

ВИГОТОВЛЕННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАКТЕРІАЛЬНОЇ НАНОЦЕЛЮЛОЗИ

В. В. Бойко, кандидат фізико-математичних наук, доцент

***В. П. Чорній, кандидат фізико-математичних наук, старший викладач
Національний університет біоресурсів та природокористування України***

***С. Г. Неділько, доктор фізико-математичних наук, старший науковий
співробітник***

В. П. Щербацький, провідний інженер

К. Р. Кроленко, інженер

М. А. Шегада, студент

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

E-mail: SNedilko@univ.kiev.ua

Анотація. Наноцелюлоза є біополімером, який завдяки своїм привабливим фізико-хімічним властивостям нині інтенсивно вивчається як матеріал для застосування в біомедицині, харчовій промисловості, електроніці, тощо. Сучасні методи одержання наноцелюлози з деревної сировини потребують застосування кислот, лугів та розчинників, що є недоліком з погляду як економіки, так і екології. Альтернативним джерелом наноцелюлози може бути біомаса, яку одержують внаслідок мікробних процесів. У цій роботі представлено результати застосування методу на основі мембран Котбиса для виготовлення бактеріальної наноцелюлози. Структуру та оптичні властивості плівок одержаної бактеріальної наноцелюлози досліджено із аналізу даних рентгенофазового аналізу та люмінесцентної спектроскопії. Із аналізу рентгенівських дифрактограм плівок наноцелюлози, одержаних мікробним та хімічним методами, виявлено різницю в розмірах областей на яких відбувається розсіювання. Для випадку бактеріальної наноцелюлози розміри цих областей є значно більшими. Перерозподіл інтенсивності піків в дифрактограмах при зміні методу виготовлення, ймовірно, відбиває різницю в співвідношенні внеску кристалічної та аморфної областей для зразків целюлози різного типу. Зразки бактеріальної целюлози, як «чистої», так і з додаванням барвника Родамін С, характеризуються інтенсивною видимою фотолюмінесценцією при кімнатній температурі. Обробка зразків розчином NaOH призводить до зменшення інтенсивності червоної смуги люмінесценції (максимум ~ 670 нм) целюлози, в той час як додавання барвника підсилює смугу в жовтій (максимум при ~ 570 нм) спектральній області. Таким чином, застосований в роботі метод одержання бактеріальної наноцелюлози дозволяє створити люмінесцентні плівки, спектр випромінювання яких можна легко модифікувати обробкою лугом або додаванням розчинів барвників.

Ключові слова: *бактеріальна наноцелюлоза, рентгенофазовий аналіз, фотолюмінесценція*

Актуальність. Наноцелюлоза (НЦ) є одним із натуральних біополімерів, який сьогодні інтенсивно вивчається завдяки своїм привабливим властивостям, таким як висока механічна міцність, велика площа поверхні, хімічна стабільність, гідрофільність, кристалічність, прозорість, біосумісність, магнітна та електрична сприйнятливість, протонна провідність і, що важливо, доступність – целюлоза є найпоширенішим відновлюваним органічним матеріалом, що виробляється в біосфері [1]. Ці властивості роблять НЦ дуже цікавою для різноманітних застосувань. Зокрема, в біомедичній та фармацевтичній галузях НЦ може бути використана для лікування ран, створення фільтрів для видалення вірусів, систем доставки ліків, регенерації тканин та біодруку [2].

У харчовій промисловості НЦ може використовуватися як функціональний харчовий інгредієнт, стабілізатор їжі або як нанонаповнювач з газобар'єрними властивостями для упаковки харчових продуктів. Наноцелюлоза використовується також в аерогелях, гідрогелях, мембранах та інших типах адсорбентів для очищення стічних вод і вдосконалених процесів сепарації завдяки своїй гідрофільності, біологічній розкладності та адсорбційним властивостям. Крім того, НЦ знайшла застосування в розробці високотехнологічних енергетичних приладів, трибоелектричних наногенераторів, гнучких транзисторів, (біо)датчиків та інших пристроїв для нанотехнологій, накопичення енергії та фотоніки [3, 4].

