

DOI: <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2019-85-10-64-69>

МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ НА РАСТЯЖЕНИЕ ГИДРАТИРОВАННЫХ ГЕЛЬ-ПЛЕНОК БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

© Дмитрий Сергеевич Голубев^{1,2}, Николай Валерьевич Бычин¹,
Вера Владимировна Будаева^{1*}, Екатерина Анатольевна Скиба^{1,2}

¹ Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук, Россия, 659322, г. Бийск, ул. Социалистическая, д. 1; e-mail: ipcet@mail.ru, budaeva@ipcet.ru

² Бийский технологический институт (филиал) «Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова», Россия, 659305, г. Бийск, ул. имени Героя Советского Союза Трофимова, д. 27.

*Статья поступила 25 марта 2019 г. Поступила после доработки 31 мая 2019 г.
Принята к публикации 24 июня 2019 г.*

Благодаря уникальным физико-химическим свойствам и биосовместимости бактериальная целлюлоза имеет множество применений. Во многих случаях использования бактериальной целлюлозы важно знать ее механические характеристики: модуль Юнга, прочность при разрыве, относительное удлинение при максимальной нагрузке. Разнообразие методик не позволяет сравнить полученные разными исследователями результаты термомеханического анализа бактериальной целлюлозы. Однако существующие стандарты определения механических характеристик не предназначены для высокогидратированных образцов и не учитывают условия их применения. Цель работы — разработка методики испытаний на растяжение гидратированных гель-пленок бактериальной целлюлозы и сравнение показателя их относительного удлинения при исследовании на воздухе и в водной среде. Образцы для исследования получали на синтетической питательной среде, в качестве продуцента использовали симбиотическую культуру *Medusomyces gisevii* Sa-12. Физико-механический анализ проводили на термомеханическом анализаторе ТМА-60. В ходе исследования подбирали такую скорость нагружения, при которой не происходило высушивание образца при испытаниях на воздухе. Микрофибрилярную структуру образцов бактериальной целлюлозы исследовали до и после растяжения методом растровой электронной микроскопии (JSM-840). Результаты исследований показали, что при различных скоростях нагружения прочность на разрыв различается в 16 раз, модуль Юнга — в 1,3 раза, а относительное удлинение при максимальной нагрузке — в 1,5 раза. Максимальное относительное удлинение гидратированной бактериальной целлюлозы в водной среде составило 51,4 %, что в 3,1 раза больше, чем при растяжении образца на воздухе. Рекомендованная скорость нагружения составила 20 г/мин. В процессе растяжения изменяется структура бактериальной целлюлозы: после испытаний волокна бактериальной целлюлозы выстраиваются вдоль вектора нагружения. Структурированная таким образом бактериальная целлюлоза приобретает анизотропные свойства.

Ключевые слова: гидратированная бактериальная целлюлоза; *Medusomyces gisevii*; механические характеристики; модуль Юнга; термомеханический анализ; относительное удлинение; растровая электронная микроскопия.

TENSILE TEST FOR HYDRATED GEL-FILMS OF BACTERIAL CELLULOSE

© Dmitrii S. Golubev^{1,2}, Nikolai V. Bychin¹, Vera V. Budaeva^{1*}, Ekaterina A. Skiba^{1,2}

¹ Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Sotsialisticheskaya 1, Biisk, 659322, Russia; *e-mail: ipcet@mail.ru, budaeva@ipcet.ru

² Biisk Technological Institute, Polzunov Altai State Technical University, ul. Imeni Geroya Sovetskogo Soyuza Trofimova, 27, Biisk, 659305, Russia.

Received March 25, 2019. Revised May 31, 2019. Accepted June 24, 2019.

