

УДК 663.1

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МИСКАНТУСА СОРТА КАМИС В ВЫСОКОЦЕННУЮ БАКТЕРИАЛЬНУЮ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗУ

Е.К. Гладышева, Е.И. Кащеева

*Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН,
Бийск, Алтайский край, Россия*

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) полимер, схожий по химической структуре с растительной целлюлозой и имеющий более высокие степени полимеризации и кристалличности, высокие влагоудерживающую способность и механическую прочность по сравнению с растительной целлюлозой. Перспективным источником целлюлозосодержащего сырья для получения БНЦ является мискантус сорта Камис. Химическая обработка и биокаталитический гидролиз позволили получить питательные среды для биосинтеза БНЦ. В результате была получена БНЦ с высоким выходом – 10,4-10,7 %, который был сопоставим с выходом на синтетической питательной среде – 11,8 %.

Ключевые слова: мискантус сорта Камис, бактериальная наноцеллюлоза, химическая обработка, биокаталитический гидролиз, симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12

BIOTECHNOLOGICAL TRANSFORMATION OF KAMIS MISCANTHUS INTO HIGH-VALUE BACTERIAL NANOCELLULOSE

E.K. Gladysheva, E.I. Kashcheeva

*Institute of Problems of Chemical-Energy Technologies, Siberian Branch of Russian Academy of
Sciences,
Biysk, Altai Territory, Russia*

Bacterial nanocellulose (BNC) is a polymer similar in chemical structure to plant cellulose and has higher degrees of polymerization and crystallinity, high water-holding capacity and mechanical strength compared to plant cellulose. A promising source of cellulose-containing raw materials for the production of BNC is miscanthus variety Kamis. Chemical treatment and biocatalytic hydrolysis made it possible to obtain nutrient media for the biosynthesis of BNC. As a result, BNC was obtained with a high yield of 10.4-10.7%, which was comparable to the yield on a synthetic nutrient medium of 11.8%.

Keywords: miscanthus variety Kamis, bacterial nanocellulose, chemical treatment, biocatalytic hydrolysis, symbiotic culture, *Medusomyces gisevii* Sa-12

Введение. Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) – представляет собой полимер с высоким потенциалом применения в различных отраслях промышленности. На молекулярном уровне БНЦ имеет химическую структуру, похожую на растительную целлюлозу, состоящую из единиц глюкозы, соединенных β -1,4-гликозидной связью. Однако, БНЦ состоит из трехмерной сети нанофибрилл, что объясняет превосходные механические свойства по сравнению с другими формами целлюлозы. БНЦ имеет высокие степени кристалличности и полимеризации, а также обладает высокой водоудерживающей способностью. Кроме того, БНЦ демонстрирует высокую термическую стабильность при воздействии высоких температур [2]. БНЦ имеет превосходную биосовместимость и низкую цитотоксичность, что делает ее весьма подходящим материалом для применения в медицине. Однако низкая экономическая целесообразность процессов производства БНЦ препятствует их промышленному внедрению [7]. Эта проблема может решиться использованием экономически эффективных питательных сред из гидролизатов целлюлозосодержащего сырья [10]. Перспективным источником целлюлозосодержащего сырья является мискантус сорта Камис, представляющий особый интерес, поскольку сочетает в себе

высокую производительность биомассы и низкое воздействие на окружающую среду [3]. Целлюлозосодержащее сырье представляет собой прочную матрицу, состоящую из целлюлозы, лигнина и гемицеллюлоз, поэтому необходимо вводить дополнительные стадии для его преобразования в питательные среды для биосинтеза БНЦ [9]. В данной работе проводилась биотехнологическая трансформация мискантуса сорта Камис в питательные среды с целью получения БНЦ.

Материалы и методы. Мискантус (*Miscanthus Giganteus*) сорта Камис выращивали в Московской области (п. Кокошкино), посадка плантации 2017 г., сбор урожая в феврале 2019 г., поставщик ООО «Мастер Брэнд» (г. Москва) [3].

Предварительную химическую обработку мискантуса проводили двумя методами:

1. Поэтапная обработка растворами 4%-ной азотной кислоты и 4%-го гидроксида натрия при температуре 90-96 °С и атмосферном давлении в течении 1-6 часов – целлюлоза (Ц) – азотнокислый способ (АС);

2. Поэтапная обработка растворами 4%-го гидроксида натрия и 4%-ой азотной кислоты при температуре 90-96 °С и атмосферном давлении в течении 1-6 часов – целлюлоза (Ц) – модифицированный щелочной способ (МЩС).

