

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Щанкин Михаил Владимирович

**ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АЭРОГЕЛЕЙ ИЗ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ПУТЕМ БИОСИНТЕЗА
ШТАММОМ *KOMAGATAEIBACTER SUCROFERMENTANS* B-11267**

03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена на кафедре биотехнологии и биохимии факультета биотехнологии и биологии Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева.

Научный руководитель: *Ревин Виктор Васильевич* – доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: *Синицын Аркадий Пантелеймонович*
доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии, заведующий лабораторией физико-химии ферментативной трансформации полимеров

Садыкова Вера Сергеевна
доктор биологических наук, доцент, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе», заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией таксономического исследования и коллекции культур микроорганизмов

Гладышева Евгения Константиновна
кандидат технических наук, ФГБУН «Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН», лаборатория биоконверсии, научный сотрудник

Защита диссертации состоится «09» ноября 2021 г. в 17:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.13 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, биологический факультет МГУ, ауд. М -1.

E-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/393747176/>

Автореферат разослан «04» октября 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.03.13, к.б.н

Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

В настоящее время интенсивно проводятся исследования по получению новых материалов, обладающих широким спектром действия. Одним из таких перспективных материалов является бактериальная целлюлоза. Уже сейчас ее используют в самых различных областях: от хирургии и кулинарии до разнообразных высокотехнических индустрий, для производства новых материалов и нанокompозитов. [Кривомаз, 2015]

Бактериальная целлюлоза (БЦ) характеризуется химической чистотой, в ней отсутствуют примеси лигнина, гемицеллюлоз и других компонентов, сопутствующих растительной целлюлозе. [Гладышева, 2015]. Она значительно превосходит свой аналог растительного происхождения благодаря высокой чистоте, наноструктуре, высокой степени полимеризации и кристалличности [Ревин, 2014].

На основе БЦ можно получать вещества и композиционные материалы нового поколения, такие как НКЦ- нанокристаллическую целлюлозу, различные нанокompозиционные материалы и аэрогели [Байклз, 1974; Бушманова, 2017].

Аэрогель - это легкий высокопористый материал, обладающий рядом исключительных и даже уникальных свойств, которые позволяют его использовать в различных областях науки и техники, включая оптоэлектронику, в процессах адсорбции, в производстве медицинских материалов, аэрокосмической отрасли, и во многих других областях [Воскобойников, 2010; Бушманова, 2017; Вершинин, 2017].

Целлюлозные аэрогели - это экологичный, чистый, биосовместимый и биоразлагаемый материал, вместе с тем обладающий и другими превосходными свойствами, такими как низкая плотность, высокая пористость и значительная удельная площадь поверхности [Вялышев, 2006; Гаврилова, 2015].

К настоящему времени разработаны технологии и производства неорганических аэрогелей на основе различных соединений. Эти аэрогели отличаются высокой стоимостью, что и является главным сдерживающим фактором их практического применения [Гладышева, 2015; Иванов, 2013]. Производство аэрогелей из органических полимеров могло бы снизить стоимость этого материала. Получение аэрогелей из бактериальной целлюлозы требует решения ряда задач, а именно получить аэрогели с уникальными физико-механическими свойствами и в том числе с высокими прочностными характеристиками. Это может быть решено при помощи разных подходов.

Степень разработанности. Существующие на данный момент аэрогели на основе целлюлозы и иных материалов-предшественников обладают высокой стоимостью исходных компонентов. Кроме того, механические свойства аэрогелей кремнезема неудовлетворительные [Katti, 2006], а предшественники аэрогелей на основе синтетических полимеров токсичны и не поддаются разложению. Все эти факторы в сочетании с высокой стоимостью их изготовления значительно ограничили применение аэрогелей. В России данное направление развивается на кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии МГУ им. Н. П. Огарева.

Цель работы: отработка оптимальных условий культивирования продуцента бактериальной целлюлозы, исследование ее структуры и получение на ее основе аэрогелей с широким спектром физико-механических свойств.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи исследования:

1. Оработка условий культивирования продуцентов бактериальной целлюлозы.
2. Получение и исследование свойств и структуры бактериальной целлюлозы.
3. Получение аэрогелей из бактериальной целлюлозы и исследование их физико-механических свойств.
4. Исследование условий получения аэрогелей заданной микропористой структуры.
5. Исследование теплоизоляционных, термоустойчивых и шумопоглощающих свойств аэрогелей из БЦ.

Научная новизна работы. Впервые получены аэрогели на основе бактериальной целлюлозы, обладающие уникальными физико-механическими свойствами. Установлено, что полученные аэрогели превосходят по своим теплоизолирующим характеристикам все известные материалы. Использование отходов биотехнологических производств для биосинтеза не только снижает стоимость получения бактериальной целлюлозы, но и влияет на индекс кристалличности полисахарида. Оработаны условия получения бактериальной целлюлозы в лабораторных и полупромышленных условиях. В результате проведенных исследований показано, что физико-механические свойства полученных материалов зависят от плотности аэрогелей. Термоустойчивость БЦ сохраняется до 280°C.

Теоретическая и практическая значимость работы. Впервые показано, что структура аэрогелей зависит не только от условий их получения, но и от режимов культивирования, а также от питательных веществ, при которых осуществляли биосинтез БЦ. С помощью ИК –спектроскопии и методов ЯМР ¹³C-спектров и рентгеноструктурного анализа установили структуру бактериальной целлюлозы и рассчитали ее индекс кристалличности.

В плане практического применения аэрогелей из бактериальной целлюлозы открывают широкие возможности для их использования в авиастроении, автомобилестроении, в строительной и текстильной отраслях промышленности в качестве уникальных теплоизолирующих и шумопоглощающих материалов.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены для обсуждения на Огаревских чтениях в Мордовском государственном университете им. Н.П. Огарева (Саранск, 2014-2016); на научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева (Саранск, 2015); Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2016); Молодежном образовательном форуме приволжского федерального округа «iВолга-2015» (Самарская область, 2015), конкурсе УМНИК (Саранск, 2015), Всероссийском нанотехнологическом инженерном конкурсе для студентов и аспирантов (Москва, 2015), VIII конгрессе молодых ученых (Санкт-Петербург, 2019).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 научных работ: из них 4 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.

Ломоносова, 1 патент, 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК, 9 публикаций в сборниках трудов научных конференций и других периодических изданиях, 2 ноу-хау.

Личный вклад автора состоит в поиске и анализе литературных источников по теме работы, участие в планировании и постановке конкретных задач диссертации на всех этапах её выполнения, осуществлении экспериментальной части исследования, в обсуждении результатов, подготовке публикаций и докладов.

Степень достоверности полученных данных подтверждается использованием современных общепринятых экспериментальных методик, актуальными методами анализа, а также сопоставлением полученных данных с результатами других исследований.

Положения, выносимые на защиту.

1. Установлено, что условия культивирования продуцента влияют на уровень биосинтеза и микропористую структуру аэрогелей из бактериальной целлюлозы.

2. Изучены физико-химические свойства и структура бактериальной целлюлозы.

3. Оработаны условия предварительной обработки гидрогеля бактериальной целлюлозы, влияющие на прочностные свойства аэрогелей из бактериальной целлюлозы.

4. Получены и исследованы свойства аэрогелей, обладающих сверхнизкой теплопроводностью и высокими шумопоглощающими характеристиками.

Объём и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 106 страницах. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы. Диссертационная работа включает 53 рисунка и 7 таблицы. Список цитируемой литературы включает 130 источник, в том числе 104 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение. Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая ценность полученных результатов.

Обзор литературы В главе представлена характеристика продуцента бактериальной целлюлозы, а также описан процесс ее получения. Представлено описание химического строения и структура целлюлозы. Рассмотрены виды аэрогелей, их свойства и области их применения. Изучены способы получения аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования – бактериальная целлюлоза, полученная при культивировании бактерии *Komagataeibacter sucrofermentans* B-11267 в статических и динамических условиях культивирования и аэрогель на основе бактериальной целлюлозы.

Культивирование *Komagataeibacter sucrofermentans* B-11267. Культивирование бактерии осуществляли при температуре 28 °С в течение 3 суток на скошенной агаризованной среде следующего состава, г/л: глюкоза - 10,0; дрожжевой экстракт - 10,0; пептон - 7,0; агар - 15,0; лимонная кислота - 0,2; уксусная кислота - 0,1; этанол - 10,0. pH 5,0 – 6,0. Режим стерилизации: 121 °С в течение 15 минут без этанола в автоклаве MLS-3781L (Sanyo, Япония).

Для получения инокулята использовали среду Хестрин - Шрамма следующего состава, г/л: глюкоза – 20,0; пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 5,0; гидрофосфат натрия – 2,7; лимонная кислота – 1,15 в колбах объемом 250 мл, содержащих 100 мл среды, на шейкере – инкубаторе ES –20/60 (Biosan, Латвия) при 250 об/мин в течение 24 часов при температуре 28±1°С. Полученным инокулятом, в количестве 10 % от объема среды, засеивали опытные колбы, содержащие 100 мл среды. Культивирование осуществляли в шейкере – инкубаторе при 250 об/мин при температуре 28±1°С в течение 3-6 суток.

