

НАЗАРОВА НАТАЛЬЯ БОРИСОВНА

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ
ШТАММОВ *KOMAGATAEIBACTER HANSENI* И *KOMAGATAEIBACTER
(GLUCONACETOBACTER) SUCROFERMENTANS* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И НОВЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
МАТЕРИАЛОВ НА ЕЕ ОСНОВЕ**

Специальность: 1.5.6 Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре биотехнологии и биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»

Научный руководитель: **Ревин Виктор Васильевич,** доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии, биоинженерии и биохимии, декан факультета биотехнологии и биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»

Официальные оппоненты: **Громовых Татьяна Ильинична,** доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой ХимБиоТех, факультета химической технологии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский политехнический университет»

Базарнова Наталья Григорьевна, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой органической химии, института химии и химико-фармацевтических технологий, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный университет»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Защита состоится 15 июня 2022 г. в 14-00 на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября, д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <https://www.fbras.ru/dissertacionnyj-sovet-po-mikrobiologii.html>

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.б.н. Хижняк Т.В.

Актуальность работы

На протяжении последних десяти лет идет поиск природных полимеров, пригодных для использования в качестве новых альтернативных биоматериалов. Одним из самых перспективных является бактериальная целлюлоза (БЦ), которая синтезируется уксуснокислыми бактериями рода *Komagataeibacter* и считается наиболее биосовместимым материалом с уникальными свойствами (Portela et al., 2019).

Обладая тонкой сетчатой структурой и высокой чистотой, БЦ обеспечивает значительные преимущества по сравнению с растительной целлюлозой. Она биосовместима, нетоксична, обладает высокой механической прочностью, высокой способностью к набуханию и высокой устойчивостью к изменениям pH (Azredo et al., 2019; Karimian, 2019).

Нанопористая сеть БЦ плюс простые методы очистки и модификации делают ее привлекательным материалом для повсеместного использования и создания на ее основе функциональных материалов, как медицинского, так и промышленного назначения (Cacicedo, 2016).

Несмотря на все преимущества, производство БЦ может оказаться довольно дорогостоящим процессом. Это связано, прежде всего, с тем, что существующие продуценты бактериальной целлюлозы не отличаются высоким уровнем синтеза этого полимера что, несомненно, приводит к высокой конечной стоимости продукта (Lee et al., 2014). Таким образом, проблема поиска высокоэффективных штаммов для производства БЦ и функциональных материалов на ее основе является весьма актуальной.

Цель и задачи исследования

Цель работы: поиск и выделение новых синтезирующих целлюлозу штаммов, исследование условий их культивирования и создание на основе бактериальной целлюлозы функциональных материалов различного назначения.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи** исследования:

1. Выделить новые штаммы продуценты бактериальной целлюлозы.
2. Провести сравнительную характеристику выделенных штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы и штаммов, имеющих в коллекции кафедры биотехнологии и биологии МГУ им. Н.П. Огарёва.
3. Выявить наиболее продуктивный штамм и использовать его для получения бактериальной целлюлозы.
4. Создать новые функциональные материалы на основе бактериальной целлюлозы.

Научная новизна и значимость работы

Впервые из индийского риса был выделен новый штамм бактерии *Komagataeibacter hansenii* В-12950.

Получены абсолютно новые биоконпозиционные материалы медицинского назначения на основе бактериальной целлюлозы, с включением в их состав дополнительных микробных полисахаридов и физиологически активных соединений.

Впервые получены композиты на основе бактериальной целлюлозы и оксида алюминия, обладающие высокой адсорбционной способностью по отношению к ионам фтора.

Практическая значимость

Выделен и депонирован штамм продуцент бактериальной целлюлозы, который может быть использован в фундаментальных и прикладных исследованиях.

Разработан способ получения аэрогелей на основе БЦ, хитозана и фузидовой кислоты, которые могут быть использованы при создании гемостатических материалов с антибактериальными свойствами.

Впервые получен эффективный адсорбент нового поколения на основе бактериальной целлюлозы, обладающий высокой селективностью по отношению к ионам фтора.

