

ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ ПРОДУКТА ЩЕЛОЧНОЙ ДЕЛИГНИФИКАЦИИ МИСКАНТУСА ГИГАНТСКОГО

А.А. Зенкова^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), г. Бийск, Россия.

²Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова», (БТИ АлтГТУ), г. Бийск, Россия.

Бактериальная наноцеллюлоза является уникальным материалом, не имеющим аналогов, и имеет огромный спектр применения. В данной работе в качестве предварительной химической обработки была выбрана щелочная делигнификация 4 %-ным раствором гидроксида натрия, в результате был получен продукт щелочной делигнификации мискантуса. В результате данной обработки химический состав продукта щелочной делигнификации изменился по сравнению с нативным мискантусом следующим образом: снижение содержания лигнина в 2,3 раза и пентозанов в 9,0 раз, повышение содержания целлюлозы в 1,7 раз. В результате ферментативного гидролиза продукта щелочной делигнификации мискантуса конечная концентрация редуцирующих веществ достигла 12,0 г/л, из данного гидролизата была приготовлена питательная среда (путем введения фенольных веществ черного чая и пастеризации), затем был произведен биосинтез бактериальной наноцеллюлозы. В качестве продуцента использована симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12. В качестве контроля проводили биосинтез бактериальной наноцеллюлозы на полусинтетической глюкозной питательной среде в тех же условиях. Установлено, что на среде, полученной из мискантуса, численность уксуснокислых бактерий в 4,0 раза ниже, численность дрожжей в 2,5 раза ниже, выход бактериальной наноцеллюлозы в 3,8 раза ниже, степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы в 2,9 раз ниже, чем на полусинтетической питательной среде. Перечисленные показатели свидетельствуют о биологической недоброкачественности питательной среды, полученной из мискантуса, что обусловлено, в первую очередь, способом предварительной обработки (щелочной делигнификацией) и предположительно связано с наличием остаточных ионов натрия в питательной среде. Необходимо подчеркнуть, что по результатам растровой электронной микроскопии обнаружено, что толщина микрофибрилл бактериальной наноцеллюлозы, полученной на среде из мискантуса, в 1,5 раз ниже, чем в контроле.

Ключевые слова: мискантус гигантский, щелочная делигнификация, ферментативный гидролиз, биосинтез, бактериальная наноцеллюлоза.

Введение

Бактериальная наноцеллюлоза известна как биоцеллюлоза, или наноцеллюлоза, чаще всего для её производства используют уксуснокислые бактерии они являются облигатными аэробами, не патогенны, грамотрицательны и кислотоустойчивы [8]. Бактерии синтезируют целлюлозу из низкомолекулярных соединений (сахаров или других углеводов) и выделяют ее в водную среду в виде нанофибрилл. Бактериальная наноцеллюлоза представляет собой линейную цепь гликозидных колец, связанных между собой 1–4-гликозидной связью. Степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы по разным данным колеблется в широких пределах и составляет от 1000 до 10000 в зависимости от того, в каком режиме (статическом или динамическом) образцы были получены.

Процесс сборки бактериальной наноцеллюлозы происходит следующим образом: полимерные молекулы, синтезированные внутри бактериальной клетки, проходят через ее поры и формируют уже вне клетки протофибриллы диаметром 2–4 нм, процесс сборки регулируется

размерами и формой пор. Протофибриллы затем группируются в микрофибриллы в виде лент, имеющих толщину и ширину 2-6 и 70-140 нм [3].

Себестоимость производства бактериальной наноцеллюлозы очень высока. Данную проблему сможет решить переход с использования дорогостоящей глюкозы в качестве основы питательной среды на альтернативные среды, например, на ферментативные гидролизаты дешевой растительной целлюлозы. Бактериальная наноцеллюлоза, полученная на ферментативных гидролизатах, может применяться исключительно в технических целях: для производства биосенсоров [4]. Поскольку продуценты бактериальной наноцеллюлозы очень чувствительны к составу питательных сред, важно получить из целлюлозосодержащего сырья биологически доброкачественную питательную среду. Поэтому питательную среду целесообразно получать методом ферментативного гидролиза, осуществляемым в мягких условиях. Известно, что напрямую нативное целлюлозосодержащее сырьё не ферментируется, поэтому оно должно быть предварительно обработано физическими, химическими, биологическими методами или их комбинацией.