Для отримання НЦ шляхом розщеплення складної рослинної деревинної матриці потрібні сильні кислоти, луки або окремі розчинники, що робить ці методи незручними з екологічних та економічних причин. Альтернативою одержання НЦ з біомаси є процедура отримання НЦ за допомогою мікробних процесів. Одержана в такий спосіб НЦ відома як бактеріальна наноцелюлоза (БНЦ). Перевагами БНЦ є висока чистота порівняно з рослинними джерелами, краща гнучкість, вища гідрофільність тощо. Недоліками процедури отримання БНЦ є тривалий час виробництва (до 21 доби), необхідність ретельного витримування умов необхідних для вирощування конкретних бактерій та умов реакції біосинтезу [5, 6].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Зручним джерелом БНЦ може бути мембрана Kombucha (КМ), побічний продукт промисловості оздоровчих напоїв. КМ – целюлозні пеликули, отримані під час ферментації чорного або зеленого чайного відвару з додаванням 5 – 8 % сахарози за допомогою симбіотичного консорціуму бактерій та дріжджів (SCOBY) [7].

Рідка фаза процесу бродіння – так званий “суп”, містить велику кількість антиоксидантів, фенолів та поліфенолів, глюкуронової кислоти, D-сахарної кислоти-1,4-лактону та комплексу вітамінів групи В. Тверда фаза, яка утворюється на межі розділу «суп» - повітря за 3 – 21 дні ферментації - це пекула на основі целюлози, відома як чайний гриб. Ця мікробна біоплівка складається з багатошарової матриці з переплутаних нано- та мікрофібрил бактеріальної целюлози і має надзвичайно стійку захисну структуру для бактеріальної колонії, можливо найсильніший природним чином синтезований біологічний матеріал.

Целюлоза складається з довгих, лінійних гомополімерних ланцюжків від сотень до 20 000 одиниць D-глюкози, в яких повторюваний сегмент, званий целобіоза, є димером двох β -1,4-зв'язаних ангідро-D-глюкозних одиниць, причому кожна одиниця повертається на кут 180° до своїх сусідів. Сусідні одиниці глюкози ковалентно зв'язані через ацетальні зв'язки двох вуглеців глюкопіранових кілець та двох внутрішньомолекулярних водневих зв'язків, які стабілізують стрічкоподібний ланцюг між гідроксилами однієї глюкози з кільцевим киснем та гідроксилом сусідньої одиниці. Під час біосинтезу целюлози кожен полімерний ланцюг має відновлюючий (редуючий) кінець, який стабілізується як циклічний напівацеталь та спрямований у сторону від бактерії, а також невідновлюючий кінець, який є місцем зростання ланцюга за допомогою синтезу целюлози. Ці високомолекулярні ланцюги також самостійно асоціюються у групи з 36, або ж 24 ланцюгів, за допомогою внутрішньо-молекулярних водневих зв'язків та міжшарових взаємодій Ван-дер-Ваальса між глюкопіранозними кільцями і утворюють протофібрилу, тоді як група протофібрил стає нанофібрилою. Сотні нанофібрил далі збираються в мікрофібрили, що дають змогу створити стійку тривимірну біоплівку, що плаває на поверхні «супу». Ця біоплівка на основі целюлози являє собою високоадаптивну мікробну макроколонію, яка є захисною для співтовариства прокаріотів або

еукаріотів і є дуже стійкою навіть у суворих умовах вакууму, значних коливань температури та сильного УФ - випромінювання. У світлі цих аспектів отримання нано- та мікрофібрил целюлози з КМ може бути корисним технологічним процесом, який перетворює відходи у високоцінний біоматеріал.

Мета дослідження - дослідити процедури отримання в лабораторних умовах бактеріальної наноцелюлози з мембран *Kombucha* (Чайного гриба). Вивчити шляхом аналізу характеристик спектрів рентгенофазового аналізу (РФА) та фотолюмінесценції (ФЛ) властивості плівок, виготовлених на основі бактеріальної наноцелюлози, як «чистих», так і з додаванням флуоресцентного барвника Родаміну С.

Матеріали і методи дослідження. Для одержання БЦ спочатку готували поживні розчини для культури: 1,25 л води (дистилят), 87,5 г цукру, 8,75 г чорний чай «Зустрічай», який після охолодження був профільтрований та змішаний з материнською культурою мембран *Kombucha* (КМ). КМ (0,5 л води та 35 мл материнської культури) з кислотністю ($\text{pH} = 4,0 \pm 0,1$), після розчин «К0» зберігався при температурі $\sim 15 - 15,5$ °С. Далі, були взяті зразки целюлози: ВС - старт (без обробки розчином NaOH), ВС-1d (доба у розчині лугу NaOH 1%), ВС-8d (тиждень у розчині лугу NaOH 1%). Після обробки та тривалого промивання дистильованою водою зразки ВС-1d/8d стали прозорими на периферії і структурно шаруватими.