Bacterial cellulose (BC) finds multiple applications due to unique physicochemical properties and biocompatibility. The mechanical characteristics of hydrated BC such as Young modulus, tear strength, and tensile elongation under maximum load are crucial in some instances. The diversity of test methods does not allow correct comparison of the results of BC thermomechanical analysis (TMA) obtained by different researchers. However, current standards for determination of the mechanical characteristics are not intended for highly hydrated samples and do not take into account conditions for their use. The goal of the study is to develop a tensile test method for hydrated gel films of bacterial cellulose and to compare their relative elongation when tested in air and in an aqueous medium. Test samples were produced in a

synthetic nutrient broth using *Medusomyces gisevii* Sa-12 symbiont. Physico-mechanical analysis was performed on a TMA-60 thermomechanical analyzer. The loading rate was selected proceeding from the requirement that the specimen will not dry out when tested in air. The microfibrillar structure of BC samples was studied before and after stretching using scanning electron microscope (JSM-840). The results showed that at different loading rate, tensile strength varies by a factor of 16, Young's modulus, and elongation at maximum load by a factor of 1.3 and 1.5, respectively. The maximum tensile elongation of hydrated BC in an aqueous medium (51.4%) is 3.1 times larger compared to that determined for the test specimen tested in air. The recommended loading rate is 20 g/min. The BC structure changes during tension: after testing the BC fibers line up along the load vector and thus structured bacterial cellulose acquires the anisotropic properties.

Keywords: hydrated bacterial cellulose; *Medusomyces gisevii*; mechanical behavior; Young modulus; thermomechanical analysis; tensile elongation; scanning electron microscopy (SEM).

Введение

Целлюлоза — самый распространенный биополимер на Земле, прирост его массы составляет около 180 млрд т в год. Этот биополимер представляет собой линейный полисахарид, состоящий из остатков β -1,4-глюкозы. Продуцируется он широким кругом организмов, включая растения, водоросли и бактерии [1, с. 3382]. Наиболее распространенным источником целлюлозы являются растения, однако они содержат такие трудно отделяемые примеси, как гемицеллюлозы и лигнин. Наибольший интерес в последние годы привлекает бактериальная целлюлоза (БЦ) благодаря своим уникальным свойствам: отсутствию нецеллюлозных компонентов, высокой кристалличности, биосовместимости, а также высоким значениям механических характеристик, обусловленных наноструктурой, которая представляет собой случайную трехмерную сеть волокон, состоящих из наноразмерных фибрилл, переплетающихся в ленты диаметром 30 – 50 нм и длиной 1 – 9 микрометров [2, с. 510].

Механические характеристики БЦ чрезвычайно важны, поскольку ее используют при изготовлении перевязочных материалов [3, с. 55], искусственных сосудов [4, с. 2], биологически разлагаемой упаковки для пищевых продуктов, электроакустических преобразователей [5, с. 1189]. Для некоторых приложений требуется не просто предельная прочность, а соответствие механических характеристик заданному диапазону. Например, при применении БЦ в качестве подложки для регенерации костной ткани необходимо соответствие ее свойств замещаемому объекту [6, с. 36], что требует высокой точности измерений. Во многих приложениях БЦ используют в качестве гель-пленок не только на воздухе, но и в водной среде (например, раневые покрытия). А механические свойства гель-пленок БЦ и высушенной БЦ принципиально отличаются, поэтому для получения требуемой точности измерений необходимо на протяжении всего исследования поддерживать пленки в гидратированном состоянии. Существующие стандарты испытания на растяжение не предназначены для

высокогидратированных образцов и не учитывают условия будущего применения. Из литературных источников следует, что разброс данных по механическим характеристикам гель-пленок БЦ велик, что, вероятно, связано не только с разницей в свойствах образцов БЦ, полученных в различных условиях, но и с отсутствием общих стандартов проведения испытаний. Отсюда возникла задача разработки методики исследования механических свойств БЦ, адаптированной под ее уникальные характеристики и условия применения.

Цель данной работы — разработка методики испытаний на растяжение высокогидратированных гель-пленок БЦ, а также сравнение показателя относительного удлинения БЦ при исследовании на воздухе и в водной среде.