Полученные продукты отжимали на вакуум-филтре и промывали до нейтральной реакции. В сырье и полученных продуктах определяли компонентный состав классическими «мокрыми» методами [5].

Биокаталитический гидролиз полученных продуктов проводили в 0,05 М ацетатном буферном растворе (рН 4,6) согласно методике [5]. Концентрацию редуцирующих веществ (РВ) в пересчете на глюкозу в процессе гидролиза определяли спектрофотометрически на Cary-60 UV-Vis (Agilent Technologies, Санта-Клара, США) с использованием динитросалицилового реактива [8]. Для биосинтеза БНЦ в качестве продуцента использовали симбиотическую культуру *Medusomyces gisevii* Sa-12. Посевной материал вносили в количестве 10 об. %. В качестве контроля использовали синтетическую глюкозную среду, содержащую глюкозы – 20,0 г/л и экстрактивных веществ черного чая – 1,6 г/л. Биосинтез БНЦ на ферментативном гидролизате проводили в ранее выявленных оптимальных условиях [4]. Культивирование проводили в климатической камере Binder-400 (Binder, Берлин, Германия), продолжительность культивирования составила 11 суток.

После окончания культивирования гель-пленку БНЦ снимали с поверхности питательной среды и промывали от компонентов питательной среды и клеток поэтапной обработкой 2 мас. % NaOH и 0,25 мас. % HCl с последующей промывкой дистиллированной водой до нейтральной реакции. Полученные пленки БНЦ подвергали сублимационной сушке в лиофилизаторе HR7000-M (Harvest Right LLC, Солт-Лейк-Сити, США) до постоянной массы.

Выход высушенной БНЦ рассчитывали по следующей формуле:

$$W = m / (C * V * 0,9) * 100 \% \quad (1),$$

где W – выход БНЦ, %;

m – масса образца БНЦ в пересчете на абсолютно сухое вещество, г;

C – концентрация РВ в пересчете на глюкозу в питательной среде, г/л;

V – объем среды, л;

0,9 – коэффициент пересчета, обусловленный отщеплением молекулы воды при полимеризации глюкозы в целлюлозу.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 представлен компонентный состав мискантуса сорта Камис и образцов ЦАС и ЦМЩС, полученных из него.

Исследование компонентного состава мискантуса показало, что данный вид целлюлозосодержащего сырья имеет высокую массовую долю целлюлозы по Кюршнеру и пентозанов, а также низкую массовую долю лигнина и золы по сравнению с другими известными источниками целлюлозосодержащего сырья [11]. Из представленных данных видно, что химическая обработка мискантуса приводит: к повышению массовой доли целлюлозы – в 1,7-1,8 раз (96,9 % у ЦАС и 94,0 % у ЦМЩС); к снижению массовой доли пентозанов – в 4,3-9,1 раз (2,5 % и 5,3 %); к снижению массовой доли лигнина – в 35-42 раза (0,5 % и 0,6 %); к снижению массовой доли золы – в 17-28 раз (менее 0,1 %). Таким образом, данные методы обработки

показывают высокую эффективность для использования полученных продуктов в дальнейших биотехнологических процессах [5].

Таблица 1

Компонентный состав мискантуса и образцов ЦАС и ЦМЩС

	Массовая доля, %				Выход, %
	Целлюлоза	Пентозаны	Лигнин	Зола	
Сырье					
Мискантус	54,0	22,8	21,0	1,7	–
Продукты					
ЦАС	96,9	2,5	0,5	0,1	32,0
ЦМЩС	94,0	5,3	0,6	0,06	38,0

На рис. 1 представлена зависимость концентрации РВ от продолжительности биокаталитического гидролиза образцов ЦАС и ЦМЩС.

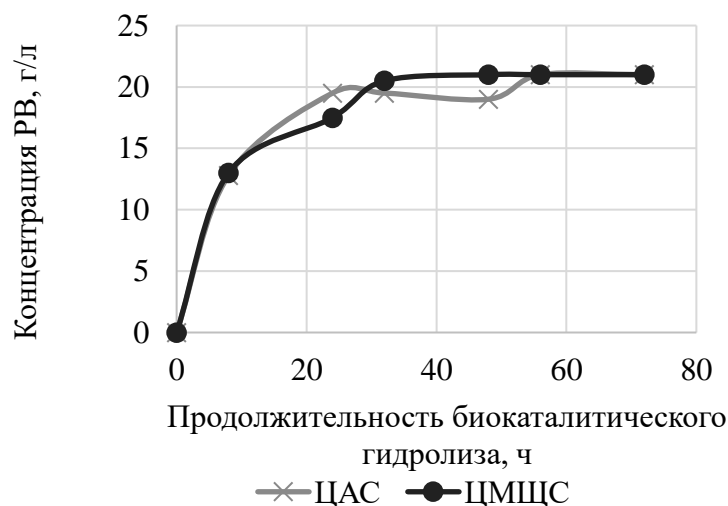


Рис. 1. Зависимость концентрации РВ от продолжительности биокаталитического гидролиза образцов ЦАС и ЦМЩС

