦ) в связи с фундаментальным характером и высокой практической значимостью результатов исследований. БНЦ представляет собой нанополимер с уникальными физико-механическими свойствами, который имеет перспективы в производстве передовых функциональных материалов для различных применений [1]. БНЦ синтезируется несколькими штаммами бактерий и состоит из целлюлозной нановолоконной сети, которая определяет ряд свойств БНЦ отличных от целлюлозы растительного происхождения [2]. БНЦ характеризуется химической чистотой, высокой механической прочностью, высокой степенью полимеризации (от 1000 до 14000), эластичностью, высокопористостью, наноразмерной толщиной микрофибрилл, способностью к биологическому разложению и превосходной биосовместимостью [3]. БНЦ имеет широкий диапазон значений степени полимеризации, которые зависят от условий биосинтеза БНЦ, что позволяет, регулируя условия биосинтеза, получать БНЦ с заданной степенью полимеризации [4].

Нативная БНЦ обычно модифицируется для улучшения свойств и функциональности: одним из примеров химической функционализации БНЦ является ее нитрование. Нитрование БНЦ позволяет получить НЦ со свойствами отличными от НЦ растительного происхождения, благодаря уникальным свойствам БНЦ. Нитраты БНЦ (НБНЦ) могут применяться в качестве энергетического ингредиента [5, 6], основы для создания биосенсоров [7], пластификатора [8], нитроцеллюлозных мембран для вестерн-блоттинга, иммуноферментного анализа [9]. Проведенные в ряде стран исследования показали возможность использования БНЦ для синтеза НБНЦ с удовлетворительными функциональными свойствами [5-7, 10].

Целью данного исследования является анализ основных физико-химических показателей НБНЦ, полученных при нитровании исходной БНЦ, полученной с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 в качестве продуцента на глюкозной среде в оптимальных условиях, промышленной серно-азотной кислотной смесью.

Материалы и методы. Два образца БНЦ-1 и БНЦ-2 со степенью полимеризации 3950 и 5750 были получены с использованием в качестве продуцента симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 на синтетической глюкозной среде в оптимальных условиях [11]. Образцы БНЦ перед нитрованием были высушены лиофильным методом до влажности не более 5 % и измельчены до мелких хлопьев размером 1-3 мм. Оба образца не содержат лигнин, гемицеллюлозы и другие нецеллюлозные компоненты.

Образцы НБНЦ-1 и НБНЦ-2 были получены при нитровании БНЦ-1 и БНЦ-2 серно-азотной кислотной смесью с массовой долей (м.д.) воды 14 %, при температуре 25-30 °С в течение 40 мин при этом модуль нитрования составлял 1:160. Промытые до нейтральной реакции по лакмусовой пробе образцы НБНЦ стабилизировали в одинаковых условиях при непрерывном перемешивании [12]. Для последующего анализа НБНЦ-1 и НБНЦ-2 были высушены при температуре (100 ± 5) °С в течение 1 ч. Экспериментальные результаты получены в трех повторностях, статистически обработаны с применением стандартных методов с помощью программ Microsoft Office Excel 2019, Statistica 6.0 и MathCad 14.0 и являются достоверными.

М.д. азота, растворимость в спиртоэфирной смеси и вязкость ацетонового раствора НБНЦ определены в соответствии с принятыми методами [12-14].

Работа выполнена с использованием приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск, Россия).

Обсуждение результатов. Обзор литературы по нитрованию БНЦ показал, что полная характеристика НЦ, синтезированных из БНЦ, отсутствует, а особенности нитрования БНЦ – в процессе дискуссии. Это вполне естественно, поскольку БНЦ с влажностью 98-99 % для нитрования необходимо предварительно высушить. Кроме того, функционализация БНЦ приемлема при стабильности ее производства в необходимых объемах [13].

Степень полимеризации целлюлозы указывает на количество идентичных основных звеньев в макромолекуле целлюлозы [15]. Вследствие различий в степенях полимеризации целлюлозы и условий нитрования содержание азота и распределение нитратных групп в макромолекулах НЦ, полученных в одинаковых условиях нитрования, различаются [16].