Химическая предварительная обработка позволяет увеличить массовую долю (м.д.) целлюлозы, что приводит к повышению общей эффективности биоконверсии для получения редуцирующих веществ, а также удаляет часть кислотонерастворимого лигнина и пентозанов. Для недревесного целлюлозосодержащего сырья классическим методом предварительной химической обработки является щелочная делигнификация. В данной работе в качестве недревесного целлюлозосодержащего сырья был выбран мискантус гигантский, который представляет собой многолетнюю корневищную траву с высоким потенциалом урожайности и низкими потребностями в питательных веществах. Благодаря высокому содержанию углеводов переработка мискантуса биотехнологическим путем является перспективным направлением [7, 9].

Целью исследования является выявление особенностей процесса биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы на питательной среде, полученной на основе ферментативного гидролизата продукта щелочной делигнификации мискантуса гигантского. В качестве контроля использована полусинтетическая глюкозная питательная среда.

Оборудование и материалы

В качестве сырья использовали мискантус гигантский сорт КАМИС, предоставленный ООО «Мастер Брэнд», г. Москва, Россия. Мискантус был предварительно обработан на опытном производстве в стандартной емкости объемом 250 л 4 %-ным раствором гидроксида натрия при температуре 90-96 °С и атмосферном давлении в течение 6 ч. Полученный продукт щелочной делигнификации отжимали на вакуум-фильтре и промывали водой до нейтральной реакции. Химический состав нативного мискантуса исследовали согласно [5], а продукта щелочной делигнификации – в соответствии с [1].

Ферментативный гидролиз нативного мискантуса и его продукта щелочной делигнификации проводили по методике [6] в течение 72 ч при постоянном перемешивании, используя следующие ферментативные препараты «Целлюлюкс-А» (грибного происхождения, ООО ПО «Сиббиофарм», Россия) и, «Ультрафло-Коре» (продуцент *Trichoderma reesei*, «Novozymes A/S», Дания). Биосинтез бактериальной наноцеллюлозы проводили на полусинтетической глюкозной питательной среде (контроль) и питательной среде на основе ферментативного гидролизата продукта щелочной делигнификации мискантуса с использованием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12. Для получения питательной среды ферментативный гидролизат нагревали до температуры 100 °С, затем вносили черный чай в количестве 10 г/л, выдерживали 15-20 мин и охлаждали до температуры культивирования 27 °С. Инокулят вносили в количестве 10 об. % от объема питательной среды, культивирование производили в течение 10 суток. Методика биосинтеза многократно апробирована в условиях лаборатории и опытного производства [10, 11].

Полученные образцы бактериальной наноцеллюлозы сначала промывали до жемчужного-белого цвета, после чего высушили в лиофильной сушилке «HR7000-M» (Harvest Right, LLC, США) до постоянной массы и рассчитывали выход. Определена степень полимеризации [2], по результатам растровой электронной микроскопии рассчитана толщина нанофибрилл.

Обсуждение результатов

Химический состав нативного мискантуса гигантского и его продукта щелочной делигнификации приведен в табл. 1.

Таблица 1

Химический состав мискантуса гигантского и продукта щелочной делигнификации мискантуса гигантского

Сырьё	Массовая доля, %				
	целлюлозы по Кюршнеру	пентозанов	кислотонерастворимого лигнина	золы	ЖВФ
Мискантус	50,16	21,16	19,46	1,63	0,48
ПЩД мискантуса	84,65	2,32	8,22	3,95	0,28
Примечание: ПЩД – продукт щелочной делигнификации, ЖВФ – жировосковая фракция					

Данные таблицы позволяют сделать вывод, что содержание лигнина и пентозанов после щелочной делигнификации снизились в 2,3 раза и 9,0 раз, соответственно, содержание целлюлозы, в свою очередь, увеличилось в 1,7 раз. Повышение массовой доли золы и низкая степень делигнификации могут свидетельствовать о «переваре» в условиях опытного производства.

Результаты ферментативного гидролиза нативного мискантуса и его продукта щелочной делигнификации показали преимущество последнего субстрата. Реакционная способность нативного мискантуса к ферментативному гидролизу оказалась крайне нерезультативной, так как конечная концентрация редуцирующих веществ составила всего 0,6 г/л. Концентрация редуцирующих веществ в гидролизате продукта щелочной делигнификации составила 12,0 г/л. Из полученных данных можно сделать вывод, что щелочная делигнификация мискантуса является очень эффективной, так как повышает конечную концентрацию редуцирующих веществ в 20 раз.

Растровая электронная микроскопия нативного мискантуса, его продукта щелочной делигнификации до и после ферментативного гидролиза представлены на рис. 1.