Полученные в работе результаты могут быть использованы для чтения курсов лекций по промышленной микробиологии и биотехнологии в высших учебных заведениях.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены для обсуждения на следующих конференциях, форумах, конкурсах и конгрессах: ежегодной научной конференции «Огарёвские чтения» в Национальном исследовательском Мордовском государственном университете им. Н.П. Огарёва, Саранск, 2015-2017; научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва, Саранск, 2015-2016; Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород, 2016; XV Международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии», Казань, 2016; VIII Конгрессе молодых ученых университета ИТМО, Санкт-Петербург, 2019; IV Национальном Конгрессе по регенеративной медицине, Москва, 2019.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в числе которых статья в российском научном журнале, рекомендованном ВАК, 3 статьи в иностранных научных журналах, входящих в реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science, Scopus, 2 патента РФ, монография, а также тезисы конференций.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 162 страницах текста. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы. Диссертационная работа включает 56 рисунков и 10 таблиц. Список цитируемой литературы включает 162 источника, в том числе 144 иностранных.

Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена на кафедре биотехнологии и биохимии Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарёва.

Автор выражает особую благодарность и признательность своему научному руководителю доктору биологических наук Ревину Виктору Васильевичу за внимание и помощь в подготовке диссертации. А также кандидату биологических наук Лияськиной Елене Владимировне за практическую и консультативную помощь при выполнении данной работы и всему коллективу кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии Национального исследовательского Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарёва за поддержку при выполнении диссертационного исследования.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В первой главе представлена общая характеристика бактериальной целлюлозы, ее свойств, структуры, штаммов продуцентов данного полимера, а также процесса ее получения. Рассмотрены биокомпозиты медицинского и технического назначения на основе бактериальной целлюлозы, их свойства, области применения. Проанализированы методики их получения.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Объекты исследования – бактерии *Komagataeibacter sucrofermentans* B-11267, *Komagataeibacter xylinus* B-12429, *Komagataeibacter xylinus* B-12430 и *Komagataeibacter hansenii* B-12950, целлюлоза, синтезированная данными штаммами в статических и динамических условиях, а также композиционные материалы на ее основе.

Культивирование. Выращивание бактерий осуществляли при температуре 28 °С в течение 3 сут на 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. рН 5,0 – 6,0. Режим стерилизации: 121 °С в течение 15 мин без этанола в автоклаве MLS-3781L (Sanyo, Япония).

Для получения инокулята использовали среду Хестрина-Шрамма (HS) 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 ч 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 3-5 сут.

Выращивание бактерий и накопление бактериальной целлюлозы производили на жидкой среде с мелассой, бардой и среде HS в условиях статического (без перемешивания) и динамического (в шейкере – инкубаторе) культивирования.

Методы исследования. Выделение новых штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы проводили с помощью многократных пересевов. Микроскопирование и фотографирование препаратов осуществляли с помощью биологического микроскопа для лабораторных исследований PrimoStar (CarlZeiss, Германия) при увеличении в 1000 раз. При описании морфологии колоний использовались стандартные признаки. Фотографирование колоний осуществляли с помощью микроскопа биологического стереоскопического для лабораторных исследований STEMI DV4 (CarlZeiss, Германия). Получение бактериальной целлюлозы осуществляли в статических и динамических условиях. Очистку и выделение бактериальной целлюлозы проводили в кислой и щелочной дистиллированной воде при 80 °С в течение 30 мин. Определение рН культуральной жидкости проводили потенциометрическим способом на рН-метре S220 SevenCompact (MettlerToledo, Швейцария). ИК-Фурье-спектры регистрировали на ИК-спектрометре IRPrestige-21 (Shimadzu, Япония) и рассчитывали индекс кристалличности. Степень кристалличности определяли методом рентгеноструктурного анализа на рентгеновском дифрактометре EMPYREAN (PANalytical, Нидерланды) с детектором PJXcel3D на отражение в фильтрованном излучении медного анода. Получение биокомпозитов в форме аэрогелей производили

при помощи низкотемпературного холодильника MLR-351H (SANYO, Япония) и лиофильной сушки FreeZonePlus (Labconco, США). Микрорентгеновскую томографию осуществляли на микрорентгеновском томографе Skyscan 1172 («Bruker», Бельгия). Сканирующую электронную микроскопию проводили на сканирующем электронном микроскопе HitachiTabletop SEM TM, 3000 (Hitachi High – Technology Corp., Япония).