Від зразків, одержаних за описаною методикою, було відрізано кілька смужок розміром 3×1 см², які надалі були розміщені на предметному склі (див. рис. 1, а) з метою подальшого їх висушування та підготовки до вимірювання оптичних властивостей. Плівку більшої товщини, ВС-8d, було розділено на дрібні шматки, які використовувалися для виготовлення зразків з додаванням флуоресцентного барвника Родамін С. Для цього шматки замочували в розчині Родаміну С в етиловому спирті (концентрація Родаміну С = 10^{-4} моль/л). Вміст барвника змінювали шляхом зміни часу витримки БНЦ у розчині барвника. Вміст Родаміну С у зразках не досліджувався, однак, очевидно, що він зростає зі зростанням часу витримки зразків у розчині. Це підтверджується густиною забарвлення зразків, як це можна бачити з рис. 1, б, де наведено зовнішній вигляд зразків та їх нумерацію. Опис зразків наведено в таблиці 1.

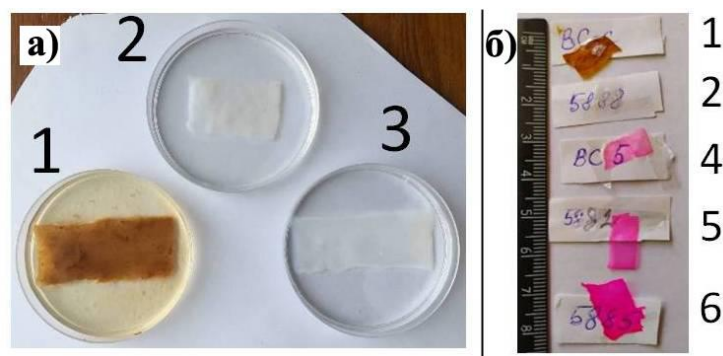


Рис. 1. Зовнішній вигляд виготовлених зразків БНЦ:

а - розміщеної на скляних підкладках; *б* - на папері. Цифри відповідають номерам зразків в таблиці 1

1. Загальна характеристики зразків БНЦ

Номер та назва зразку	Забарвлення	Примітка
№1: ВС-старт	Коричневий	Без обробки
№2: ВС-1d	Білий	Обробка NaOH (1 днів)
№3: ВС-8d	Білий, прозорий	Обробка NaOH (8 днів)
№4: ВС-8d+RC(5sec)	Малиновий	NaOH + RC, 5 сек.
№5: ВС-8d+RC(60sec)	Густо-малиновий	NaOH + RC, 60 сек.
№6: ВС-8d+RC(300sec)	Насичений малиновий	NaOH + RC, 300 сек.

Результати дослідження та їх обговорення. На рис. 2 наведено спектри розсіяння рентгенівських променів виготовленими зразками. На цьому ж рисунку для порівняння наведено спектри розсіяння зразків наноцелюлози (НЦ), отриманої хімічним способом (дві нижні криві на рис 2). Порівняння із літературними даними показало, що спектральні деталі, розташовані для кутів розсіяння 2Θ у діапазоні $10 - 30^\circ$ відповідають розсіянню на атомних площинах целюлози.