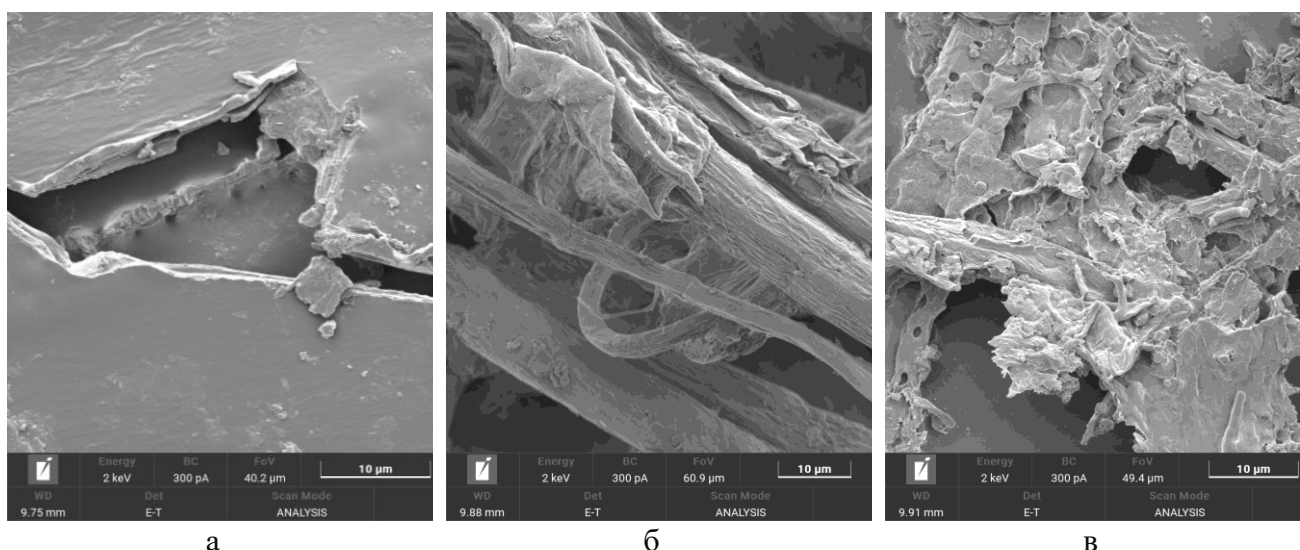


Рисунок 1 – РЭМ мискантуса гигантского сорта КАМИС

а) нативный мискантус; б) продукт щелочной делигнификации мискантуса;
в) продукт щелочной делигнификации мискантуса после ферментативного гидролиза

Представленные данные позволяют утверждать, что в процессе щелочной делигнификации разрушается природная матрица сырья (нарушается сплошность поверхности частицы, рис. 1а), освобождаются волокна в продукте щелочной делигнификации (рис. 1б), после

ферментативного гидролиза волокон в продукте щелочной делигнификации стало намного меньше (рис. 1в).

В результате биосинтеза получены образцы бактериальной наноцеллюлозы на питательной среде из ферментативного гидролизата продукта щелочной делигнификации мискантуса (начальная концентрация редуцирующих веществ 12,0 г/л) и на полусинтетической глюкозной питательной среде (начальная концентрация редуцирующих веществ 20,0 г/л). На начальном этапе в инокуляте количество дрожжей – $1,1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, уксуснокислых бактерий – $1,2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, активная кислотность – 3,0 ед. рН.

Микробиологические исследования биосинтеза позволили обнаружить следующие различия. Начальная кислотность питательной среды из ферментативного гидролизата составила 4,9 ед. рН так как в качестве основы для ферментативного гидролизата использовали ацетатный буферный раствор в отличие от контроля, в котором начальная кислотность составила 7,0 ед. рН. После 10 суток биосинтеза содержание дрожжей увеличилось до $10 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, содержание уксуснокислых бактерий возросло до $4,5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, что подтверждает симбиоз микроорганизмов в данном эксперименте. В процессе кислотность среды составила 7,5 ед. рН, а концентрация редуцирующих веществ снизилась от 12,0 до 0,9 г/л. Выход бактериальной наноцеллюлозы составил 3,1 %, степень полимеризации целлюлозы – 1020, причем толщина микрофибрилл на уровне 40 нм. Сравнение полученных данных с контролем показывает, что экспериментальная питательная среда значительно уступает контрольному опыту: микробиологические показатели значительно лучше (содержание дрожжей $25 \cdot 10^6$ КОЕ/мл и уксуснокислых бактерий $18 \cdot 10^6$ КОЕ/мл), выход бактериальной наноцеллюлозы выше в 3,8 раза и составил 11,8 %, степень полимеризации выше в 3 раза (3000). Но следует подчеркнуть, что толщина микрофибрилл в 1,5 раза больше (60 нм).