Глава 3. Результаты и обсуждения

Выделение нового штамма продуцента бактериальной целлюлозы

Различные штаммы уксуснокислых бактерий способны синтезировать БЦ с разным выходом (от 0,5–1,2 до 10–15 г/л) из разных источников углерода (Gullo, 2017; Volova, 2018). Чтобы увеличить масштабы производства БЦ и расширить спектр применения данного полимера, необходимо иметь бактериальные штаммы, способные синтезировать значительное количество этого продукта. Поэтому большая часть недавних исследований была сосредоточена на поиске новых штаммов, продуцирующих целлюлозу, и совершенствовании методов ферментации.

Первостепенной задачей настоящего исследования являлось выделение и исследование штамма *K. hansenii* C-110 как нового продуцента БЦ.

Штамм бактерии *K. hansenii* C-110 (ВКПМ В-12950) был выделен из индийского риса на кафедре биотехнологии и биохимии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (Патент № 2681281). Штамм был идентифицирован на основании его морфологических, биохимических, молекулярно-генетических и ростовых параметров. Фенотипические свойства были изучены с использованием стандартных микробиологических методов.

До вида штамм В-12950 был идентифицирован с помощью анализа гена 16S рРНК. По результатам проведенного анализа сиквенсов варибельных участков генов, кодирующих 16S рРНК, новый штамм В-12950 наиболее близок к виду *K. hansenii* (рис. 1).

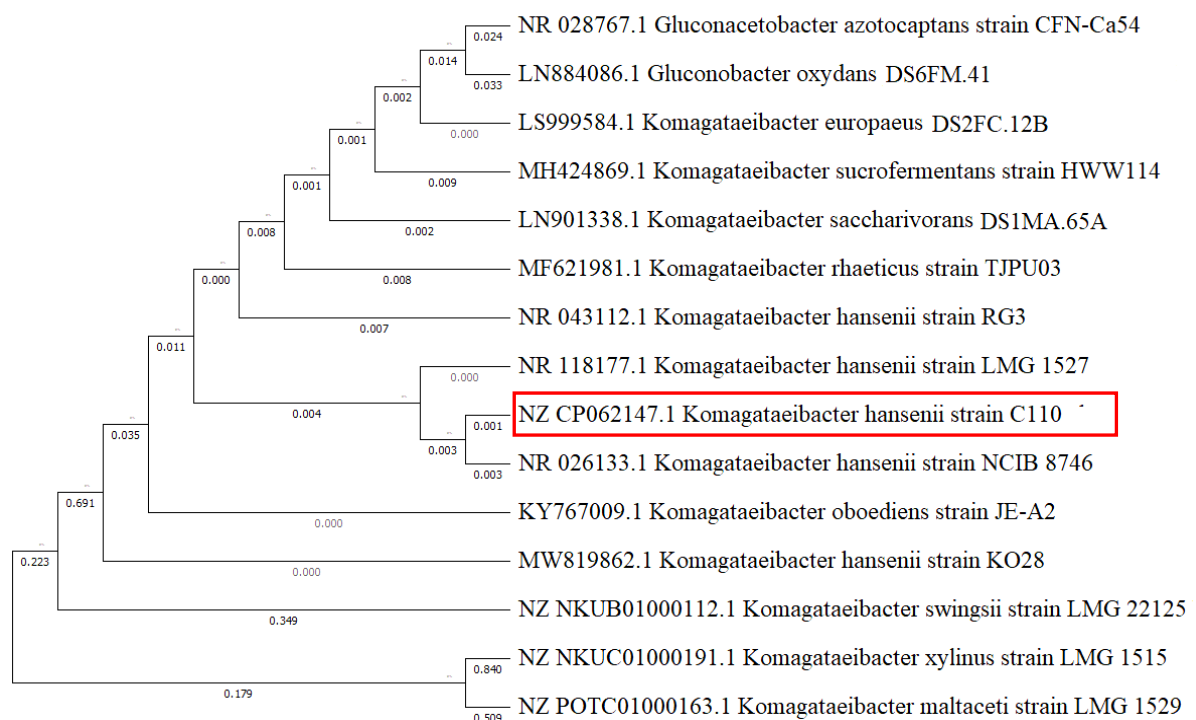


Рисунок 1. Филогенетическое древо, показывающее положение штамма *K.hansenii* В-12950 (С 110) среди типовых штаммов рода *Komagataeibacter*

Штамм характеризуется стабильностью в отношении выхода целевого продукта – бактериальной целлюлозы и способностью использовать дешевые субстраты типа мелассы, барды. Образование БЦ штаммом было исследовано на различных средах в статических и динамических условиях культивирования (рис. 2).