Методика исследования

Реактивы и оборудование для проведения исследований. В ходе работы использовали следующие реактивы: гидроксид натрия (чда, ООО «Неохим», Россия), соляную кислоту (хч, ООО «ТК АНТ», Россия), глюкозу (ООО «Полихром», Россия), чай (ООО «ОРИМИ», Россия), дистиллированную и деионизованную воду.

Бактериальную целлюлозу культивировали в термостате ТС-1/80 СПУ (Амедис Инжиниринг, Россия). Активную кислотность измеряли при помощи иономера И-160 МИ (Измерительная техника, Россия). Испытание на растяжение проводили на термомеханическом анализаторе ТМА-60 (Shimadzu, Япония). Снимки БЦ делали при помощи растрового электронного микроскопа марки JSM-840 (JEOL, Япония). Работу выполняли на оборудовании Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

Культивирование бактериальной целлюлозы. В качестве продуцента использовали симбиотическую культуру *Medusomyces gisevii* Sa-12, известную в западной литературе как комбуча [7, с. 63]. Культивирование проводили на синтетической среде, состоящей из глюкозы (20 г/л) и экстракта черного чая (5 г/л сухого чая), при

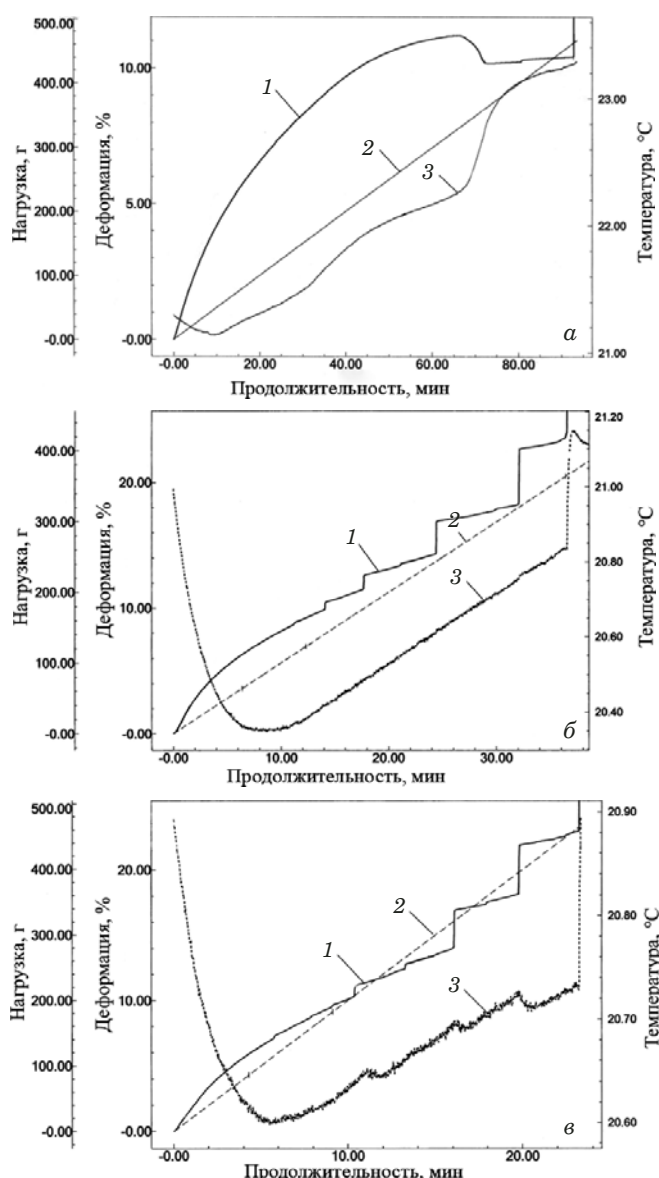


Рис. 1. Кривые деформации образца гель-пленки БЦ при скорости нагружения 5 г/мин (а), 10 г/мин (б), 20 г/мин (в)

Fig. 1. Deformation curves of the BC gel-film at a loading rate of 5 g/min (a), 10 g/min (b), 20 g/min (c)

27 °С в статических условиях на протяжении восьми суток. Использовали семисуточный инокулят, дозировка которого составляла 10 % от объема среды.