Получение бактериальной целлюлозы производили на жидкой среде с мелассой (концентрация мелассы в среде - 50 г/л), pH среды доводили до 4,50.

Методы анализа. Получение бактериальной целлюлозы в статических и динамических условиях. Выделение бактериальной целлюлозы и ее очистка от остатков компонентов питательной среды в 0,1 н р-ре NaOH и 1 н H₂SO₄ с последующей промывкой в дистиллированной воде при 80°С в течении 30 минут. Получение аэрогелей производили путем замораживания предварительно гомогенизированного гидрогеля бактериальной целлюлозы при помощи низкотемпературного холодильника MLR-351H (SANYO Япония) и дальнейшего высушивания на лиофильной сушке FreeZone Plus (Labconco, США) в течении 3 суток. Плотность аэрогелей определяли измерением массы и плотности образца. Прочность полученных аэрогелей определяли при помощи ротационного модульного реометра HAAKE MARS III. Звукопоглощение аэрогелей было измерено при помощи импедансной трубы фирмы Spectronics. ЯМР исследование проводилось с использованием спектрометра JEOL JNM-ECX400. TGA- исследование аэрогелей изучалось с помощью аппарата TGA/SDTA 851e фирмы Mettler Toledo. Коэффициент теплопроводности определяли при помощи цифрового измерителя теплового потока ИПП-2. Степень кристалличности определяли методом рентгеноструктурного анализа на рентгеновском дифрактометре EMPYREAN (PANalytical, Netherlands) с детектором PJXcel3D на отражение в фильтрованном излучении медного анода. Анализ ИК-спектров проводили при помощи ИК-Фурье спектрометра IRPrestige-21 (Shimadzu, Japan).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и анализ бактериальной целлюлозы

В настоящее время, большой вклад в стоимость готовой продукции занимает стоимость исходных материалов. Традиционно для культивирования бактерий-продуцентов бактериальной целлюлозы используется стандартная среда Хестрин-Шрамма. Для снижения стоимости производства бактериальной целлюлозы, нами был исследован уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы на отходах биотехнологических производств – послеспиртовой барде и мелассе. Используемый нами штамм-продуцент бактериальной целлюлозы адаптирован для роста на данных отходах, богатых сахарами.

Послеспиртовая барда и меласса имеют в своем составе большое количество различных сахаров, которые используются бактериями в качестве источника углерода.

Культивирование проводилось в статических и динамических условиях на жидкой среде с мелассой с концентрацией 50 г/л в течение 5 суток.

В статических условиях культивирование продуцента бактериальной целлюлозы велось в стерильных емкостях без перемешивания в термостате. В таком случае получаемая гель-пленка БЦ принимает форму того сосуда, в котором она была выращена. В динамических условиях, культивирование проводилось в качалочных колбах Эрленмейера на шейкере-инкубаторе. При этом бактериальная целлюлоза образуется в форме хлопьев,

На рис. 1 представлены фотографии бактериальной целлюлозы, полученной в статических (А) и динамических (Б) условиях.



Рисунок 1 – Гель-пленка бактериальной целлюлозы, полученная в статических (А) и хлопья бактериальной целлюлозы, полученная в динамических (Б) условиях культивирования

Согласно полученным результатам, наибольший уровень биосинтеза БЦ наблюдается при культивировании продуцента в статических условиях культивирования: так при культивировании в статических условиях культивирования максимальное количество БЦ образовалось на 5 сутки культивирования на среде с мелассой: $3,33 \pm 0,09$ г/л, а в динамических условиях культивирования – при использовании питательной среды с бардой также на 5 сутки культивирования: $1,81 \pm 0,04$ г/л.

Таблица 1 – Уровень биосинтеза БЦ, полученной при статических условиях культивирования на разные сутки культивирования, г/л

	3 сутки	5 сутки	7 сутки
	M±m	M±m	M±m
Среда Хестрин-Шрамма	1,73±0,01	2,57±0,11	2,98±0,04
Меласса	1,89±0,08	3,33±0,09	3,95±0,01
Барда	1,62±0,07	2,42±0,15	2,89±0,04

где: M – среднее арифметическое; m - ошибка репрезентативности

Таблица 2 – Уровень биосинтеза БЦ, полученной при динамических условиях культивирования на разные сутки культивирования, г/л

	3 сутки	5 сутки	7 сутки
	M±m	M±m	M±m
Среда Хестрин-Шрамма	0,54±0,02	0,68±0,10	0,41±0,01
Меласса	1,07±0,09	1,01±0,06	1,11±0,01
Барда	1,71±0,01	1,81±0,04	1,78±0,02

где: M – среднее арифметическое; m - ошибка репрезентативности

Таким образом, для получения максимального количества бактериальной целлюлозы рекомендуется проводить культивирование продуцента на среде с мелассой при статических условиях культивирования. Также это позволит существенно снизить стоимость конечного продукта за счет использования дешевого сырья (меласса).

Анализ бактериальной целлюлозы, полученной в статических и динамических условиях культивирования при помощи ИК спектроскопии и рентгеноструктурного анализа

Для идентификации полученного вещества проводили анализ его структуры методом ^{13}C ЯМР спектроскопии. В спектре бактериальной целлюлозы (рис. 2) прослеживаются четыре характерных спектральных областей: I_1 , I_2 , I_3 и I_4 .

Согласно работе [Mori, T. 2012] область I_1 содержит сигналы ацетальных углеродных атомов C-1. Область I_2 содержит сигналы атомов углерода C-4 (двойной пик соответствует кристаллической (89,4 м.д., ~85%) и аморфной форме (84,47 м.д., ~15%) бактериальной целлюлозы [Ek, Wormald, Ostelius, Iversen & Nystrom, 1995]. Область I_3 содержит сигналы атомов C-2, C-3, C-5 пиранозного цикла, тогда как область I_4 содержит сигналы атома C-6.

Кроме того, с целью определения степени кристалличности полученной бактериальной целлюлозы производили ее анализ методом рентгеноструктурного анализа.

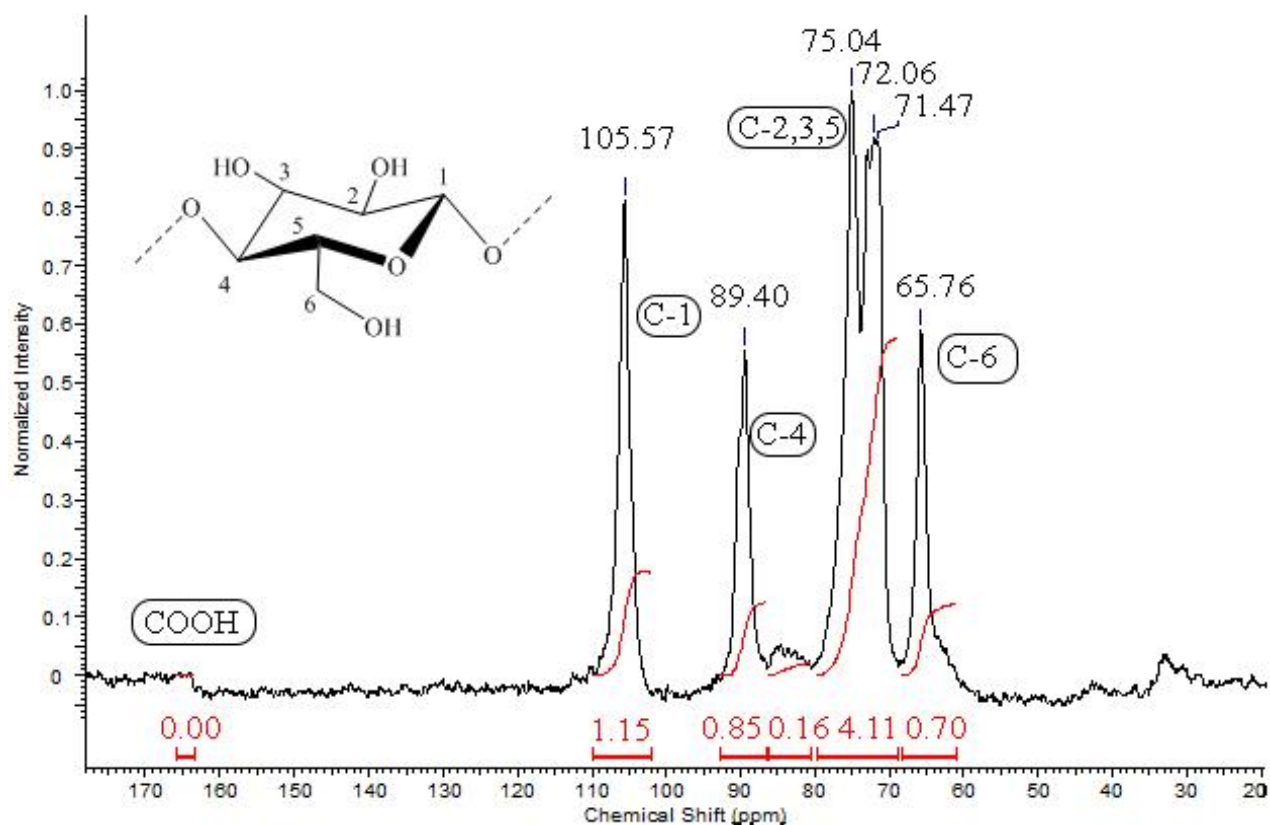


Рисунок 2 - Спектр ЯМР ^{13}C в твердом теле бактериальной целлюлозы

Рентгеноструктурный анализ был выполнен в двух режимах, а именно на пропускание и на отражение на рентгеновском дифрактометре «Empyrean PANalytical» в фильтрованном излучении медного анода. ($\lambda=0.15418$ nm, 40 kV b 3 mA). Установлено соответствие взаимного положения и относительной интенсивности максимумов экспериментальных рентгенограмм и рентгенограмм, полученных авторами [Mori, T. 2012] для целлюлозы типа I_β (ICDD 00-060-1502). Часть максимумов экспериментальных рентгенограмм, полученных в установке «на просвет» может быть проидентифицирована, как отражения целлюлозы I_α [2] (ICDD 00-056-1719).