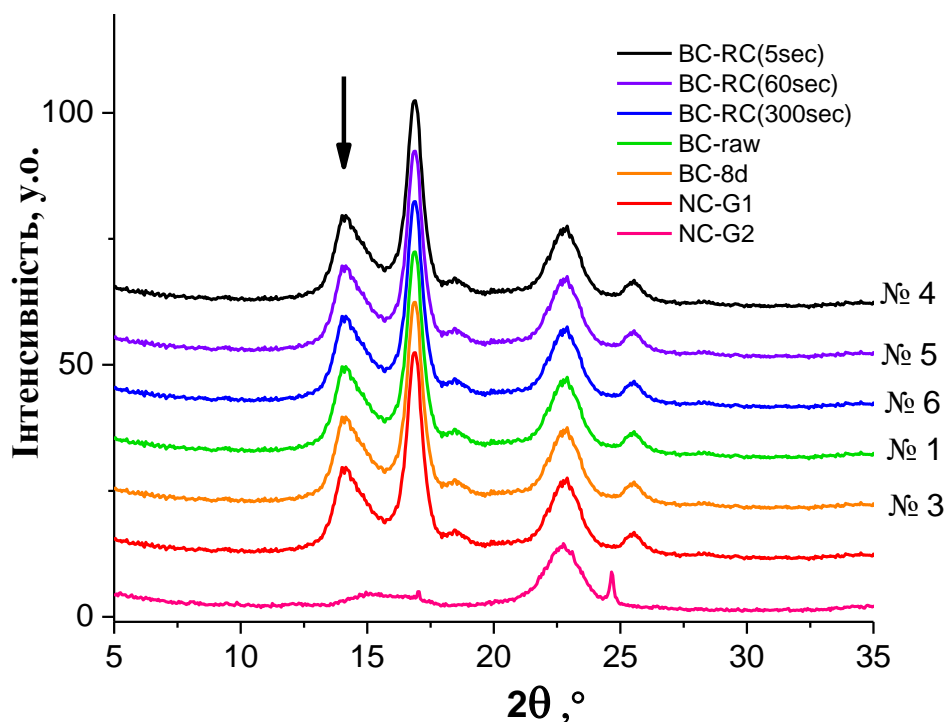


Рис. 2. Спектри рентгенівського розсіювання зразками БНЦ та НЦ

Як видно із рис. 2, розсіювання на НЦ характеризуються дещо іншим розподілом піків за інтенсивністю: тут піки на кутах $2\Theta \approx 13$ та 17° є менш інтенсивними, ніж піки на кутах 23 та 26° . У спектрах розсіювання ВС якраз навпаки: малокутові піки є більш інтенсивними. Крім того, легко бачити, що малокутові піки бактеріоцелюлози характеризуються значно вищим розділенням порівняно із піками наноцелюлози. Ці особливості вказують на різницю в розмірах областей, на яких відбувається розсіювання: очевидно, для випадку БНЦ розміри цих областей (частинок) є значно більшими. Крім того, зазначений перерозподіл інтенсивності, можливо, відбиває різницю в співвідношенні об'ємного внеску кристалічної та аморфної областей для зразків целюлози різного типу.

Дані цього рисунку також показують, що положення малокутового піка $2\Theta \approx 13^\circ$ є чутливим до типу зразка (ВС чи НЦ), характеру обробки та вмісту барвника. Цей результат вказує на зміну і структури атомних площин, розташованих на великій відстані.

На рис. 3 наведено спектри фотолюмінесценції виготовлених зразків БНЦ, одержаних при кімнатній температурі зразків. Видно, що найбільш інтенсивним в спектрі ФЛ БНЦ є компонент зелено-червоного випромінювання, $515 - 700$ нм, з

максимумами спектральних смуг (λ_{\max}) ФЛ при: ~ 625 нм (БНЦ без обробки NaOH), ~ 574 нм (БНЦ + NaOH [BC-8d]); ~ 572 нм (БНЦ + Родамін С, обробка протягом 5 сек.), ~ 577 нм (БНЦ + Родамін С, обробка протягом 60 сек.) при їх збудженні на $\lambda_{36} = 473$ нм.