Полученные гель-пленки бактериальной целлюлозы обрабатывали 2 %-м раствором NaOH в течение суток при 20 °С, чтобы удалить иммобилизованные на пленке клетки и другие примеси, далее многократно промывали дистиллированной водой, после чего обрабатывали разбавленным раствором HCl (рН 3) для удаления красящих веществ, а затем промывали дистиллированной водой до нейтрального уровня рН [8, с. 181].

Испытание на растяжение. Образцы длиной 13 мм фиксировали в специальных зажимах и нагружали до максимальной нагрузки 400 г; температура проведения опыта — 23 ± 2 °С¹. Толщину измеряли на толщиномере в соответствии со стандартом², модифицированным для образцов гель-пленок БЦ. Модификация заключается в использовании измеряющей поверхности диаметром 26 мм и времени воздействия 120 с.

Испытания на растяжение сухих образцов БЦ (сушка на воздухе в расправленном состоянии) проводили со скоростью нагружения 5 г/мин [9, с. 110] — пятикратно.

Полученные результаты и их обсуждение

На рис. 1, а приведена кривая деформации образца гель-пленки БЦ при скорости нагружения образца 5 г/мин.

На кривой деформации образца наблюдается перегиб через 70 мин нагружения, после чего деформация с ростом нагрузки меняется незначительно. Это свидетельствует о том, что исследуемый материал переходит в качественно иное физическое состояние. На рис. 1, а показана также кривая изменения температуры исследуемого образца в процессе растяжения. Видно, что с началом эксперимента температура образца до точки перегиба изменяется незначительно, на несколько десятых градуса. При достижении предела текучести температура образца резко повышается на — 1,5 – 2 °С. Затем до нагрузки разрушения образца она не изменяется. Анализ кривых деформации и температуры и внешний вид образца после эксперимента (рис. 2, а) позволяют предположить, что в ходе опыта происходит интенсивное испарение влаги из образца, что приводит к уменьшению кинетической энергии системы образец — измерительная ячейка. При достижении точки перегиба количество влаги становится минимальным (образец высыхает), что приводит к резкому росту кинетической энергии системы образец — измерительная ячейка.

БЦ обладает высокой водопоглощающей способностью, в образцах гель-пленок массовая доля влаги 98 % [10, с. 1]. Механические характеристики образцов гель-пленок БЦ и сухих образцов значительно отличаются. Так, при скорости нагружения 5 г/мин прочность при разрыве гель-пленок составляет 11,8 МПа, относительное удлинение при максимальной нагруз-

¹ ГОСТ 14236–81. Пленки полимерные. Метод испытания на растяжение. — М.: Изд-во стандартов, 1989. — 11 с.

² ГОСТ 17035–86. Пластмассы. Методы определения толщины пленок и листов. — М.: Изд-во стандартов, 1987. — 8 с.

ке — 10,47 %; а сухого образца — 33,16 МПа и 1,5 % соответственно [9, с. 113]. Вода действует как пластификатор [11, с. 17], уменьшая число водородных связей между молекулами и, как следствие, понижает межмолекулярное взаимодействие. Отсутствие воды делает образец жестким и хрупким, поэтому прочность его повышается в 3 раза, а относительное удлинение при максимальной нагрузке снижается в 7 раз.

Таким образом, при скорости нагружения 5 г/мин получены неудовлетворительные результаты. Для исключения частичного высыхания образца в процессе проведения испытания скорости нагружения были повышены до 10 и 20 г/мин. Соответствующие кривые деформации приведены на рис. 1, а и в, а изменения внешнего вида образцов — на рис. 2, б и в.