Согласно данным, представленным в таблице 1, синтезированные образцы НБНЦ-1 и НБНЦ-2, полученные в одинаковых условиях нитрования, характеризуются м.д. азота 11,56 и 10,84 %, вязкостью ацетонового раствора 255 и 744 мПа*с, растворимостью в спиртоэфирной смеси 16,5 и 62,0 %, соответственно. Кроме того, оба образца растворимы в ацетоне на 100 %.

Таблица 1

Основные физико-химические показатели НБНЦ

Наименование показателя	НБНЦ-1	НБНЦ-2
М.д. азота, %	11,56	10,84
Вязкость, мПа*с	255,0	744,0
Растворимость в спиртоэфирной смеси, %	16,50	62,20

Показатели НЦ зависят от многих факторов и, прежде всего, от состава нитрующей кислотной смеси и свойств целлюлозы. Исходя из результатов определения физико-химических

показателей НБНЦ-1 и НБНЦ-2, следует, что степень полимеризации исходной БНЦ влияет на м.д. азота и вязкость синтезированных НБНЦ, причем чем выше степень полимеризации, тем ниже м.д. азота и выше вязкость НБНЦ. Растворимость образцов НБНЦ-1 и НБНЦ-2 в спиртоэфирной смеси низкая из-за высокой вязкости образцов. Растворимость НЦ в спиртоэфирной смеси зависит от содержания азота, но эта зависимость имеет сложный характер. Изменение растворимости НБНЦ в спиртоэфирной смеси обусловлено тем, что при м.д. азота 10,60-11,50 % растворимость находится в области резких изменений [15].

Для НБНЦ-1 и НБНЦ-2 характерны высокие показатели вязкости, что объясняется высокой степенью полимеризации исходной БНЦ, следовательно, используя БНЦ в качестве источника целлюлозы можно синтезировать высоковязкие НЦ, которые могут быть востребованы в наукоемких областях. Поскольку БНЦ имеет широкий диапазон значений степени полимеризации, которая зависит от условий биосинтеза БНЦ [17], возможно получение НБНЦ с заданными свойствами, исходя из степени полимеризации исходной БНЦ.

Сравнение полученных результатов с НЦ из мискантуса [12, 14], полученных в аналогичных условиях (за исключением модуля нитрования) подтверждает отличие в высокой вязкости НБНЦ: вязкость НЦ из мискантуса 48, 99-129 мПа*с. В ИК-спектрах синтезированных НБНЦ-1 и НБНЦ-2 зарегистрированы основные функциональные группы, свидетельствующие о получении низкозамещенных азотнокислых эфиров целлюлозы (1637 и 1657 см⁻¹, 1274 и 1281, 825 и 836, 747 и 749, 681 и 691). Идентичные функциональные группы наблюдаются в ИК-Фурье спектрах НЦ из других альтернативных источников сырья [5].

Таблица 2

Отнесение полос поглощения в ИК-спектрах НБНЦ

Отнесение к химическим группам	НБНЦ-1	НБНЦ-2
Валентные колебания $\nu(\text{OH})(\text{OH}\dots\text{OH})$	3531	3594
Валентные колебания $\nu(\text{CH}_2)$	2917	2919
Валентные колебания $\nu_a(\text{NO}_2)$	1657	1637
Деформационные колебания $\sigma(\text{CON})$	1455	1426
Деформационные колебания $\sigma(\text{CH})$	1377	1376
Симметричные валентности $\nu_s(\text{NO}_2)$	1281	1274
Валентные колебания $\nu(\text{C}-\text{O})$	1162	1160
Валентные колебания $\nu(\text{C}-\text{O})$	1071	1064
Деформационные колебания $\sigma(\text{CH})$	1004	1021
Валентное колебание $\nu(\text{NO}_2)$	836	825
Всерное колебание $\gamma_w(\text{NO}_2)$	749	747
Ножничное колебание $\delta(\text{NO}_2)$	691	681

На рис. 1 представлены результаты РЭМ для исходной БНЦ и НБНЦ, полученных при нитровании БНЦ с различной степенью полимеризации.