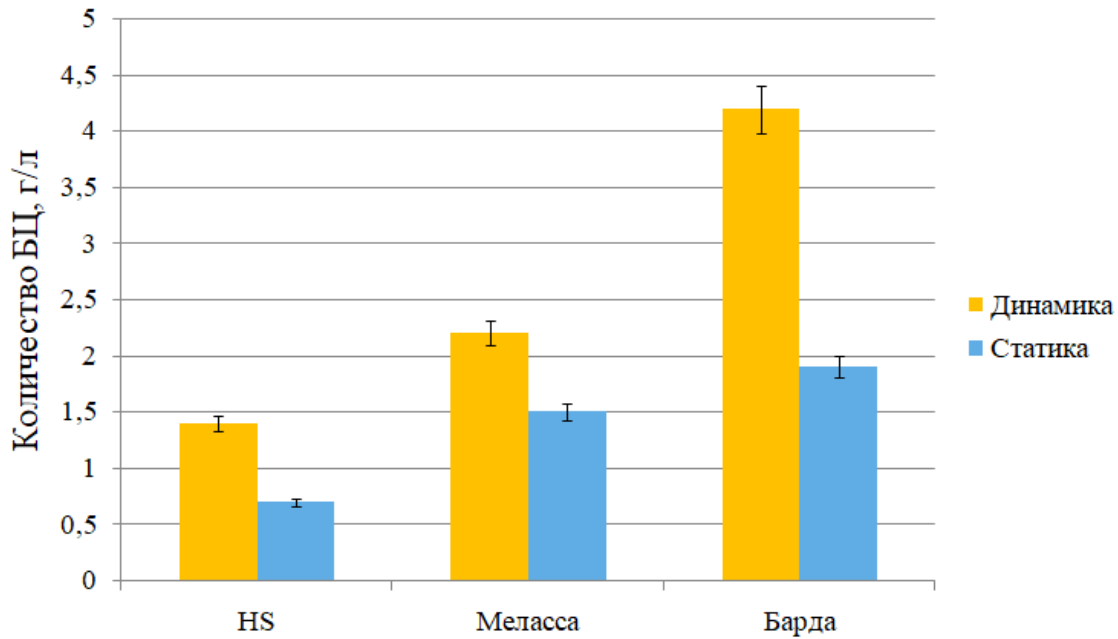


Рисунок 2. Количество БЦ, образуемое штаммом продуцентом *K. hansenii* В-12950 на различных средах на 3 сут культивирования

Согласно представленным данным, наибольшее количество бактериальной целлюлозы штамм *K. hansenii* В-12950 образует в динамических условиях культивирования на среде с бардой. Выход полимера при этом составляет $4,19 \pm 0,04$ г/л.

Одним из важных параметров БЦ является степень кристалличности, которая непосредственно влияет на свойства полимера. Степень кристалличности изучали с помощью метода рентгеноструктурного анализа (рис. 3).