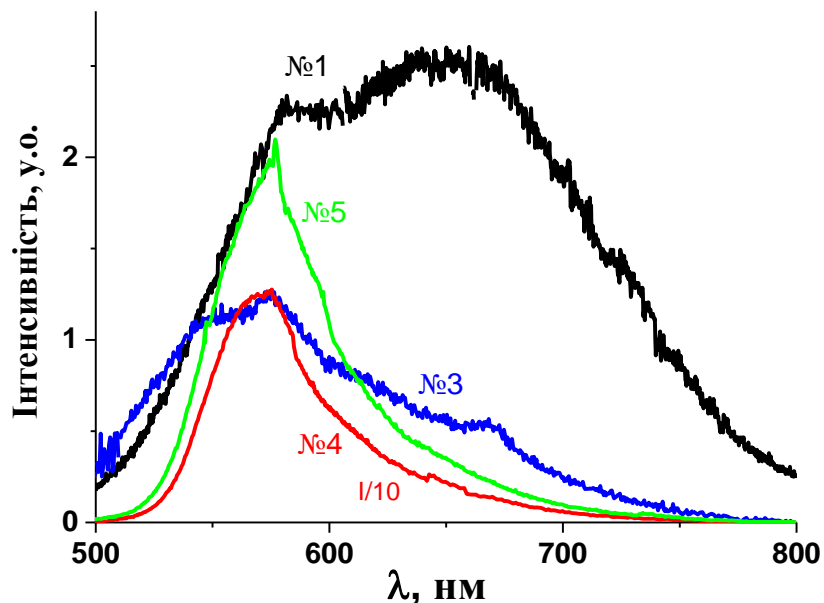


Рис. 3. Спектри люмінесценції зразків №1, №3, №4 та №5, одержаних при $\lambda_{36} = 473$ нм

Також були записані спектри люмінесценції зразків іншої серії (позначено як gen_2), змочування яких в тому ж розчині Родаміну С відбувалося після зразків, ФЛ яких наведено на попередньому рисунку.

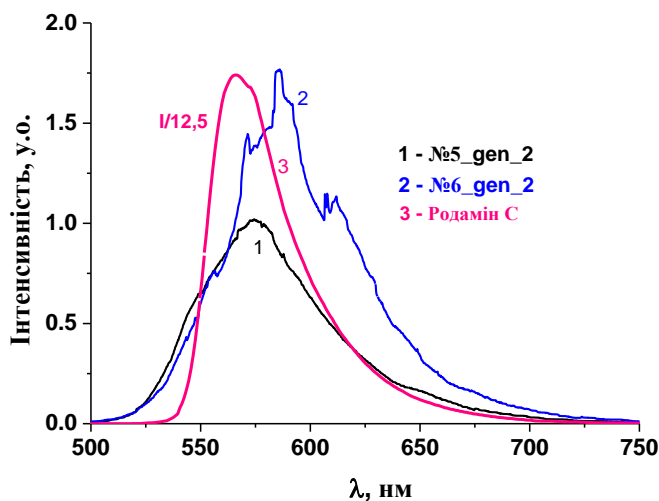


Рис. 4. Спектри люмінесценції зразків №5_gen_2 (1), №6_gen_2 (2) та розчину Родаміну С (3), одержаних при $\lambda_{36} = 473$ нм

Із рис. 4 бачимо, що найбільш інтенсивним в спектрі ФЛ БЦ другого покоління є компонент зелено-жовтого випромінювання, 525 – 625 нм, у межах якого і лежить максимуми спектральних смуг ФЛ: БЦ + Родамін С протягом 60 с ($\lambda_{\max} = \sim 575$ нм), БЦ + Родамін С протягом 300 с ($\lambda_{\max} = \sim 585$ нм) та розчину Родаміну С ($\lambda_{\max} = \sim 565$ нм) при їх збудженні з $\lambda_{36} = 473$ нм.

Одержані дані показують, що, в цілому, спектри ФЛ целюлози без Родаміну С відповідають описаним у літературі. Такі спектри завжди є складними і містять декілька смуг, що сильно перекриваються [8]. Походження люмінесценції целюлози не є до кінця з'ясованим. Зокрема, вважається, що деякі із спектральних складових ФЛ обумовлені неконтрольованими домішками, що залишаються в зразках після процедур її одержання. Наші експерименти це підтверджують. Ми бачимо, що ФЛ невідбіленої плівки (до обробки лугом) містять інтенсивні компоненти в області 600 – 800 нм. Після обробки лугом інтенсивність свічення у зазначеному діапазоні значно послаблюється.

Натомість, в зразках, що містять барвник, основним компонентом свічення є короткохвильовий: 525 – 725 нм. Тут проявляється ФЛ як самої целюлози, так і барвника: при зростанні вмісту барвника інтенсивність свічення сильно зростає, а спектри композиту та Родаміну відрізняються як за формою, так і за положенням (див. криві 2 та 3 на рис. 4).