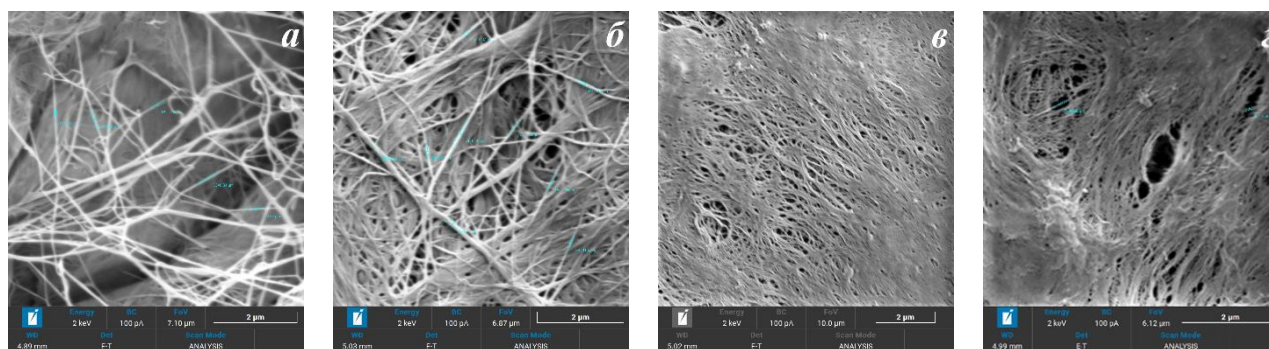


Рис. 1 – Микрофотографии РЭМ:
а) БНЦ-1; б) БНЦ-2; в) НБНЦ-1; г) НБНЦ-2

Согласно рис. 1, а-б, для БНЦ характерна сетчатая структура с большим количеством пор, образованная наноразмерными фибриллами, которые образуют сетчатую структуру с большим количеством пор. Структура НБНЦ (рис. 1, в-г) за счет увеличения объемов фибрилл под действием смеси азотной и серной кислот становится более плотной при этом наноразмерность фибрилл в поперечном сечении сохраняется. Таким образом, нитрование БНЦ позволяет получить наноструктурированные НЦ.

Выводы. В ходе проведенного исследования образцы НБНЦ-1 и НБНЦ-2 были получены нитрованием образцов БНЦ-1 и БНЦ-2 со степенью полимеризации 3950 и 5750 соответственно с использованием серно-азотной кислотной смеси. Исходная БНЦ-1 и БНЦ-2 была получена с использованием в качестве симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 на синтетической глюкозной среде в оптимальных условиях.

Определены основные физико-химические показатели образцов НБНЦ-1 и НБНЦ-2: м.д. азота 10,84 и 11,56 %, вязкость ацетонового раствора 255 и 744 мПа*с, растворимость в спиртоэфирной смеси 16,5 и 62,0 %, соответственно. Установлена зависимость показателей НБНЦ от степени полимеризации БНЦ: чем выше степень полимеризации исходной БНЦ, тем ниже м.д. азота и выше вязкость НБНЦ. Методом ИК-спектроскопии установлено соответствие НБНЦ по основным функциональным нитратным группам (1637 и 1657 см⁻¹, 1274 и 1281 см⁻¹, 825 и 836 см⁻¹, 747 и 749 см⁻¹, 681 и 691 см⁻¹) низкозамещенным азотнокислым эфирам целлюлозы. Методом РЭМ выявлено, что нитрование БНЦ позволяет получить наноструктурированные НЦ.

Результаты существенно отличаются от результатов, полученных при нитровании целлюлозы растительного происхождения. Сравнение полученных результатов с НЦ из мискантуса [12, 14], полученных в аналогичных условиях (за исключением модуля нитрования) подтверждает отличие в высокой вязкости НБНЦ: вязкость НЦ из мискантуса 48, 99-129 мПа*с.

Существенная разница между характеристиками НЦ на основе БНЦ и НЦ на основе растительной целлюлозы обусловлена уникальной трехмерной сетчатой структурой и высокой степенью полимеризации БНЦ. Таким образом, БНЦ позволяет получить наноструктурированные НЦ с высокой вязкостью, что объясняется свойствами исходной БНЦ.

Широкому внедрению БНЦ препятствует ее высокая себестоимость. Среди последних тенденций – концепция производства БНЦ с использованием растительного сырья для получения питательных сред. В качестве претендента для ферментативного гидролиза активно рассматривается мискантус [17,18].