Рентгеноструктурный анализ позволяет определить степень кристалличности бактериальной целлюлозы и размер кристаллитов (таблица 3).

Таблица 3 - Степень кристалличности бактериальной целлюлозы, полученной в статических и динамических условиях культивирования

Условия культивирования при получении бактериальной целлюлозы	Степень кристалличности, %	Размер кристаллитов, нм.
Статические	86.6	5.7

Согласно результатам исследования полученного материала методом ядерно-магнитного резонанса, полученный образец является целлюлозой. Степень кристалличности бактериальной целлюлозы, полученной в статических условиях культивирования, составляет 86,6 %. Размер кристаллических участков достигает 5,7 нм.

Важно охарактеризовать структуру и свойства бактериальной целлюлозы. На рис. 3 представлен ИК-спектр бактериальной целлюлозы, полученной в статических и динамических условиях.

ИК анализ бактериальной целлюлозы, полученной в статических и динамических условиях культивирования, не выявил каких-либо отличий в спектрах поглощения в зависимости от условий получения биополимера.



Рисунок 3 - ИК-спектры образцов БЦ, полученных в статических (А) и динамических (Б) условиях

Пик в области 3352 см^{-1} обусловлен валентными колебаниями ОН групп, участвующих в образовании водородных связей. Пик в области $2900\text{ (}2950\text{)}\text{ см}^{-1}$ обусловлен валентными колебаниями СН группы. Пик в области $1620\text{ (}1650\text{)}\text{ см}^{-1}$ обусловлен деформационными колебаниями ОН групп адсорбированной воды. Пик в области 1380 см^{-1} обусловлен деформационными колебаниями в плоскости кольца. Колебания в области $1165\text{ (}1153\text{)}\text{ см}^{-1}$ связаны с ассиметричными валентными колебаниями С-О-С β гликозидной связи.

Также метод ИК-спектроскопии позволяет определить соотношение между 1α и 1β целлюлозными алломорфами. По полученным ИК-спектрам рассчитано, что отношение 1α к 1β форме бактериальной целлюлозы, полученной как в статическом, так и в динамическом режиме культивирования составляет 40:60.

Получение аэрогелей из бактериальной целлюлозы, полученной в условиях статического и динамического культивирования

Аэрогели на основе бактериальной целлюлозы были получены методом лиофильного высушивания предварительно замороженного гидрогеля бактериальной целлюлозы. Для получения однородного гидрогеля проводили измельчение гель пленки бактериальной целлюлозы при помощи лабораторного блендера WARING

8010S. Плотность, пористость и средний размер пор аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы могут быть изменены путем использования гидрогеля с требуемой концентрацией бактериальной целлюлозы.

На рис. 4 представлены изображения лиофильной сушилки LABCONCO и высушенный образец аэрогеля.



Рисунок 4 - Лيوфильная сушилка (А) и высушенный образец аэрогеля (Б)

Таким образом, свойствами аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы можно легко управлять на этапе предварительной обработки бактериальной целлюлозы. Механическое измельчение бактериальной целлюлозы можно сочетать с ультразвуковой обработкой, поскольку она широко используется для дезинтеграции полимеров. Причем такая дезинтеграция не приводит к изменению химической строения обрабатываемых полимеров, а лишь к уменьшению их молекулярной массы. Так, например, согласно результатам Гавриловой А.С, интенсивная ультразвуковая обработка приводит к тому, что более 30% микрокристаллической целлюлозы переходит в наноразмерную форму (250-450 нм) [Гаврилова, 2015]. Продолжительность и интенсивность ультразвуковой обработки влияет на степень дезинтеграции полимеров. По окончании измельчения производили замораживание полученных образцов в контейнерах из фольги и затем лиофильно высушивали. Из бактериальной целлюлозы, полученной в статических или динамических условиях культивирования, нами был получен ряд образцов аэрогелей, имеющих плотность от 4,2 до 20 кг/м³ (рис. 5).

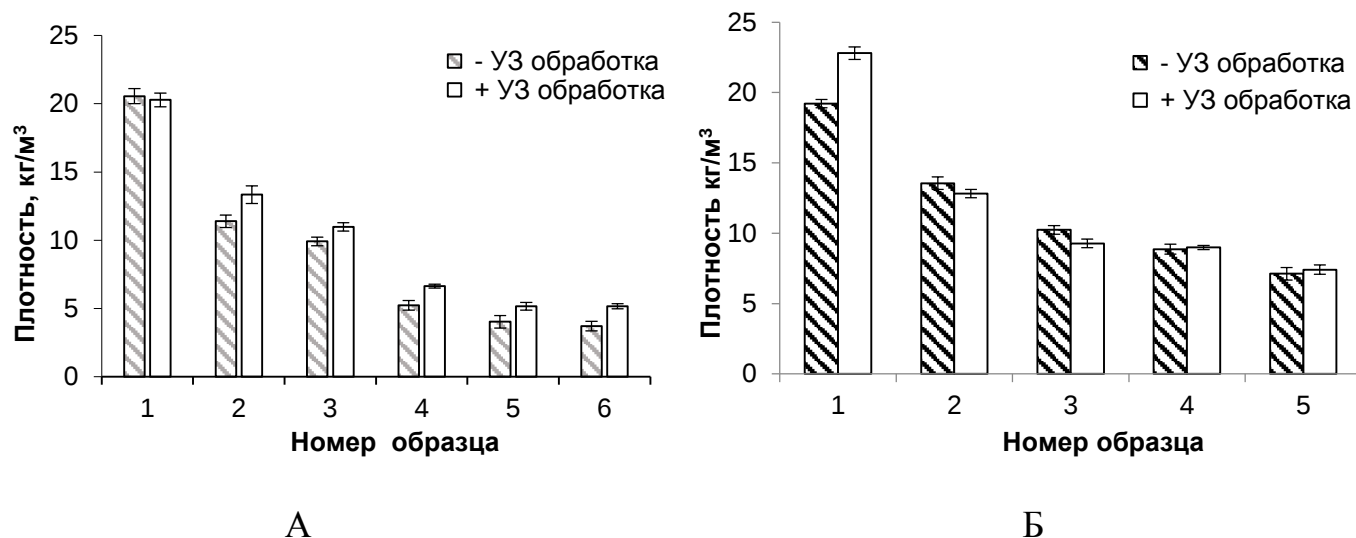


Рисунок 5 – Плотности аэрогелей из бактериальной целлюлозы подвергнутой механическому измельчению с дополнительной или без дополнительной ультразвуковой обработкой, А - Статическое культивирование, Б – Динамическое культивирование

Наименьшей плотностью обладает образец– 4,2 кг/м³±0,12. Что всего в 3,5 раза превышает плотность воздуха (1,204 кг/м³).

Исследование зависимости прочности аэрогелей от плотности

Было изучено влияние плотности получаемых аэрогелей на прочность (модуль Юнга). Полученные результаты представлены на рис. 6 – 7.