Выявлено, что образцы ЦАС и ЦМЩС имели схожую реакционную способность к биокаталитическому гидролизу. Концентрация РВ через 72 часа составила 21,0–21,5 г/л. Выход РВ от массы субстрата для полученных продуктов варьировался от 63,0 % до 64,5 %. Полученные данные ниже, чем данные, представленные в аналогичных исследованиях для мискантуса сахароцветного [5]. Несмотря на меньшую реакционную способность к биокаталитическому гидролизу продуктов предварительной обработки мискантуса сорта Камис, полученные гидролизаты потенциально пригодны для получения питательных сред на их основе, так как концентрация РВ в них достаточна для дальнейшего синтеза БНЦ.

На рис. 2 представлены показатели биосинтеза БНЦ через 11 суток культивирования.

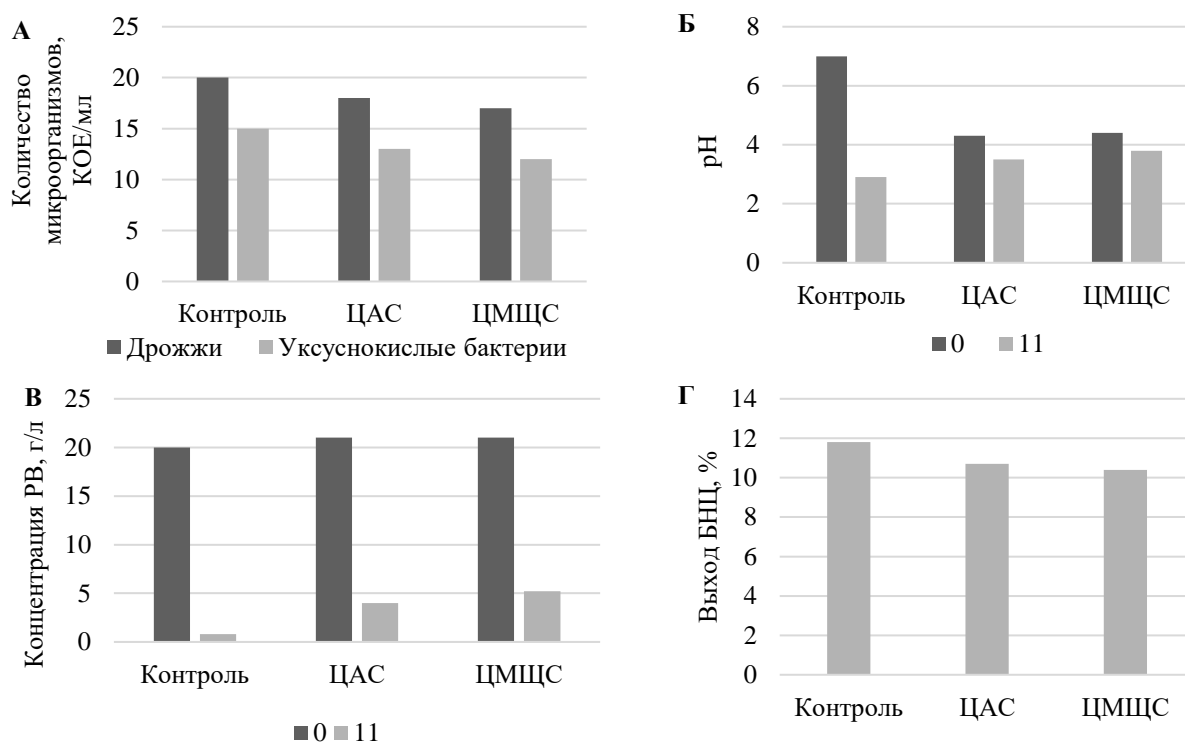


Рис. 2. Показатели биосинтеза БНЦ в контроле и на питательных средах, полученных из гидролизатов ЦАС и ЦМЩС: А) количество дрожжей и уксуснокислых бактерий; Б) pH; В) концентрация РВ; Г) выход БНЦ