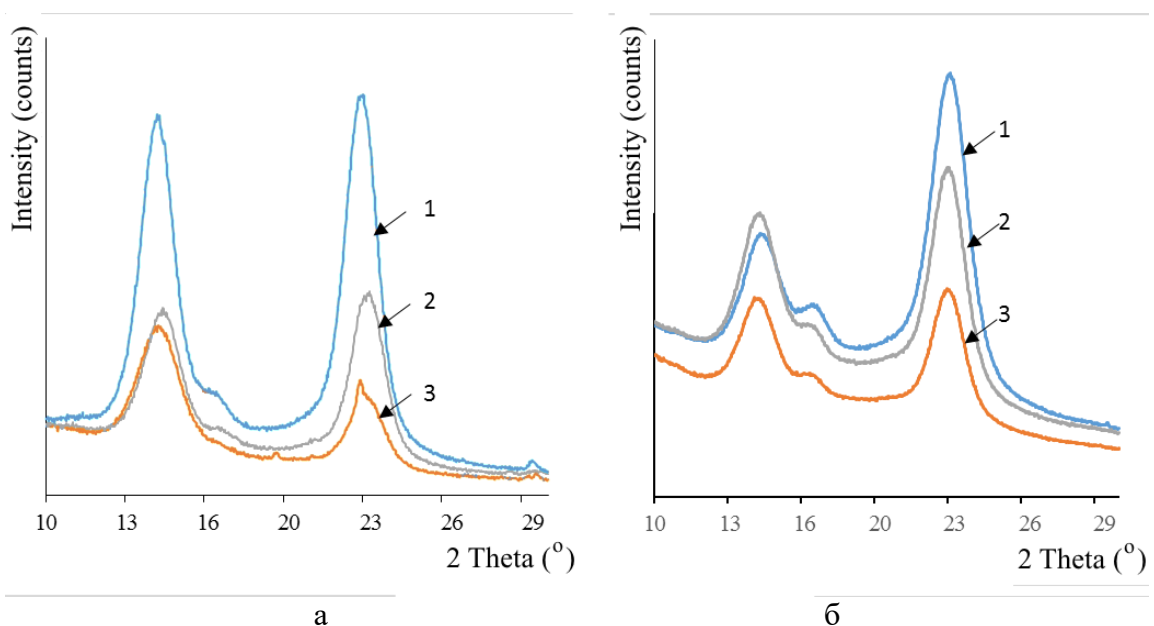


Рисунок 3. Спектры рентгеновской дифракции (режим отражения) БЦ, синтезируемой штаммом продуцентом *K. hansenii* В-12950 на различных средах: 1 – меласса; 2 – среда HS, 3 – барда в динамических (а) и в статических (б) условиях на 3 сут культивирования

По данным спектра наибольшей степенью кристалличности обладает целлюлоза, полученная на среде с мелассой как в динамических (72,40 %), так и в статических (83,30 %) условиях культивирования.

Таким образом, нами был выделен абсолютно новый штамм продуцент бактериальной целлюлозы, характеризующий стабильностью в отношении синтеза целевого продукта в количестве до 4,1 г/л и с кристалличностью до 83 %.

Сравнительная характеристика штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы

Согласно данным литературы на структуру бактериальной целлюлозы и выход полимера могут влиять несколько факторов, включая типы штаммов бактерий, продуцирующих БЦ, среды, используемые для культивирования, источники углерода и условия роста, которые могут быть изменены для получения БЦ с желаемыми свойствами. Выход полимера в основном зависит от используемых штаммов бактерий и источников углерода (Singhsa, 2018). Кроме того, определение оптимальной среды и соответствующего набора условий роста для высокого выхода полимера было бы полезно для внедрения этой технологии в промышленном масштабе.

Задачей второго этапа работы являлась оценка влияния источников углерода и условий культивирования на выход и структуру полимера, продуцируемого разными штаммами бактерий.

Проводилась сравнительная характеристика четырех штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы, имеющих в коллекции кафедры биотехнологии и биохимии: *K. xylinus* В-12429, *K. xylinus* В-12430, полученных из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов и *K. sucrofermentans* В-11267, *K. hansenii* В-12950, выделенных из чайного гриба и индийского риса, соответственно, на кафедре биотехнологии и биохимии Национального исследовательского Мордовского государственного университета имени Н.П. Огарёва.

Морфология. Клетки всех исследуемых штаммов продуцентов (рис. 4) имеют эллипсоидную или палочковидную форму, прямые или слегка изогнутые. Размер колеблется от 0,6 до 2,0 мкм. Расположение, как правило, одиночное, в парах или цепочках. Эндоспор не образуют. По Граму окрашиваются отрицательно.

Культуральные свойства. На агаризованных питательных средах исследуемые штаммы продуценты БЦ образуют гладкие, выпуклые, круглые, бежевые или непигментированные колонии (рис. 5). Диаметр колоний 1-2 мм. На агаризованной среде с мелом колонии окружены прозрачным ореолом, образующимся, вероятно, под действием уксусной кислоты.

Колонии трех штаммов продуцентов БЦ: *K. hansenii* В-12950, *K. xylinus* В-12430 и *K. sucrofermentans* В-11267 похожи между собой и имеют неправильную форму. Колонии имеют форму шара на плоской подошве, блестящие, желеобразные. В процессе роста поверхность колонии становится морщинистой, а край волнистым. По внешнему виду они напоминают «яичницу». Колонии *K. xylinus* В-12429 слизистые, гладкие. Они имеют круглую форму, небольшого размера.