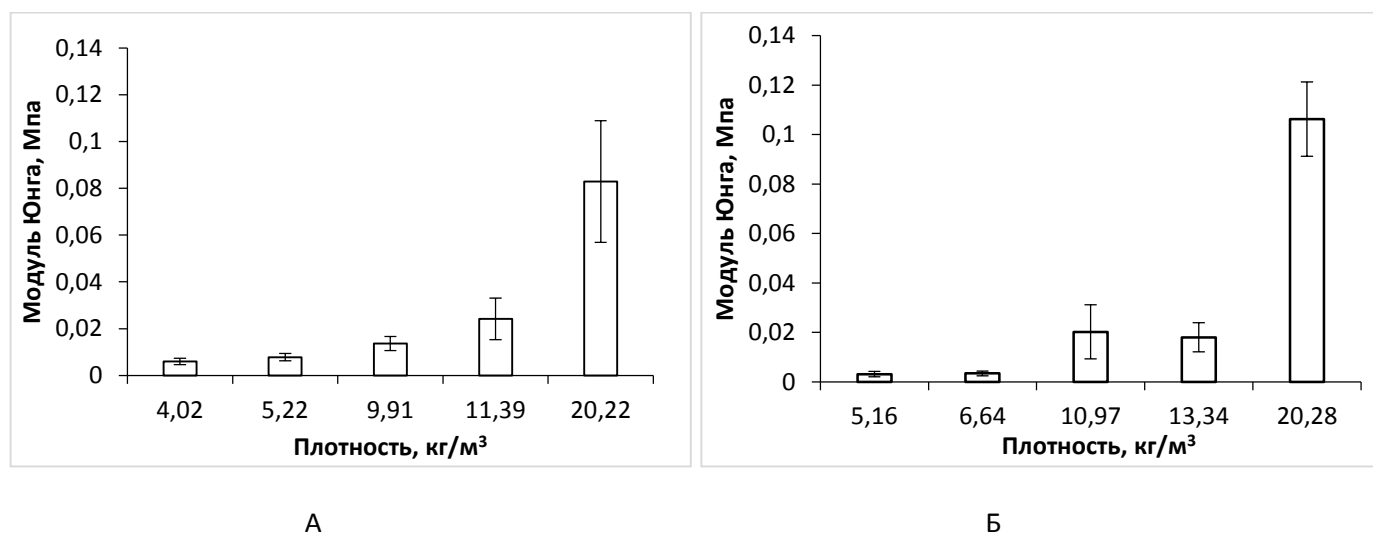


Рисунок 6 – Зависимость прочностных свойств аэрогелей из бактериальной целлюлозы, полученной в статических условиях культивирования от плотности образцов без УЗ обработки (А) и с УЗ обработкой (Б)

Согласно полученным результатам, с уменьшением плотности аэрогелей, полученных на основе БЦ, образованной в статических условиях, происходит уменьшение модуля Юнга (рис. 6 А). С уменьшением плотности образца с 20,22 до 11,39 кг/м³ происходит резкое снижение Модуля Юнга с 0,0829 до 0,0242 МПа.

Дальнейшее уменьшением плотности до $4,02 \pm 0,01$ приводит к снижению Модуля Юнга до 0,006 МПа. УЗ предобработка не оказывает существенного влияние на прочностные характеристики (рис. 6 Б).

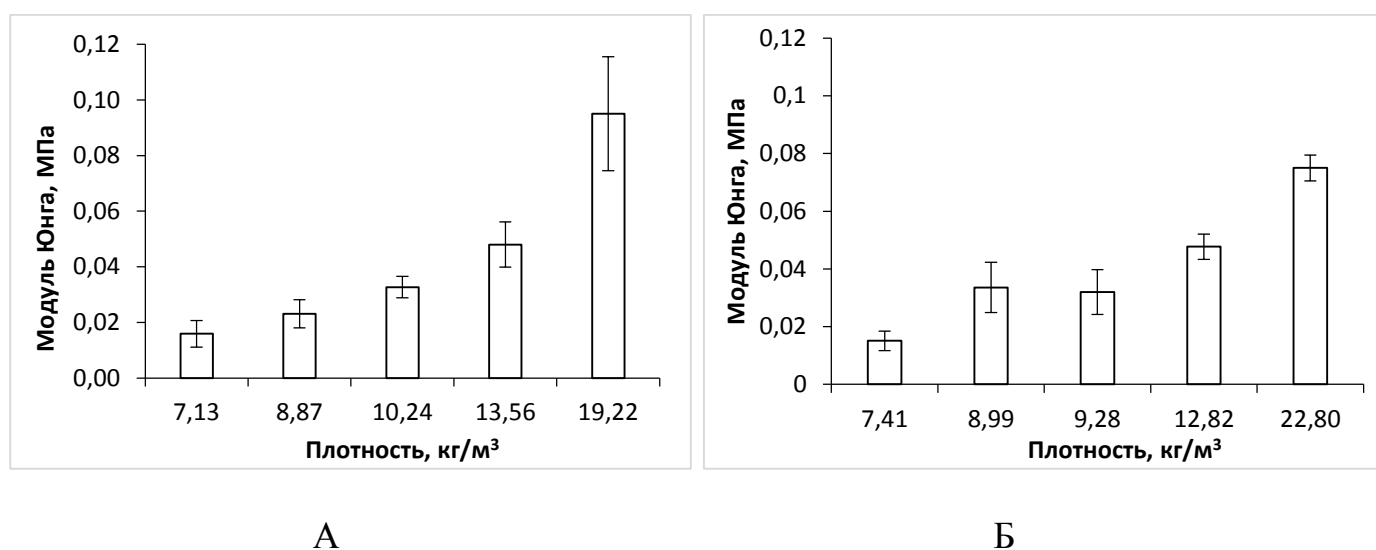


Рисунок 7 – Зависимость прочностных свойств аэрогелей из бактериальной целлюлозы, полученной в динамических условиях культивирования от плотности образцов без УЗ обработки (А) и с УЗ обработкой (Б)

Также были исследованы прочностные свойства (модуль Юнга) аэрогелей из БЦ, выращенной в динамических условиях. Полученные результаты модуля Юнга существенно не отличаются от прочности аэрогелей, полученных из БЦ, выращенной в статических условиях. Модуль Юнга аэрогелей с плотностью $19,22 \text{ кг/м}^3$ составляет 0,095 МПа, что соответствует подобной плотности аэрогелей, полученных на основе бактериальной целлюлозы, выращенной в статических условиях. Также уменьшение плотности образца не приводит к такому резкому снижению модуля Юнга, как в случае аэрогелей из «статической БЦ»: при снижении плотности до $13,56 \text{ кг/м}^3$ происходит уменьшение модуля Юнга до 0,048 МПа. Дальнейшее снижение плотности до $7,13 \text{ кг/м}^3$ привело к уменьшению прочности до 0,016 МПа (рис. 6 А). УЗ предобработка гидрогелей также не оказывает существенного влияния на изменение модуля Юнга (рис. 7 Б).

Микроморфология аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы

Методом сканирующей–эмиссионной микроскопии была исследована микроструктура полученных аэрогелей. Также у аэрогелей, полученных в статических и динамических условиях, была изучена зависимость количества от среднего размера пор. Полученные результаты представлены на рис. 8 – 11.

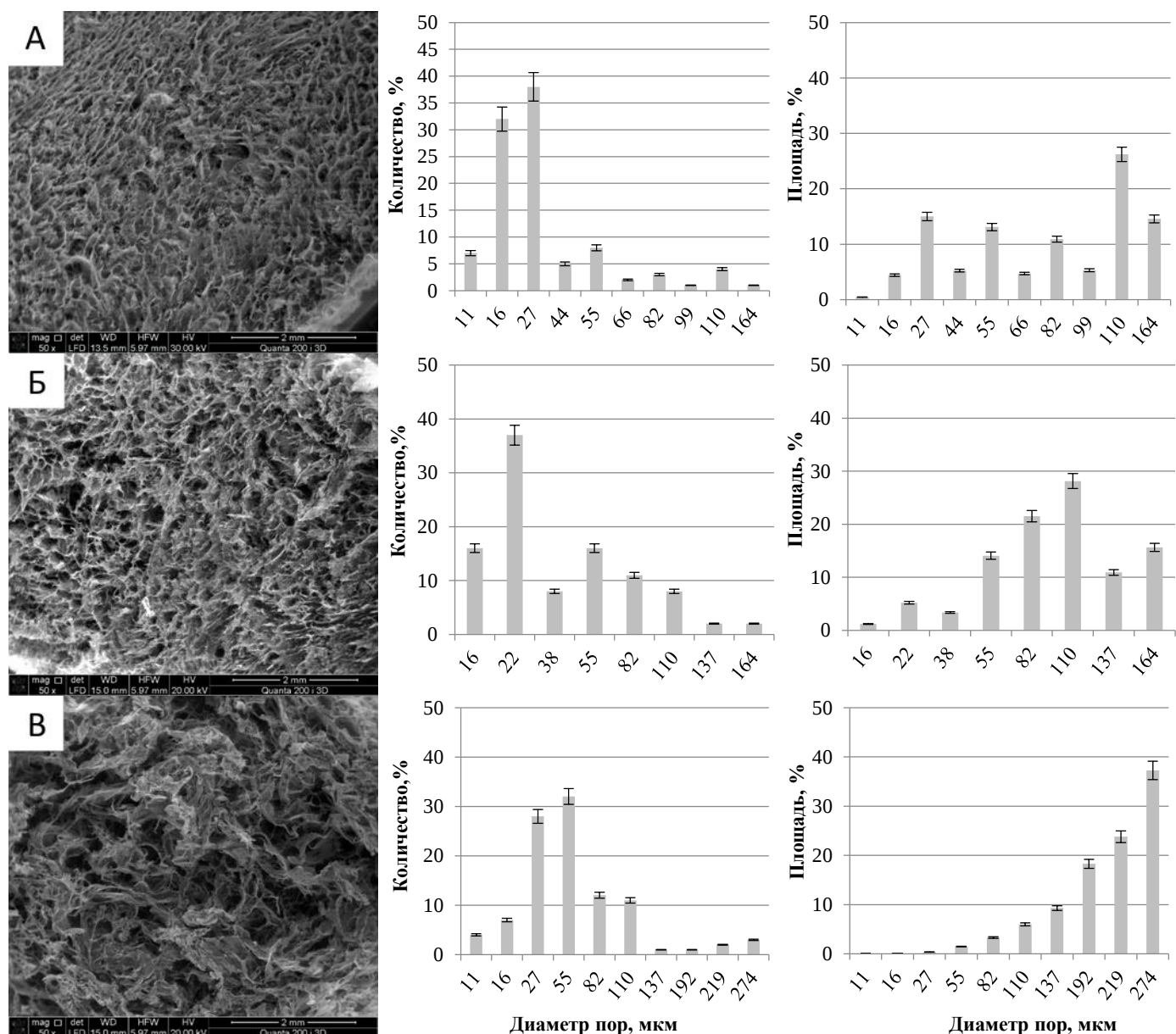


Рисунок 8 – Электронная микроскопия аэрогелей с плотностью 20,55 (А), 11,39 (Б) и 9,91 (В) кг/м³, полученных из бактериальной целлюлозы, синтезированной в статических условиях культивирования