Снижение выхода бактериальной наноцеллюлозы по сравнению с контролем может быть связано с наличием в питательной среде ионов натрия. Известно, что продукты щелочной делигнификации очень трудно отмыть от остаточных ионов натрия, а ионы натрия могут быть ингибиторами процессов микробиологического синтеза.

Заключение

Щелочная делигнификация мискантуса в условиях опытно-промышленного производства обеспечила повышение содержания целлюлозы в 1,7 раз, снижение пентозанов в 9,0 раз, лигнина в 2,3 раза по сравнению с нативным сырьём. Продукт щелочной делигнификации мискантуса является более перспективным субстратом, поскольку наблюдается повышение конечной концентрации редуцирующих веществ с 0,6 г/л до 12 г/л, то есть реакционная способность к ферментативному гидролизу увеличилась в 20 раз, что свидетельствует об эффективности щелочной делигнификации мискантуса.

При биосинтезе на среде, полученной из мискантуса, через 10 суток численность уксуснокислых бактерий в 4 раза ниже, численность дрожжей в 2,5 раз ниже, выход бактериальной наноцеллюлозы в 3,8 раз ниже, степень полимеризации бактериальной наноцеллюлозы в 2,9 раз ниже, толщина микрофибрилл бактериальной наноцеллюлозы в 1,5 раз ниже, чем на полусинтетической питательной среде. Перечисленные показатели свидетельствуют о биологической недоброкачественности питательной среды, полученной из мискантуса, что обусловлено, в первую очередь, способом предварительной обработки (щелочной делигнификацией) и, предположительно, связано с наличием остаточных ионов натрия в питательной среде.

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

Библиографический список

1. Гладышева Е.К. и др. Отбор травянистого целлюлозосодержащего сырья, пригодного для биотехнологической переработки // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология, 2023. Т. 13. №. 2 (45). С. 310-317. DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-2-310-317>.

2. Зенкова А.А. Зависимость степени полимеризации бактериальной наноцеллюлозы, полученной из мискантуса гигантского сорта КАМИС, от вида химической предварительной обработки // Химия и технология растительных веществ, 2024. С. 78.
3. Скворцова З.Н. и др. Физико-химическая механика бактериальной целлюлозы // Коллоидный журнал, 2019. Т. 81. №. 4. С. 441-452.
4. Akki A. J. et al. Microbial biotechnology alchemy: Transforming bacterial cellulose into sensing disease. A review // Sensors International, 2024. 100277 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2023.100277>.
5. Gismatulina Y.A., Budaeva V.V., Kortusov A.N., Kashcheyeva E.I., Gladysheva E.K., Mironova G.F., et al. Evaluation of chemical composition of Miscanthus × giganteus raised in different climate regions in Russia. Plants, 2022. Vol. 11. № 20. 2791 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11202791>.
6. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Yu.A., Mironova G.F., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Skiba E.A., Zolotuhin V.N., Shavyrkina N.A., Kortusov A.N. Korchagina A.A. Properties and hydrolysis behavior of celluloses of different origin // Polymers, 2022. Vol. 14. P. 3899. DOI: **Ошибка! Недопустимый объект гиперссылки..**
7. Mironova G.F., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Kashcheyeva E.I., Sakovich G.V. Recent Advances in Miscanthus Macromolecule Conversion: A Brief Overview // International Journal of Molecular Sciences, 2023. Vol. 24, №. 16. 13001 p. DOI: [10.3390/ijms241613001](https://doi.org/10.3390/ijms241613001).
8. Quijano L. et al. Bacterial Cellulose Cookbook: A Systematic Review on Sustainable and Cost-Effective Substrates // Journal of Bioresources and Bioproducts, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2024.05.003>.
9. Shavyrkina N.A., Budaeva V.V., Skiba E.A., Gismatulina Y.A., Sakovich G.V. Review of Current Prospects for Using Miscanthus-Based Polymers // Polymers. 2023. Vol. 15. №. 14. 3097 p. <https://doi.org/10.3390/polym15143097>
10. Skiba E.A., Shavyrkina N.A., Skiba M.A., Mironova G.F., Budaeva V.V. Biosynthesis of Bacterial Nanocellulose from Low-Cost Cellulosic Feedstocks: Effect of Microbial Producer. International Journal of Molecular Sciences, 2023. Vol. 24. № 18. 14401 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241814401>.
11. Shavyrkina N. A. et al. Scale-up of biosynthesis process of bacterial nanocellulose // Polymers, 2021. Vol. 13. № 12. 1920 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym13121920>.