Из рис. 1, б и в следует, что высыхания образца не происходит, поскольку перегиб на кривой деформации образца отсутствует. При достижении нагрузки разрушения образца температура системы образец — измерительная ячейка резко возрастает — в среднем на 0,3 – 0,5 °С, что связано с переходом энергии разрушения образца в кинетическую. Температура системы образец — измерительная ячейка изменяется в 3–5 раз меньше, чем при скорости растяжения образца 5 г/мин. Обезвоживание материала образца минимально.

На кривых растяжения наблюдаются «ступеньки» резкого изменения длины образца (его деформации). По-видимому, это связано с архитектурой образцов: нанотрубки БЦ представляют собой хаотично переплетенные в трехмерном пространстве ленты. При растяжении происходит структурирование волокон вдоль оси нагружения, в том числе ступенчато, затем — последовательное разрушение образца от края образца к его центру. Ступенчатое разрушение образца подтверждается характером разрушения, показанным на рис. 2, б и в. Разрушение образцов произошло в средней части, между зажимами, толщина образцов возле зажимов не измени-

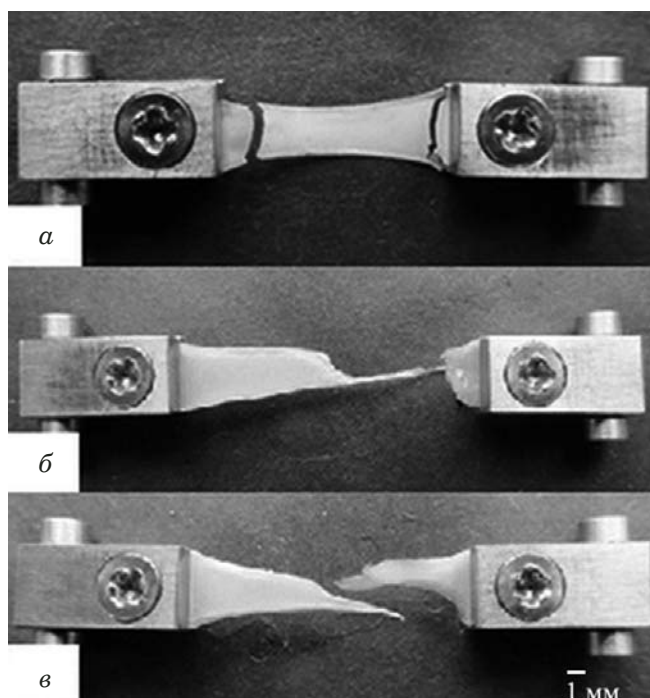


Рис. 2. Образец гель-пленки БЦ после нагружения при скорости нагружения 5 г/мин (а), 10 г/мин (б), 20 г/мин (в)

Fig. 2. BC gel-film specimen subjected to loading at different loading rates: а) 5 g/min; б) 10 g/min; в) 20 g/min

лась. После эксперимента образцы остались такими же — слабо матовыми, влажными, эластичными, полупрозрачными.

Таким образом, скорости нагружения 10 и 20 г/мин не приводят к резкому высыханию испытуемых образцов, что гарантирует адекватность определения физико-механических характеристик гидратированной целлюлозы. Усредненные значения результатов испытаний представлены в таблице. Из сравнения полученных при скоростях нагружения от 5 до 20 г/мин данных видна зависимость механических характеристик от метода проведения испытаний: прочность при разрыве отличается в 16 раз, относительное удлинение при максимальной нагрузке в

Результаты испытаний прочности гель-пленок образцов БЦ Strength test results for BC gel-films