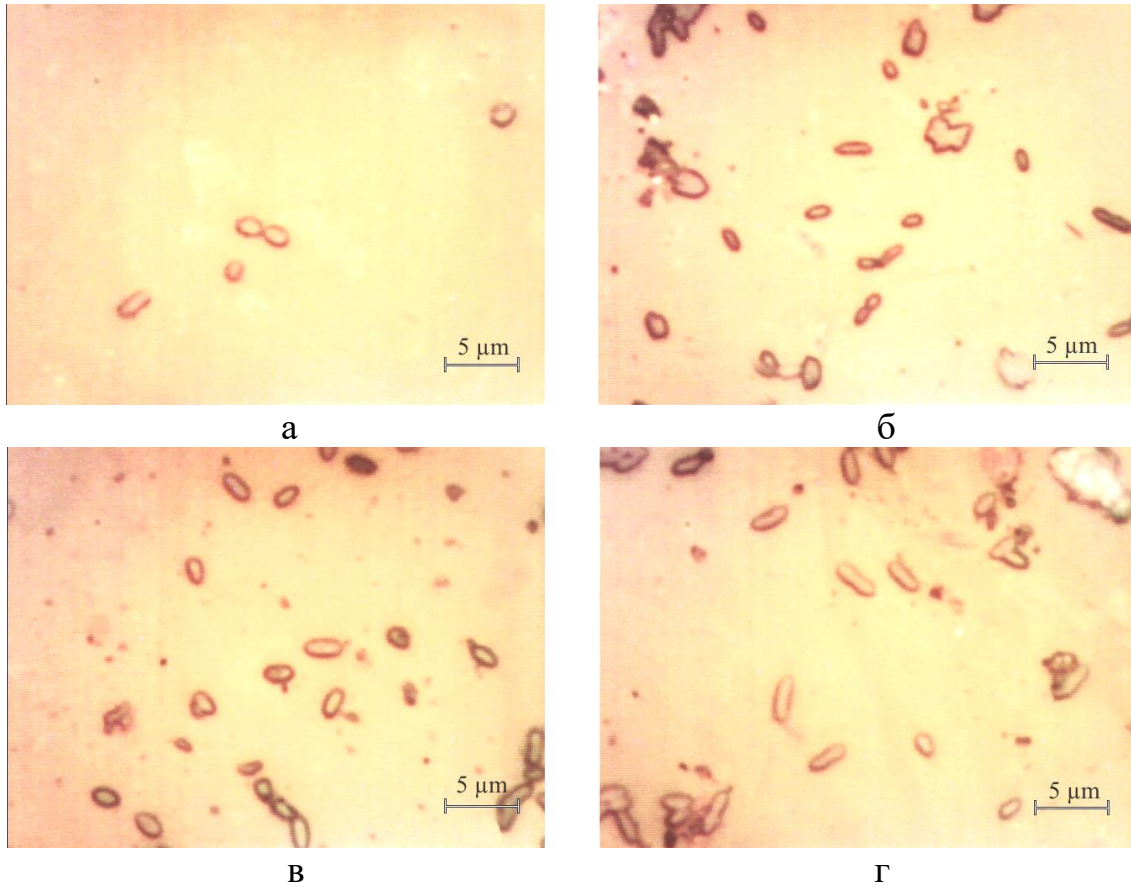


Рисунок 4. Клетки бактерий: а – *K. xylinus* B-12429, б – *K. xylinus* B-12430, в – *K. sucrofermentans* B-11267, г – *K. hansenii* B-12950