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>.

Библиографический список

1. Горбатова П.А., Гисматулина Ю.А., Корчагина А.А. и др. Зависимость массовой доли азота в нитратах бактериальной наноцеллюлозы от содержания воды в нитрующей смеси. Южно-Сибирский научный вестник. 2023. № 5 (51). С. 75-81.
2. Stumpf T.R., Yang X., Zhang J., et al. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. Materials Science and Engineering: C. 2018. Vol. 82. P. 372-383.
3. Skiba E. A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., et al. Yield and quality of bacterial cellulose from agricultural waste. Cellulose. 2022. Vol. 29. № 3. P. 1543-1555.
4. Skiba E.A., Baibakova O.V., Gladysheva E.K., et al. Study of the influence of *Medusomyces gisevii* Sa-12 inoculum dosage on bacterial cellulose yield and degree of polymerization. Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2019. Vol. 9. № 3 (30). P. 420-429.
5. Jamal S.H., Roslan N.J., Shah N.A.A., et al. Conversion of bacterial cellulose to cellulose nitrate with high nitrogen content as propellant ingredient. Solid State Phenomena. 2021. Vol. 317. P. 305-311.
6. Roslan N.J., Jamal S.H., Ong K.K., et al. Preliminary study on the effect of sulphuric acid to nitric acid mixture composition, temperature and time on nitrocellulose synthesis based Nata de Coco. Solid State Phenomena. 2021. Vol. 317. P. 312-319.

7. Huang J. Zhao M., Hao Y., et al. Recent Advances in Functional Bacterial Cellulose for Wearable Physical Sensing Applications. *Advanced Materials Technologies*. 2021. Vol. 7. P. 1-14.
8. Wang Y., Jiang L., Dong J., et al. Three-dimensional network structure nitramine gun propellant with nitrated bacterial cellulose. *Journal of Materials Research and Technology*. 2020. Vol. 9. № 6. P. 15094-15101.
9. Chen J.L., Njoku D.I., Tang C., et al. Advances in Microfluidic Paper Based Analytical Devices (μ PADs): Design, Fabrication, and Applications. *Small Methods*. 2024. P. 2400155.
10. Горбатова П.А., Корчагина А.А., Гисматулина Ю.А. и др. Свойства нитратов целлюлозы, полученных нитрованием бактериальной целлюлозы с использованием смеси азотной и серной кислот. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2024. Т. 14. № 2. С. 236–244.
11. Shavyrkina N.A., Skiba E.A., Kazantseva A.E., et al. Static culture combined with aeration in biosynthesis of bacterial cellulose. *Polymers*. 2021. Vol. 13. № 23. P. 4241.
12. Корчагина А.А. Синтез нитратов целлюлозы из целлюлозы мискантуса гигантского сорта Камис, полученной в условиях опытно-промышленного производства. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2023. Т. 13. № 3 (46). С. 392-401.
13. Budaeva V.V., Gismatulina Y.A., Mironova G.F., et al. Bacterial nanocellulose nitrates. *Nanomaterials*. 2019. Vol. 9. № 12. P. 1694.
14. Корчагина А. А., Горбатова П. А., Будаева В. В., Золотухин В. Н. Нитрование целлюлозы с высокой степенью полимеризации из мискантуса сорта Сорановский. *Журн. Сиб. федер. ун-та. Химия*, 2024, 17(2). С. 268–278.
15. Liu J. Nitrate esters chemistry and technology. Singapore: Springer, 2019. 684 p.
16. Mattar H., Baz Z., Saleh A., et al. Nitrocellulose: Structure, synthesis, characterization, and applications. *Water Energy Food Environ*. 2020. Vol. 3. P. 1-15.
17. Skiba, E.A., Shavyrkina, N.A., Skiba, M.A, et al. Biosynthesis of Bacterial Nanocellulose from Low-Cost Cellulosic Feedstocks: Effect of Microbial Producer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24. № 18. P. 14401.
18. Kashcheyeva E.I., Korchagina A.A., Gismatulina Y.A., et al. Simultaneous Production of Cellulose Nitrates and Bacterial Cellulose from Lignocellulose of Energy Crop. *Polymers*. 2024. Vol. 16. P. 42.