Показатель	Скорость нагружения, г/мин		
	5	10	20
Прочность при разрыве, МПа	11,80	0,68	0,70
Условный предел текучести, МПа	0,23	0,12	0,13
Модуль Юнга, МПа	2,08	1,08	1,54
Относительное удлинение при максимальной нагрузке, %	10,47	16,50	16,10
Относительное удлинение при пределе текучести, %	11,05	11,07	8,39
Толщина образца, мм	1,3	1,3	1,3
Температурный интервал, в котором наблюдается экзотермический эффект, °С	1,5 – 2,0	0,5 – 0,6	0,1 – 0,3

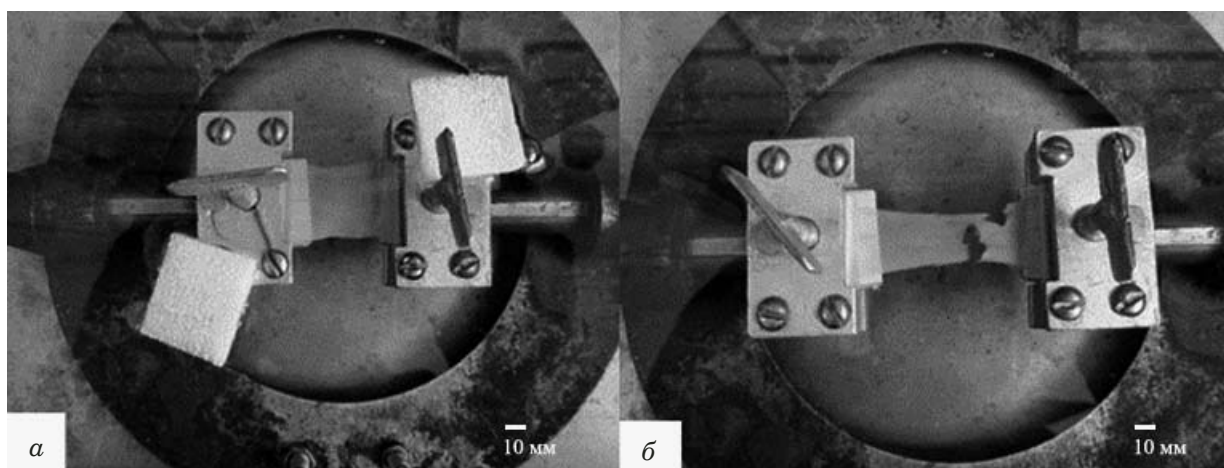


Рис. 3. Образец гель-пленки БЦ до испытания (а) и после нагружения (б)

Fig. 3. BC gel-film before testing (a) and after loading (b)

1,5 раза, модуль Юнга в 1,3 раза. Полученные значения хорошо согласуются с широким диапазоном данных, приведенных в разных литературных источниках, согласно которым предел прочности варьируется от 0,95 до 22,8 МПа [12, с. 639; 13, с. 3781]. Одной из причин такого разброса результатов, вероятно, является подсушивание образцов в результате проведения испытаний при низкой скорости нагружения.

Рекомендуется испытывать влажные образцы бактериальной целлюлозы при скорости растяжения 20 г/мин, так как при этом получены результаты, наиболее достоверно соответствующие исследуемому материалу. По итогам проделанной работы в ИПХЭТ СО РАН были оформлены и утверждены программа и методика испытаний ПМ 10018691.02100.00101.

Данная методика объективно позволяет оценить влияние параметра культивирования на прочностные характеристики получаемых образцов БЦ. Например, для образца БЦ, полученного на 10-е сутки культивирования на синтетической питательной среде с заданным уровнем pH (использовали 0,2 М ацетатный буфер, pH 4,6), прочность при разрыве составила 1,12 МПа, модуль Юнга — 3,2 МПа, относительное удлинение при максимальной нагрузке — 26 %.

Исследования максимальных значений деформации гидратированных образцов. Анализ проводили на ручном механическом приспособлении для растяжения образцов. Образец гель-пленки БЦ (размером 50 × 20 мм) фиксировали в зажимах механического приспособления. Далее конструкцию с образцом влажной БЦ помещали в ванну, наполненную дистиллированной водой (рис. 3). Образец растягивали на 250 мкм каждые 30 с.