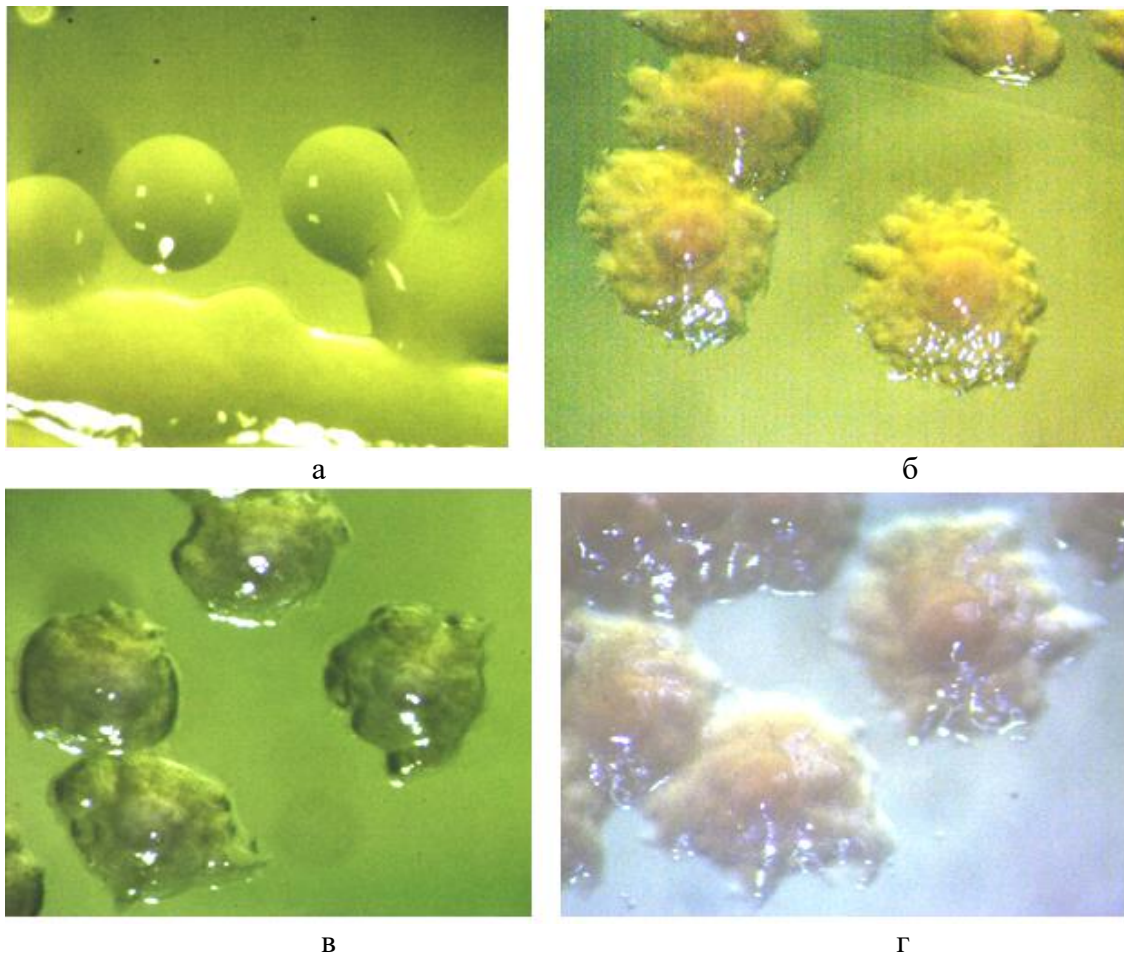


Рисунок 5. Колонии уксуснокислых бактерий: а – *K. xylinus* B-12429, б – *K. xylinus* B-12430, в – *K. sucrofermentans* B-11267, г – *K. hansenii* B-12950

Содержание жирных кислот. Исследование спектра жирных кислот (ЖК) позволяет дифференцировать и идентифицировать роды, виды и штаммы различных бактерий. В связи с этим нами был изучен жирнокислотный состав исследуемых штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы (табл. 1).

Таблица 1. Жирнокислотный состав исследуемых штаммов продуцентов БЦ

Жирная кислота	Символ	Содержание, % от суммы всех ЖК			
		Штаммы продуценты БЦ			
		<i>K.sucrofermentans</i> B-11267	<i>K.xylinus</i> B-12429	<i>K.xylinus</i> B-12430	<i>K.hansenii</i> B-12950
Декановая	C10:0	5,06	4,95	3,59	9,79
Додекановая	C12:0	1,45	5,53	0,47	6,62
Тетрадекановая	C14:0	1,25	3,01	0,69	2,27
Гексадекановая	C16:0	21,47	30,59	21,79	27,2
9-Гексадеценовая	C16:1 ω7c	4,85	3,25	4,05	2,26
Октадекановая	C18:0	1,67	8,35	2,52	1,43
11-Октадеценовая	C18:1 ω7c	64,28	40,77	30,36	50,43

Можно отметить, что у всех исследуемых штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы доминируют гексадекановая и 11-октадеценовая жирные кислоты, что подтверждает принадлежность данных микроорганизмов к группе целлюлозосинтезирующих уксуснокислых микроорганизмов (Iino et al., 2011; Revin, 2020).