Medusomyces gisevii Sa-12, представляет собой консорциум различных видов и родов дрожжей и уксуснокислых бактерий. Из литературных данных известно, что дрожжи синтезируют этанол для стимуляции роста количества уксуснокислых бактерий, а те в свою очередь синтезируют БНЦ для защиты дрожжей от влияния окружающей среды [6], из этого следует, что количество дрожжей превышает количество уксуснокислых бактерий. Следует отметить, что содержание дрожжей и уксуснокислых бактерий на разных питательных средах незначительно отличается между собой (рис. 2А). Снижение pH в процессе культивирования (рис. 2Б) происходит в результате активной жизнедеятельности уксуснокислых бактерий и образования таких метаболитов как уксусная кислота, янтарная кислота, глюконовая кислота и др. [6]. Остаточная концентрация РВ на 11 сутки культивирования была минимальной на синтетической питательной среде (контроль) и составила менее 1 г/л. Концентрация РВ на питательных средах ферментативных гидролизатов ЦАС и ЦМЩС составила 3,2 и 5,2 г/л.

Выход БНЦ полученный на питательных средах ферментативных гидролизатов ЦАС и ЦМЩС составил 10,7 и 10,4 %, соответственно. Полученный выход является высоким и сопоставим с выходом на синтетической питательной среде – 11,8 %. В работе [1] при биосинтезе БНЦ на альтернативной питательной среде, полученной из яблочных отходов, с использованием в качестве продуцента Kombucha Original Bio, выход БНЦ составил от 1 % до 4 %, что в 2,6-10,7 раз ниже, чем выход БНЦ, полученный в данном исследовании.

Заключение. Таким образом, мискантус сорта Камис является пригодным источником целлюлозосодержащего сырья для биотехнологической трансформации с целью получения БНЦ с высоким выходом 10,4-0,7 %.

Благодарности. Работа выполнена при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск) и за счет гранта Российского научного фонда № 22-13-00107, <https://rscf.ru/project/22-13-00107/>

Библиографический список

1. Amorim L.F.A., Li L., Gomes A.P., Fangueiro R., Gouveia I.C. Sustainable bacterial cellulose production by low cost feedstock: evaluation of apple and tea by-products as alternative sources of nutrients // *Cellulose*. – 2023. – Vol. 30. – P. 5589–5606.
2. Girard V. D., Chaussé J., Vermette P. Bacterial cellulose: A comprehensive review // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2024. – Vol. 141(15). – P. e55163.
3. Gismatulina Y.A., Budaeva V.V., Kortusov A.N., Kashcheyeva E.I., Gladysheva E.K., Mironova G.F., Skiba E.A., Shavyrkina N.A., Korchagina A.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Evaluation of Chemical Composition of *Miscanthus x giganteus* Raised in Different Climate Regions in Russia // *Plants*. – 2022. – No. 11. – P. 2791
4. 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*. – 2018. – No. 54(2). – P. 179-187.
5. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Pretreatments of Non-Woody Cellulosic Feedstocks for Bacterial Cellulose Synthesis // *Polymers*. – 2019. – Vol. 11, No. 10. – P. 1645.
6. Krystynowicz A., Czaja W., Wiktorowska-Jeziarska A., Gonçalves-Miśkiewicz M., Turkiewicz M., Bielecki S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose // *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. – 2002. – Vol. 29. – P. 189–195.
7. Lee J., An H.E., Lee K.H., Kim S., Park C., Kim C.B., Yoo H.Y. Identification of *Gluconacetobacter xylinus* LYP25 and application to bacterial cellulose production in biomass hydrolysate with acetic acid // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2024. – Vol. 261. – P. 129597.
8. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // *Analytical Chemistry*. – 1959. – Vol. 31, No 3. – P. 426–428.
9. Zhou Z., Liu D., Zhao X. Conversion of lignocellulose to biofuels and chemicals via sugar platform: an updated review on chemistry and mechanisms of acid hydrolysis of lignocellulose // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2021. – Vol. 146. – P. 111169.
10. Ul-Islam M., Ullah M.W., Khan S., Park J.K. Production of bacterial cellulose from alternative cheap and waste resources: A step for cost reduction with positive environmental aspects // *Korean Journal of Chemical Engineering*. – 2020. – Vol. 37. – P. 925-937.
11. Гладышева Е.К., Будаева В.В., Скиба Е.А., Кашеева Е.И., Золотухин В.Н. Отбор травянистого целлюлозосодержащего сырья, пригодного для биотехнологической переработки // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2023. – Т. 13, N 2. – С. 310-317.