После эксперимента образец был слабо матовым, влажным, эластичным, прозрачным.

Относительное удлинение при максимальной нагрузке образца составило 51,4 %, что более чем в 3 раза выше, чем при испытаниях на воздухе.

Исследование микрофибрилярной структуры образцов бактериальной целлюлозы до и после растяжения. Образцы для растровой электронной микроскопии предварительно обезвоживали в этаноле, лиофильно высушивали и покрывали серебром толщиной около 10 нм в течение 2 мин при 20 – 30 А.

Нативная БЦ представляет собой беспорядочную сеть микрофибрил (рис. 4, а). При деформации микрофибрилы переориентируются: на микрофотографиях, полученных методом растровой электронной микроскопии (рис. 4, б), наблюдается структурирование образцов. Волокна БЦ выстраиваются вдоль вектора нагружения исследуемого материала. Структурированная таким образом БЦ приобретает анизотропные свойства.

Выводы

Разработана методика испытаний на растяжение, учитывающая свойства гель-пленок бактериальной целлюлозы; рекомендовано проводить нагружение со скоростью 20 г/мин.

Исследовано максимальное относительное удлинение гель-пленки бактериальной целлюлозы. Установлено, что при растяжении в воде относительное удлинение при максимальной нагрузке составляет 51,4 %, что в 3,1 раза выше, чем при растяжении на воздухе.

Методом растровой электронной микроскопии показано, что после испытаний на растяжение волокна бактериальной целлюлозы выстраиваются вдоль вектора нагружения.

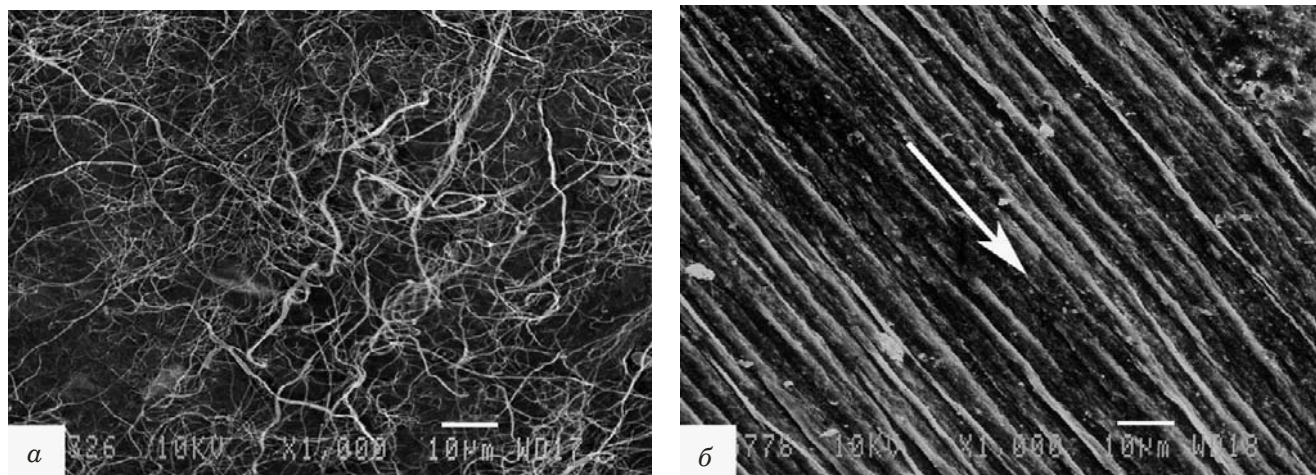


Рис. 4. РЭМ микрофибрилярной структуры БЦ, увеличение 1000: *а* — нативный образец; *б* — образец после ТМА при скорости нагружения 5 г/мин; стрелка указывает вектор нагружения образца