Согласно представленным данным можно отметить, что у аэрогелей, полученных из бактериальной целлюлозы, выращенной в статических условиях, с уменьшением плотности происходит образование большого количества крупных пор, а количество пор небольшого размера при этом уменьшается. Так, у аэрогелей при плотности 20,55 кг/м³ основное количество пор находится в диапазоне 11 – 55 мкм. При плотности 11,39 кг/м³ размеры пор в основном находятся в диапазоне 16 – 110 мкм. А при плотности аэрогелей 9,91 кг/м³ обнаруживаются поры 11 – 110 мкм, но при этом появляются и крупноразмерные поры. При этом, с уменьшением плотности аэрогелей, наблюдается снижение вклада пор небольшого и среднего размера в общую пористость образца: так, если при плотности 20,55 кг/м³ доля пор 11-110 мкм в общей пористости составляет около 85%, то при плотности 9,91 кг/м³ их вклад не превышает 11%.

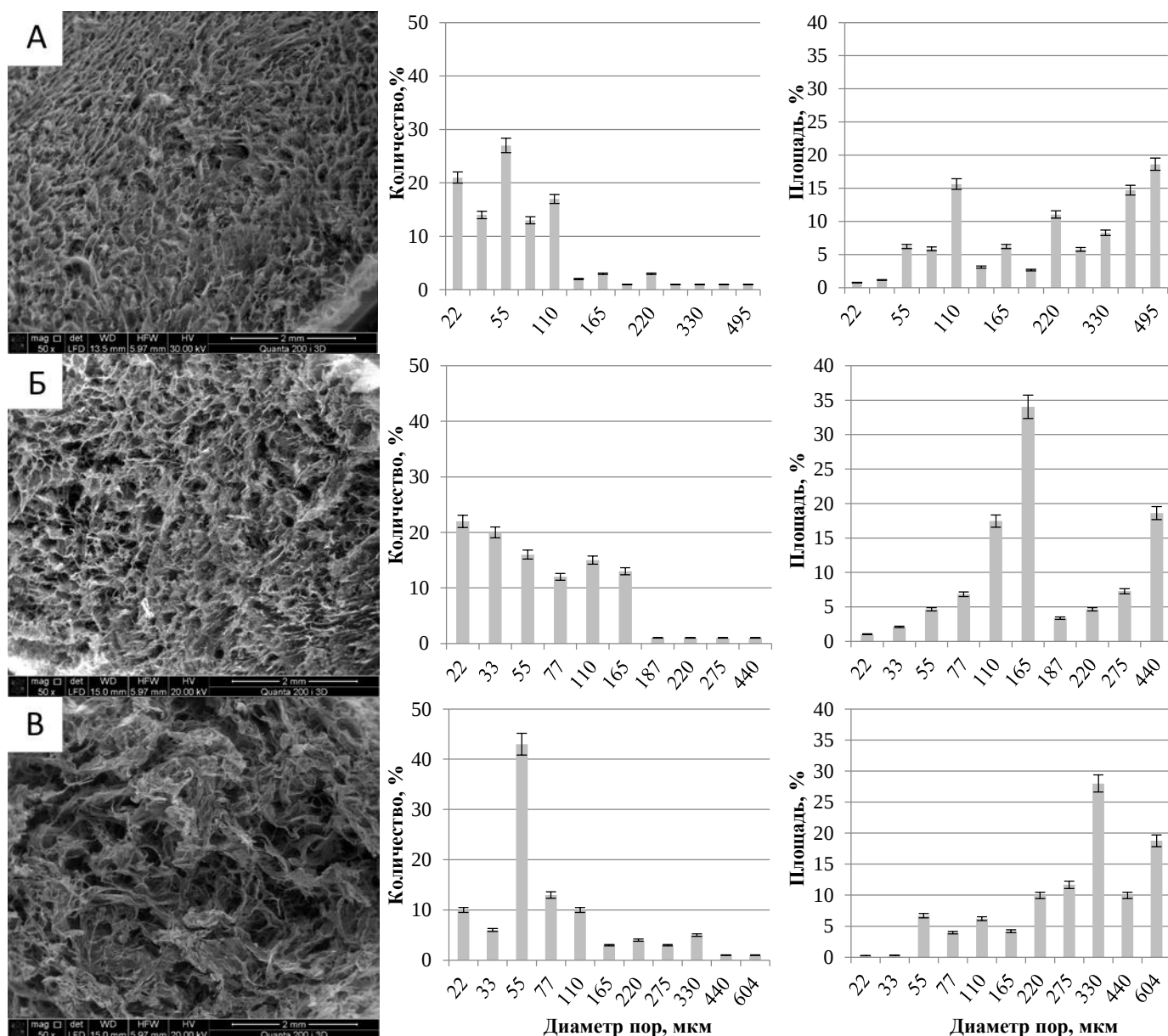


Рисунок 9 – Электронная микроскопия аэрогелей с плотностью 20,28 (А), 13,34 (Б) и 10,97 (В) кг/м³, полученных из бактериальной целлюлозы, синтезированной в статических условиях культивирования с обработкой УЗ

Согласно полученным результатам видно, что у аэрогелей, полученных из бактериальной целлюлозы, выращенной в статических условиях с УЗ предобработкой, с уменьшением плотности происходит образование большого количества крупных пор, а количество пор небольшого размера при этом уменьшается. Так, у аэрогелей при плотности 20,28 кг/м³ основное количество пор находится в диапазоне 22-110 мкм. При плотности 13,34 кг/м³ размеры пор в основном находятся в диапазоне 22-165 мкм. А при плотности аэрогелей 10,97 кг/м³ обнаруживаются поры 22-110 мкм. При этом можно заметить, что, как и в предыдущем случае, снижение плотности приводит к снижению доли в общей пористости пор мелкого и среднего размера с 35-40% до 10-15%:

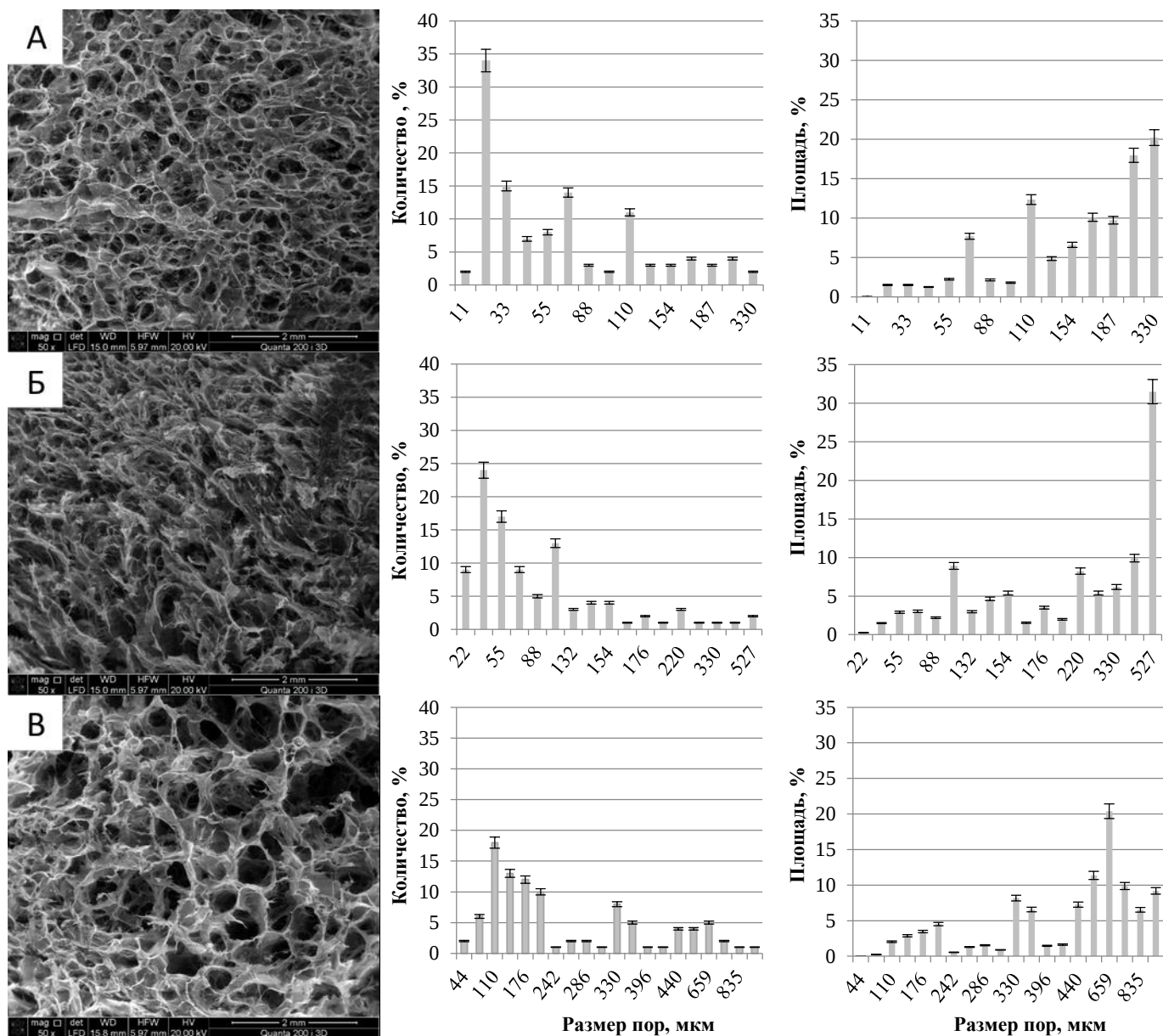


Рисунок 10 – Электронная микроскопия аэрогелей с плотностью 19,21 (А), 13,55 (Б) и 10,24 (В) кг/м³, полученных из бактериальной целлюлозы, синтезированной в динамических условиях культивирования

Согласно представленным данным можно отметить, что у аэрогелей, полученных из бактериальной целлюлозы, выращенной в динамических условиях, с уменьшением плотности происходит образование большого количества крупных пор, а количество пор небольшого размера при этом уменьшается. Так, у аэрогелей при плотности 19,21 кг/м³ основное количество пор находится в диапазоне 22-110 мкм. При плотности 13,55 кг/м³ размеры пор в основном находятся в диапазоне 22-154 мкм. А при плотности аэрогелей 10,24 кг/м³ обнаруживаются поры 66-220 мкм.

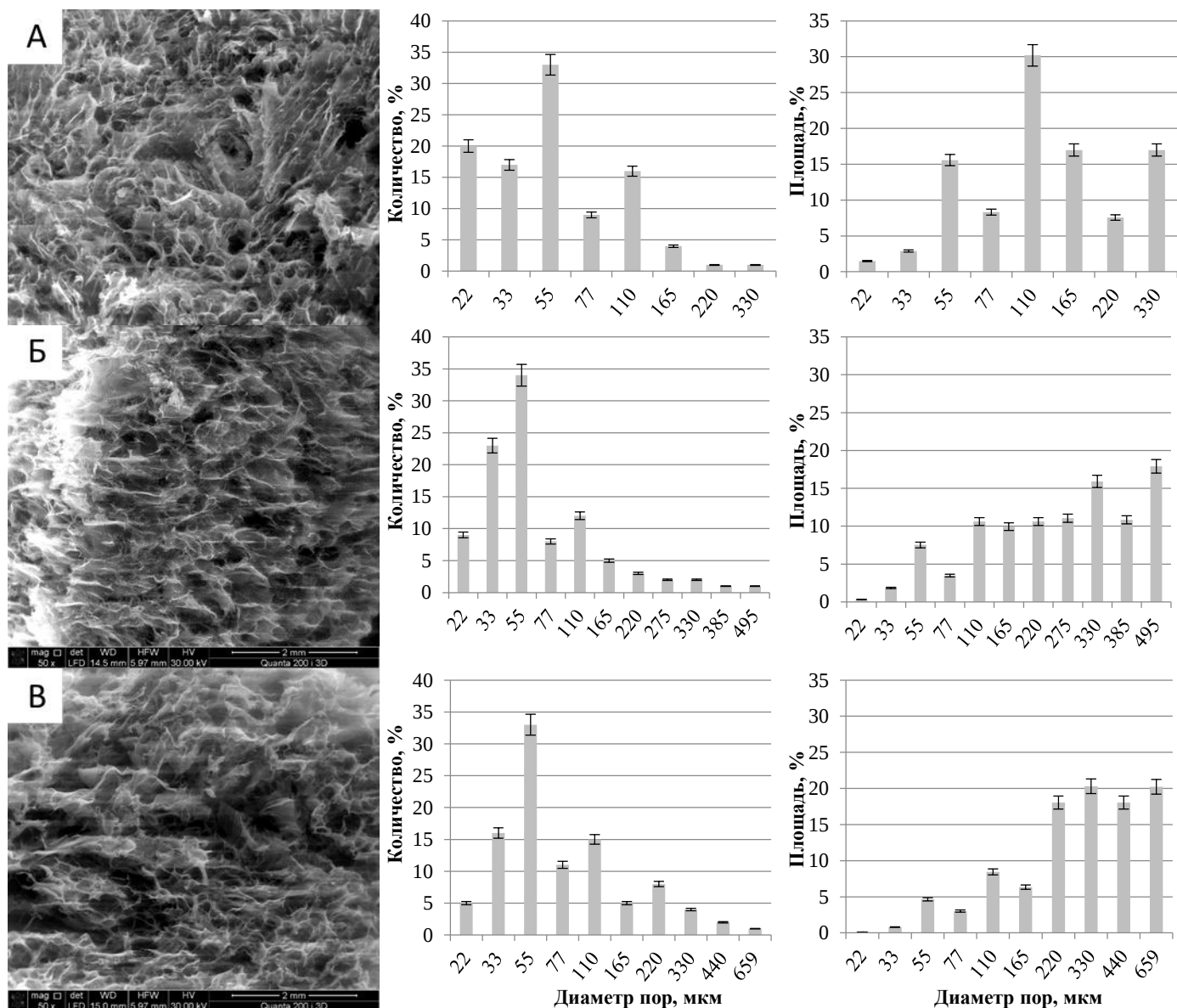


Рисунок 11 – Электронная микроскопия аэрогелей с плотностью 22,80 (А), 12,82 (Б) и 9,28 (В) кг/м³, полученных из бактериальной целлюлозы, синтезированной в динамических условиях культивирования с обработкой УЗ

Согласно полученным результатам видно, что у аэрогелей, полученных на основе бактериальной целлюлозы, выращенной в динамических условиях с УЗ предобработкой, с уменьшением плотности происходит образование большого количества крупных пор, а количество пор небольшого размера при этом уменьшается. Так, у аэрогелей при плотности 22,80 кг/м³ основное количество пор находится в диапазоне 22–110 мкм. При плотности 12,82 кг/м³ размеры пор в основном находятся в диапазоне 22–110 мкм. А при плотности аэрогелей 9,28 кг/м³ обнаруживаются поры 22–220 мкм.

Согласно полученным результатам, можно сделать вывод, что с уменьшением плотности образца происходит образование пор более крупного размера и вклад мелких пор в общую пористость материала уменьшается. Также, УЗ-предобработка приводит к увеличению среднего размера пор.

Исследование теплоизоляционных и звукоизоляционных свойств аэрогелей из бактериальной целлюлозы

Теплопроводность

Теплопроводность материала - это весьма важный показатель для теплоизоляционных материалов. Чем ниже коэффициент теплопроводности образца – тем более лучшим теплоизолятором является материал. При помощи цифрового измерителя теплового потока ИПП – 2 (ЭКСИС) были исследованы образцы аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы различной плотности.

На рис. 12 представлен график зависимости теплопроводности аэрогелей от плотности.