Висновки і перспективи. У результаті застосування процедур вирощування та очищення (на основі методу мембрани Kombucha) нами було отримано в лабораторних умовах набір плівок бактеріальної наноцелюлози, як умовно «чистої», так і з доданим барвником Родамін С. Аналіз результатів застосування таких методів дослідження твердих тіл, як рентгенофазовий аналіз та люмінесценція показав перспективність їх застосування для одержання структурних, морфологічних і оптичних характеристик бактеріальної наноцелюлози. Таким чином, застосований у роботі метод одержання бактеріальної наноцелюлози дозволяє створити люмінесцентні плівки, спектр випромінювання яких можна легко модифікувати обробкою лугом NaOH або додаванням розчинів барвників.

На наступних кроках нами планується застосувати такі методи дослідження, як оптичне поглинання та розсіяння світла, Раманівське розсіяння; інфрачервоне поглинання. Буде досліджено зв'язок характеристик, одержаних зазначеними вище методами, із даними оптичної і електронної мікроскопії та даними щодо механічної твердості і міцності зразків на розрив.

Список використаних джерел

1. X. Yang, M.S. Reid, P. Olsén, L.A. Berglund. Eco-friendly cellulose nanofibrils designed by nature: effects from preserving native state. *ACS Nano*. 2020. Vol. 14. P. 724-735.
2. L. Gao, L. Chao, M. Hou [et al.] Flexible, transparent nanocellulose paper-based perovskite solar cells. *npj Flexible Electronics*. 2019. Vol. 3. P. 1-8.
3. T.H. Jovic, G. Kungwengwe, A.C. Mills, I.S. Whitaker. Plant-derived biomaterials: A review of 3D bioprinting and biomedical applications *Front. Mech. Eng.* 2019. Vol. 5. art №. 19.
4. D. Miyashiro, R. Hamano, K. Umemura. A review of applications using mixed materials of cellulose, nanocellulose and carbon nanotubes. *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10. P. 186-209.
5. S.C.M. Fernandes, L. Oliveira, C.S.R. Freire [et al.]. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chem.* 2009. Vol. 11. P. 2023-2027.
6. J. Wang, J. Tavakoli, Y. Tang. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. *Carbohydrate Polymers*. 2019. Vol. 219. P. 63-76.
7. O. Podolich, I. Zaets, O. Kukhareno [et al.]. Kombucha multimicrobial community under simulated spaceflight and martian conditions. *Astrobiology*. 2017. Vol. 17. P. 459-469.
8. M. Nediello, S. Hamamda, O. Alekseev [et al.]. [Mechanical, dielectric, and spectroscopic characteristics of "micro/nanocellulose + oxide" composites](#). *Nanoscale Res. Lett.* 2017. Vol. 12(1). art № 98.

References

1. Yang, X., Reid, M. S., Olsén, P., Berglund, L. A. (2019). Eco-friendly cellulose nanofibrils designed by nature: effects from preserving native state. *ACS nano*, 14(1), 724-735. doi: 10.1021/acsnano.9b07659
2. Gao, L., Chao, L., Hou, M., Liang, J., Chen, Y., Yu, H. D., Huang, W. (2019). Flexible, transparent nanocellulose paper-based perovskite solar cells. *npj Flexible Electronics*, 3(1), 1-8. doi: 10.1038/s41528-019-0048-2
3. Jovic, T. H., Kungwengwe, G., Mills, A. C., Whitaker, I. S. (2019). Plant-derived biomaterials: A review of 3D bioprinting and biomedical applications. *Frontiers in Mechanical Engineering*, 5, 19. doi: 10.3389/fmech.2019.00019

4. Miyashiro, D., Hamano, R., Umemura, K. (2020). A review of applications using mixed materials of cellulose, nanocellulose and carbon nanotubes. *Nanomaterials*, 10(2), 186. doi:10.3390/nano10020186
5. Fernandes, S. C., Oliveira, L., Freire, C. S., Silvestre, A. J., Neto, C. P., Gandini, A., Desbrières, J. (2009). Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chemistry*, 11(12), 2023-2029. doi: 10.1039/B919112G
6. Wang, J., Tavakoli, J., Tang, Y. (2019). Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods—A review. *Carbohydrate Polymers*, 219, 63-76. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.05.008
7. Podolich, O., Zaets, I., Kukharenko, O., Orlovska, I., Reva, O., Khirunenko, L., ..., De Vera, J. P. (2017). Kombucha multimicrobial community under simulated spaceflight and martian conditions. *Astrobiology*, 17(5), 459-469. doi: 10.1089/ast.2016.1480
8. Nediello, M., Hamamda, S., Alekseev, O., Chornii, V., Dashevskii, M., Lazarenko, M., ..., Scherbatskyi, V. (2017). Mechanical, dielectric, and spectroscopic characteristics of "micro/nanocellulose+ oxide" composites. *Nanoscale Res. Lett.*, 12(1), 98. doi: 10.1186/s11671-017-1862-x

ИЗГОТОВЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

***В. В. Бойко, В. П. Чорний, С. Г. Неделько, В. П. Щербацкий,
К. Р. Кроленко, М. А. Шегада***

Аннотация. Наноцеллюлоза является биополимером, который благодаря своим привлекательным физико-химическим свойствам интенсивно изучается как материал для применения в биомедицине, пищевой промышленности, электронике и т.п. Современные методы получения наноцеллюлозы из древесного сырья требуют применения кислот, щелочей и растворителей. Это является недостатком как с экономической, так и экологической точек зрения. Альтернативным источником наноцеллюлозы может быть биомасса, которую получают в результате микробных процессов. В этой работе представлены результаты применения метода на основе мембран *Kombucha* для изготовления бактериальной наноцеллюлозы. Структура и оптические свойства полученных пленок бактериальной наноцеллюлозы были исследованы методами рентгенофазового анализа и люминесцентной спектроскопии. Из анализа рентгеновских дифрактограмм пленок наноцеллюлозы, полученных микробным и химическим методами, установлено различие в размерах областей, на которых происходит рассеяние. Для случая бактериальной наноцеллюлозы размеры этих областей значительно больше. Перераспределение интенсивности пиков в дифрактограммах при изменении метода изготовления, вероятно, отражает разницу в соотношении вклада кристаллической и аморфной областей для образцов целлюлозы различного типа. Образцы бактериальной целлюлозы, как «чистой», так и с добавлением красителя родамина С, характеризуются интенсивной видимой фотолюминесценцией при комнатной температуре. Обработка образцов раствором NaOH приводит к уменьшению интенсивности красной полосы люминесценции целлюлозы (с максимумом при 670 нм), в то время как добавление красителя усиливает полосу в желтой спектральной области (максимум при 570

нм). Таким образом, примененный в работе метод получения бактериальной наноцеллюлозы позволяет создать люминесцентные пленки, спектр излучения которых можно легко модифицировать обработкой щелочью или добавлением растворов красителей.

Ключевые слова: бактериальная наноцеллюлоза, рентгенофазовый анализ, фотолюминесценция

PREPARATION AND STUDY OF THE BACTERIAL NANOCELLULOSE PROPERTIES

V. Boyko, V. Chornii, S. Nedilko, V. Scherbatskyi, K. Krolenko, M. Shegeda

Abstract. *Nanocellulose is a biopolymer that due to its attractive physicochemical properties has been intensively studied as a material for use in biomedicine, food industry, electronics etc. Modern chemical methods of nanocellulose production from wood raw materials require the use of acids, alkalis and solvents. This is a disadvantage from both economic and environmental points of view. The biomass that is obtained as a result of microbial processes can be regarded as an alternative source of nanocellulose. This paper deals with the application of the method based on Kombucha membranes for the preparation of bacterial nanocellulose. The structure and optical properties of the obtained films of bacterial nanocellulose have been studied by X-ray diffraction analysis and luminescence spectroscopy. The difference in the sizes of the regions on which X-ray scattering occurs was established from the analysis of diffraction patterns of nanocellulose films obtained by microbial and chemical methods. These regions are much larger in the case of bacterial nanocellulose. The redistribution of the peaks intensity in the diffraction patterns with a change in the manufacturing method reflects, probably, the difference in the ratio between crystalline and amorphous content for cellulose samples of various types. Samples of bacterial cellulose both "pure" and with the addition of the Rhodamine C dye are characterized by intense visible photoluminescence at room temperature. The treatment of samples with a NaOH solution leads to a decrease in the intensity of the red band (with a maximum at 670 nm) of cellulose luminescence, while the addition of a dye enhances the band in the yellow (maximum at 570 nm) spectral range. Thus, the method used in this work to make bacterial nanocellulose makes it possible to create luminescent films which emission spectra can be easily modified with alkalis or dyes treatment.*

Key words: *bacterial nanocellulose, X-ray diffraction analysis, photoluminescence*