Fig. 4. SEM image of the microfibrillar structure of BC: *a* — native test specimen; *b* — test specimen after TMA at a loading rate of 5 g/min; the arrow indicates the direction of the loading vector

Финансирование работы

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

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Klemm D., Heublein B., Fink H.-P., Bohn A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material / *Angewandte Chemie International Edition*. 2005. Vol. 44. N 22. P. 3358 – 3393. DOI: 10.1002/anie.200460587.
2. Reiniati I., Hrymak A. N., Margaritis A. Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals / *Critical Reviews in Biotechnology*. 2016. Vol. 37. P. 510 – 524. DOI: 10.1080/07388551.2016.1189871.
3. Volova T. G., Shumilova A. A., Shidlovskiy I. P., Nikolaeva E. D., Sukovaty A. G., Vasiliev A. D., Shishatskaya E. I. Antibacterial properties of films of cellulose composites with silver nanoparticles and antibiotics / *Polymer Testing*. 2018. Vol. 65. P. 54 – 68. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2017.10.023.
4. Stumpf T. R., Yang X., Zhang J., Cao X. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering / *Materials Science and Engineering*. 2018. Vol. 82. P. 372 – 383. DOI: 10.1016/j.msec.2016.11.121.
5. Ul-Islam M., Khan T., Park J. K. Nanoreinforced bacterial cellulose-montmorillonite composites for biomedical applications / *Carbohydrate polymers*. 2012. Vol. 89. N 4. P. 1189 – 1197. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.03.093.
6. Torgbo S., Sukyai P. Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering / *Applied Materials Today*. 2018. Vol. 11. P. 34 – 49. DOI: 10.1016/j.apmt.2018.01.004.
7. Chakravorty S., Bhattacharya S., Chatzinotas A., Chakravorty W., Bhattacharya D., Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics / *International Journal of Food Microbiology*. 2016. Vol. 220. P. 63 – 72. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015.
8. Gladysheva E. K., Skiba E. A., Zolotukhin V. N., Sakovich G. V. Study of the Conditions for the Biosynthesis of Bacterial Cellulose by the Producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 / *Applied Biochemistry and Microbiology*. Pleiades Publishing. 2018. Vol. 54. N 2. P. 179 – 187. DOI: 10.1134/s0003683818020035.
9. Bychin N. V., Golubev D. S., Skiba E. A. Thermogravimetric and mechanical characteristics of bacterial nanocellulose, depending on the method of obtaining nutrient media — enzymatic hydrolysates from the fruit shells of oats / *Polzunov. Vestn.* 2018. N 3. P. 109 – 115. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2018.03.019 [in Russian].
10. Ebrahimi E., Babaeipour V., Khanchesar S. Effect of down-stream processing parameters on the mechanical properties of bacterial cellulose / *Iranian Polymer Journal*. 2016. Vol. 25. N 8. P. 739 – 746. DOI: 10.1007/s13726-016-0462-4.
11. Almeida L. R., Martins A. R., Fernandes E. M., Oliveira M. B., Correlo V. M., Pashkuleva I., Reis R. L. New biotextiles for tissue engineering: Development, characterization and in vitro cellular viability / *Acta Biomaterialia*. 2013. Vol. 9. N 9. P. 8167 – 8181. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.05.019.
12. Brown E. E., Zhang J., Laborie. Never-dried bacterial cellulose/fibrin composites: preparation, morphology and mechanical properties / *Cellulose*. 2011. Vol. 18. N 3. P. 631 – 641. DOI: 10.1007/s10570-011-9500-8.
13. Yang Q., Ma H., Dai Z., Wang J., Dong S., Shen J., Dong J. Improved thermal and mechanical properties of bacterial cellulose with the introduction of collagen / *Cellulose*. 2017 Vol. 24. N 9. P. 3777 – 3787. DOI: 10.1007/s10570-017-1366-y.