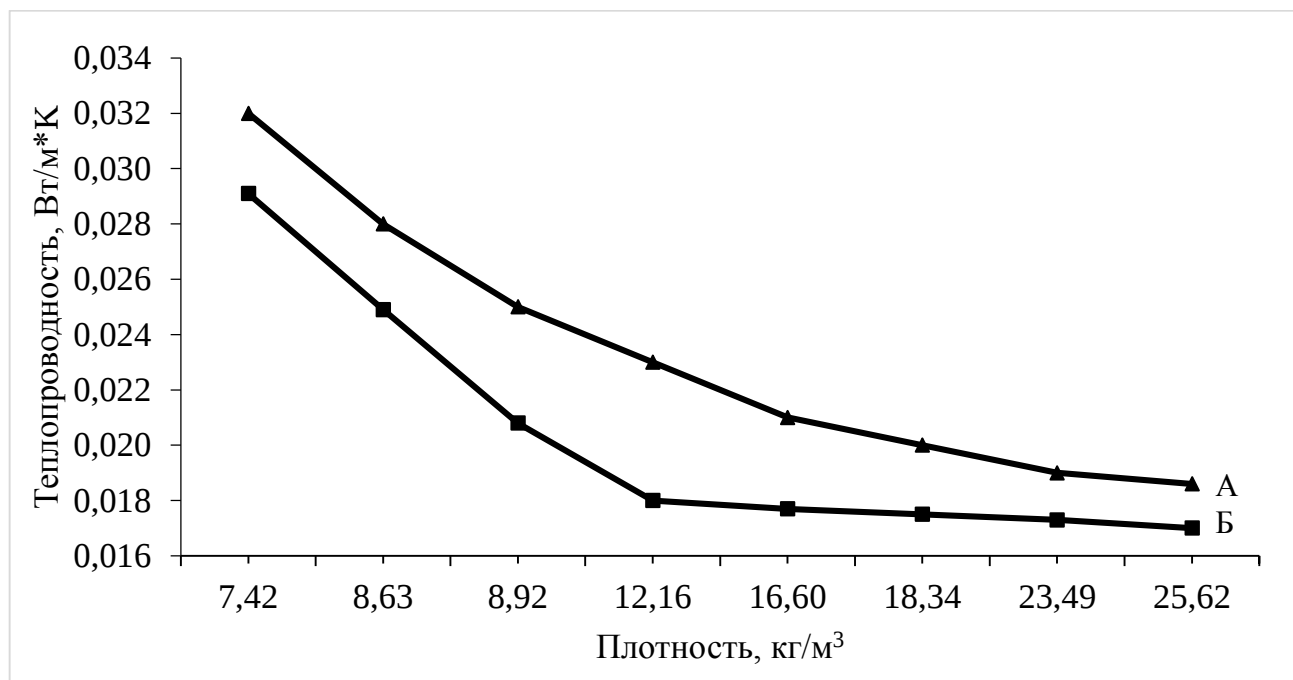


Рисунок 12 – Зависимость теплопроводности от плотности аэрогеля на основе БЦ, полученной в статических (А) и динамических (Б) условиях культивирования

Согласно полученным данным можно отметить, что с уменьшением плотности образцов аэрогелей происходит уменьшение коэффициента теплопроводности. Причем у аэрогелей на основе БЦ, полученной в статических условиях культивирования, по сравнению с БЦ, выращенной в динамических условиях культивирования, данный показатель выше: так, при плотности образцов $7,42 \text{ кг/м}^3$, в статических условиях коэффициент теплопроводности составляет $0,032 \text{ Вт/м}^*\text{К}$, а в динамических - $0,029 \text{ Вт/м}^*\text{К}$, а при плотности $25,62 \text{ кг/м}^3$ – $0,019$ и $0,017 \text{ Вт/м}^*\text{К}$ соответственно.

Для сравнения: коэффициент теплопроводности матов из минеральной ваты при 25°C плотностью 25 кг/м^3 составляет $0,036 - 0,040 \text{ Вт/м}^*\text{К}$, «эковата» из целлюлозных волокон, представляющая собой сыпучий материал в виде гранул, изготовленных из макулатуры с добавлением антисептиков и антипиренов, при плотности $45 - 65 \text{ кг/м}^3$ имеет коэффициент теплопроводности $0,042 \text{ Вт/м}^*\text{К}$ (Исаев А.В., 2014). Теплопроводность воздуха при 20°C составляет $0,023 \text{ Вт/м}^*\text{К}$. Таким образом,

получаемый образец обладает более низким коэффициентом теплопроводности, сопоставимым с теплопроводностью воздуха.

Звукопоглощение

Для исследования нормального коэффициента звукопоглощения производили измерение образца аэрогеля в импедансной трубе. В таблице 8.1 представлено сравнение образцов аэрогелей, полученных в наших исследованиях, с существующими промышленными пористыми звукоизоляционными материалами.

Таблица 8.1 - Сравнение нормального коэффициента звукопоглощения аэрогеля, полученного на основе БЦ с промышленными аналогами

Частота, Гц	Материал					
	Аэрогель- БЦ	Бетон	Пенопласт	Стекловата	Акустический поролон	Минеральная вата
200	0,330	0,010	0,080	0,170	0,200	0,560
250	0,340	0,010	0,090	0,450	0,300	0,650
315	0,410	0,010	0,110	0,580	0,450	0,770
400	0,540	0,020	0,150	0,660	0,500	0,950
500	0,670	0,020	0,190	0,800	0,650	0,980
630	0,740	0,020	0,180	0,870	0,710	1,000
800	0,720	0,020	0,175	0,890	0,780	0,980
1000	0,650	0,020	0,160	0,890	0,800	0,960
1250	0,770	0,025	0,155	0,920	0,800	0,950
1600	0,990	0,030	0,150	0,950	0,730	0,880
2000	0,920	0,040	0,140	0,970	0,700	0,860
2500	0,840	0,040	0,138	0,950	0,680	0,830
3150	0,870	0,040	0,130	0,940	0,660	0,820
4000	0,930	0,040	0,120	0,940	0,600	0,780
5000	0,950	0,041	0,115	0,930	0,550	0,770

Согласно полученным результатам, полученные образцы аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы обладают достаточно высоким коэффициентом звукопоглощения на всем диапазоне исследуемых частот. По сравнению с активно применяемым в настоящий момент минеральной ватой, аэрогель на основе бактериальной целлюлозы проявляет более низкий нормальный коэффициент звукопоглощения в диапазоне частот 200-1250 Гц. При частоте звука 1600-5000 Гц нормальный коэффициент звукопоглощения выше уже у аэрогеля.

По сравнению с акустическим поролоном, более высокий коэффициент звукопоглощения у аэрогеля также наблюдается при диапазоне частот 1600 – 5000 Гц.

Звуковые волны в диапазоне частот 3000-5000 Гц являются наиболее раздражающими для человека, а полученные аэрогели бактериальной целлюлозы имели самый высокий коэффициент звукопоглощения в диапазоне частот 3000-5000 Гц.

Согласно полученным данным видно, что аэрогели на основе бактериальной целлюлозы являются перспективным материалом для создания звукоизоляционных

материалов. Кроме того, на основе аэрогелей и минеральной ваты возможно создание композитного материалы с улучшенными звукоизолирующими свойствами.

Исследование термоустойчивости аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы

Термоустойчивость полученных аэрогелей измеряли методом термогравиметрии на аппарате TGA/SDTA 851e фирмы Mettler Toledo.

Поскольку согласно полученным данным, с уменьшением плотности происходит уменьшение прочности аэрогелей, то для исследования теплоустойчивости были выбраны образцы аэрогелей плотностью 13,34 и 20,28 кг/м³, а также для сравнения проверили высушенную пленку бактериальной целлюлозы. На рис. 13 представлены полученные результаты

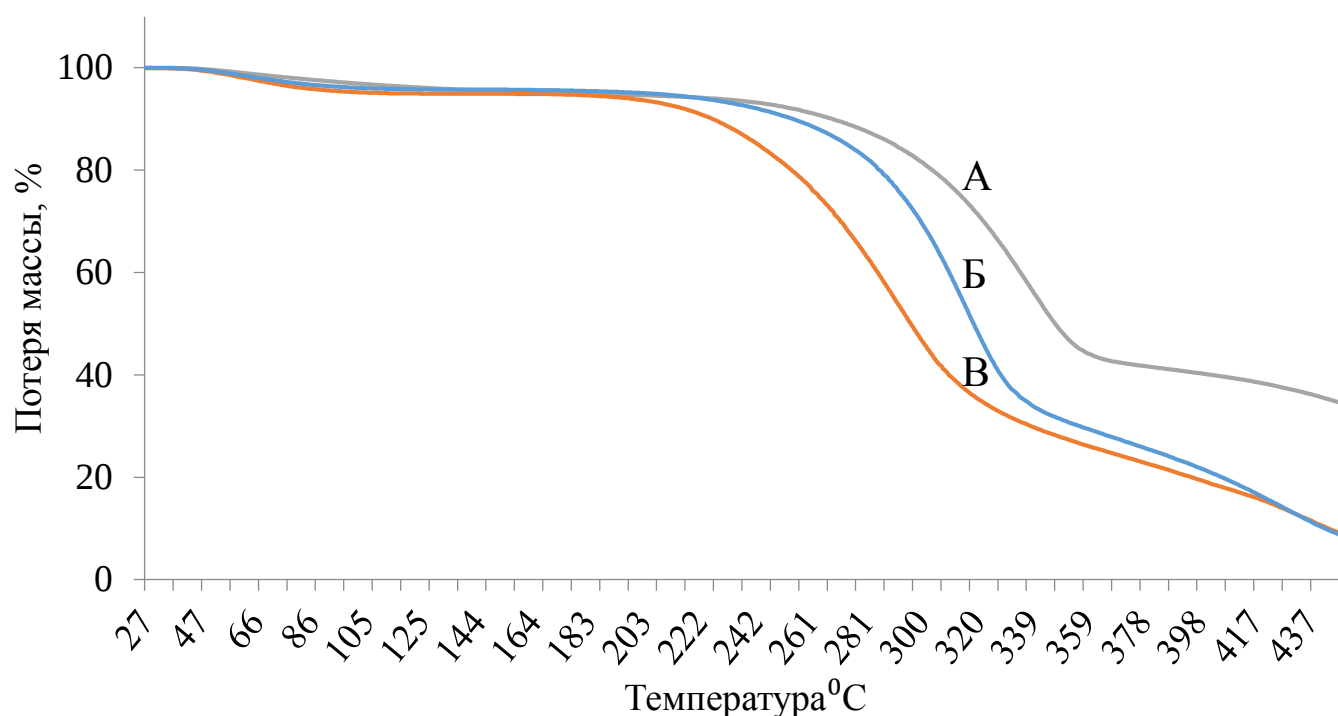


Рисунок 13 – TGA анализ образцов аэрогелей с плотностью 13,34 (Б) и 20,28 (В) кг/м³ и сухой пленки БЦ (А)

Согласно полученным результатам, можно отметить, что снижение массы всех образцов начинается при температуре 57 °C и до 200 °C потеря массы не превышает 5%, что связано с испарением связанной с БЦ водой. В целом все образцы аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы сохраняют термоустойчивость до температуры 280 °C. При дальнейшем повышении температуры происходит терморазрушение волокон БЦ. При этом более плотный образец аэрогеля (20,28 кг/м³) более термостабилен, так, при 300°C у него происходит потеря 30%, в то время как у более легкого образца – 53% от исходной массы. Таким образом можно отметить, что при уменьшении плотности происходит увеличение термоустойчивости полученных аэрогелей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе диссертационного исследования были получены образцы аэрогелей низкой плотности на основе бактериальной целлюлозы.

Для снижения себестоимости был исследован уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы при культивировании продуцента на различных питательных средах. Методами ИК-спектроскопии и ЯМР-анализа было доказано, что получаемый при культивировании штамма *Komagataeibacter sucrofermentans* B-11267 является именно целлюлозой, причем без наличия посторонних веществ. Кроме того, условия культивирования (статические и динамические) не оказывают влияния на состав и структуру бактериальной целлюлозы.

Проведенное исследование показало, что условия получения бактериальной целлюлозы влияют на плотность, прочность и пористую структуру аэрогелей. Показано, что получаемый материал по своим тепло- и звукоизолирующим свойствам превосходит все известные промышленные аналоги. При этом данные аэрогели являются экологически безопасным материалом.

ВЫВОДЫ

1. При культивировании штамма *Komagataeibacter sucrofermentans* В-11267 на отходах сахарных производств – мелассе, получили бактериальную целлюлозу в количестве 4,0 г/л. Также установлено, что уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы зависит от режима культивирования.

2. По результатам ИК, ЯМР и рентгеноструктурного методов анализа показано, что получаемый в ходе культивирования штамма *Komagataeibacter sucrofermentans* В-11267 на среде с мелассой полисахарид действительно представляет собой целлюлозу, с типичными для нее пиками на ИК-спектрограмме и характерными спектральными областями на ЯМР-спектре. Степень кристалличности полученного образца по результатам XRD-анализа составляет 86,6 %, размер кристаллитов-5,7 нм.

3. Установлено, что аэрогели, полученные из БЦ обладают сверхнизкой теплопроводностью и напрямую зависят от их плотности: с увеличением плотности образца происходит снижение коэффициента теплопроводности как в статических, так и в динамических условиях.

4. Показано, что аэрогели из бактериальной целлюлозы с плотностью 20 кг/м³ имеют однородную пористую структуру со средним размером пор 110 мкм. Снижение плотности аэрогелей приводит к появлению крупных пор, размер которых достигает 1 мм.

5. Установлено, что с увеличением плотности возрастает прочность получаемых аэрогелей и становится равной 0,0829 МПа.

6. Показано, что аэрогели из бактериальной целлюлозы по своим звукопоглощающим свойствам превосходят многие материалы, в том числе поролон, часто используемый в разных областях применения. Термогравиметрический анализ показал, что бактериальная целлюлоза является термоустойчивым материалом с началом термоэмиссии 280 °С.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список публикаций в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и RSCI

1. Revin V.V., Pestov N.A., **Shchankin M.V.**, Mishkin V.P., Platonov V.I., Uglanov D.A. A study of the physical and mechanical properties of aerogels obtained from bacterial cellulose // *Biomacromolecules*. – 2019. – Vol. 20. I. 3 – P. 1401–1411. Impact Factor – 5,667 (Q1). DOI: 10.1021/acs.biomac.8b01816
2. **Schankin M.**, Bogatyreva A., Sapunova N., Paramonova E., Liiaskina E., Pestov N., Revin V. Functional nanomaterials from bacterial cellulose // *Journal of Biotechnology*. – 2016. – Vol. 231. – P. 49–50. Impact Factor – 3,503 (Q1). DOI:10.1016/j.jbiotec.2016.05.189
3. Liiaskina E., Revin V., Nazarkina M., Bogatyreva A., **Shchankin M.** Cost-effective production of bacterial cellulose using food industry by-products / // *Journal of Biotechnology*. – 2015. – Vol. 208. – P.117. Impact Factor – 3,503 (Q1). DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.06.369
4. Revin V., Liiaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A., **Shchankin M.** Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by products // *Brazilian journal of microbiology*. – 2018. – Vol. 49. I. 1 – P. 151 – 159. Impact Factor – 1,984 (Q3). DOI: 10.1016/j.bjm.2017.12.012

Статьи в журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК

1. Богатырева А. О. Сапунова Н.Б., Щанкин М.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальных экзополисахаридов на средах с отходами биотехнологических производств // *Вестник технологического университета*. – 2016. – Т.19, №24. – С.142-145.

Прочие публикации и тезисы в сборниках научных конференций

1. Лияськина Е.В., Ревин В.В., Назаркина М.И., Богатырева А.О., Щанкин М.В. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов // *Актуальная биотехнология*. – 2015. – № 3 (14). – С.31-32.
2. Щанкин М.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Изучение влияния состава среды на физико-механические свойства бактериальной целлюлозы // *Сборник статей Международной научно-практической конференции. Инновационная наука и современное общество*. - Уфа: *Аэтерна*. – 2014. – с. 19-21.
3. Сапунова Н.Б., Богатырева А.О., Щанкин М.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальной целлюлозы на среде с мелассой // *XV Международная конференция молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии»* (г. Казань, 13-14 апреля 2016 г.). Сборник материалов конференции. – Казань: Издательство «БРИГ». – 2016. – С. 233-235.
4. Щанкин М.В. Лияськина Е.В., Ревин В.В. Оптимизация условий получения бактериальной целлюлозы в статических условиях // *Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке: Материалы всеросс. науч. конф. с междунар. участием*. (Саранск, МГУ им. Н.П. Огарева, 23-25 сентября 2015 г.) - Саранск: Типография ООО «Референт». – 2015. – С. 62-64

5. Богатырева А.О., Щанкин М.В., Сапунова Н. Б., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальных экзополисахаридов // XV Международная конференция молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии» (г. Казань, 13-14 апреля 2016 г.). Сборник материалов конференции. – Казань: Издательство «БРИГ». – 2016. – С. 154-155.
6. Лияськина Е.В., Ревин В.В., Богатырева А.О., Щанкин М.В., Сапунова Н.Б. Получение бактериальной целлюлозы и материалов на ее основе // Актуальная биотехнология. – 2016. – Т.3, №18. – С.38-39.
7. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назаркина М.И., Богатырева А.О., Щанкин М.В. Получение бактериальной целлюлозы на отходах пищевой промышленности // Актуальная биотехнология. – 2014. – № 3 (10). – С.112.
8. Лияськина Е.В., Ревин В.В., Богатырева А.О., Сапунова Н.Б., Парамонова Н.Б., Щанкин М.В. Биотехнология микробных экзополисахаридов // Тезисы доклада на конференции I Микробиологического конгресса. - 2017. - Р. 159-160
9. Щанкин М.В., Лияськина Е.В., Пестов Н.А., Ревин В.В. Получение наноматериалов на основе бактериальной целлюлозы // Тезисы докладов 69-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых., Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского Институт биологии и биомедицины. – Нижний Новгород: Издательство: Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 2016. - С. 183.

Автор в следующих патентах:

1. **Патент № 2700624**, Российская Федерация. Способ получения аэрогеля на основе бактериальной целлюлозы для звукоизоляционного материала / **Ревин В.В., Щанкин М.В., Пестов Н.А.**; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва" (RU)– № 2018144378; опубл. 18.09.2019.

Ноу-хау

1. Секрет производства (**ноу-хау**) «Способ получения стабильного гидрогеля бактериальной целлюлозы, обеспечивающего получение аэрогеля с высокими эксплуатационными характеристиками, позволяющими использовать его в качестве тепло- и звукоизолирующего материала в различных отраслях промышленности» Распоряжение «Об отнесении к категории коммерческой тайны» от 06.12.2018 № 135-р. **Ревин В.В., Щанкин М.В., Пестов Н.А.**

2. Секрет производства (**ноу-хау**) «Способ получения ультратеплоизоляционного материала на основе органического аэрогеля» Распоряжение «Об отнесении к категории коммерческой тайны» от 06.12.2018 № 45-р. **Ревин В.В., Щанкин М.В.**