Физиологические свойства. Оптимальное значение pH среды культивирования зависит от используемого штамма продуцента. В связи с этим исследовали образование БЦ на стандартной среде HS с глюкозой штаммами продуцентами *K. xylinus* B-12429, *K. xylinus* B-12430, *K. sucrofermentans* B-11267, *K. hansenii* B-12950 при различных начальных значениях pH в статических и динамических условиях культивирования (рис. 6).

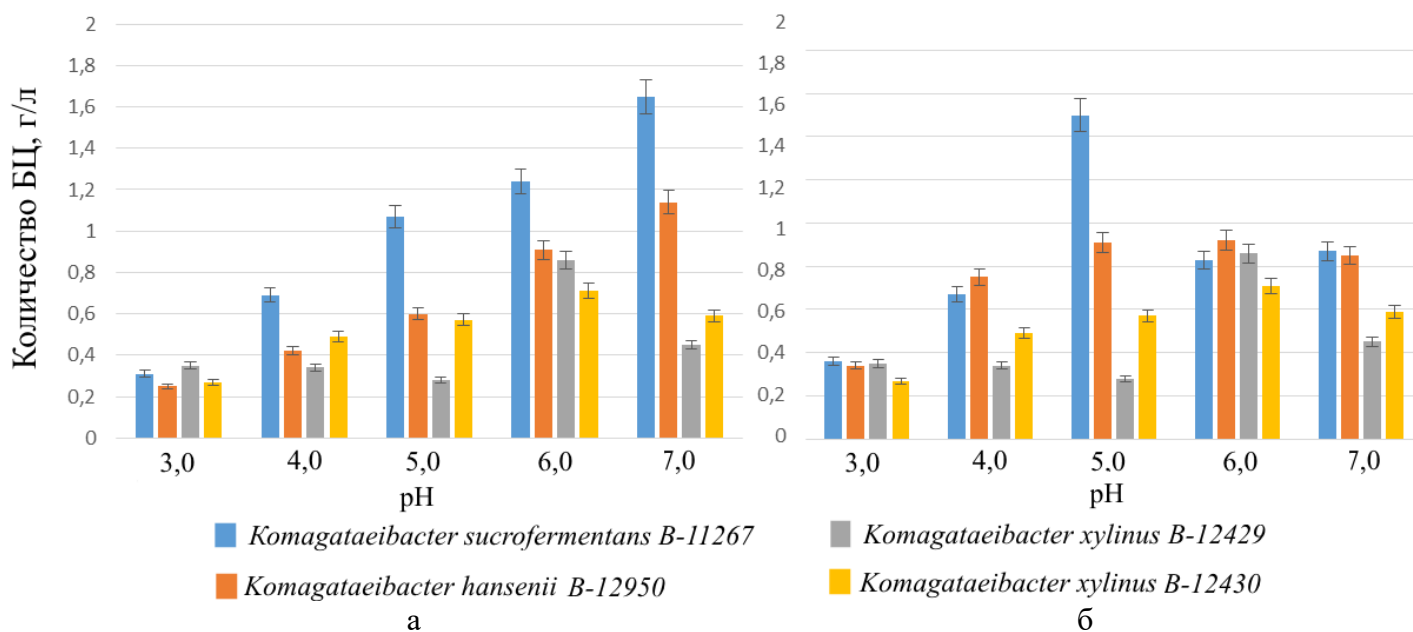


Рисунок 6. Динамика образования бактериальной целлюлозы различными штаммами на стандартной среде в динамических (а) и статических (б) условиях культивирования на 3 сут при различных начальных значениях pH

Наиболее оптимальным значением pH среды при культивировании *K. sucrofermentans* B-11267 и *K. hansenii* B-12950 в динамических условиях является pH 7,0; для штаммов *K. xylinus* B-12429 и *K. xylinus* B-12430 – pH 6,0. При культивировании в статических условиях для всех штаммов наиболее оптимальным являлся диапазон значений pH от 5,0 до 6,0 (рис. 6).

Также изучали влияние источников азота на образование и выход БЦ различными штаммами продуцентами в динамических условиях (рис. 7).

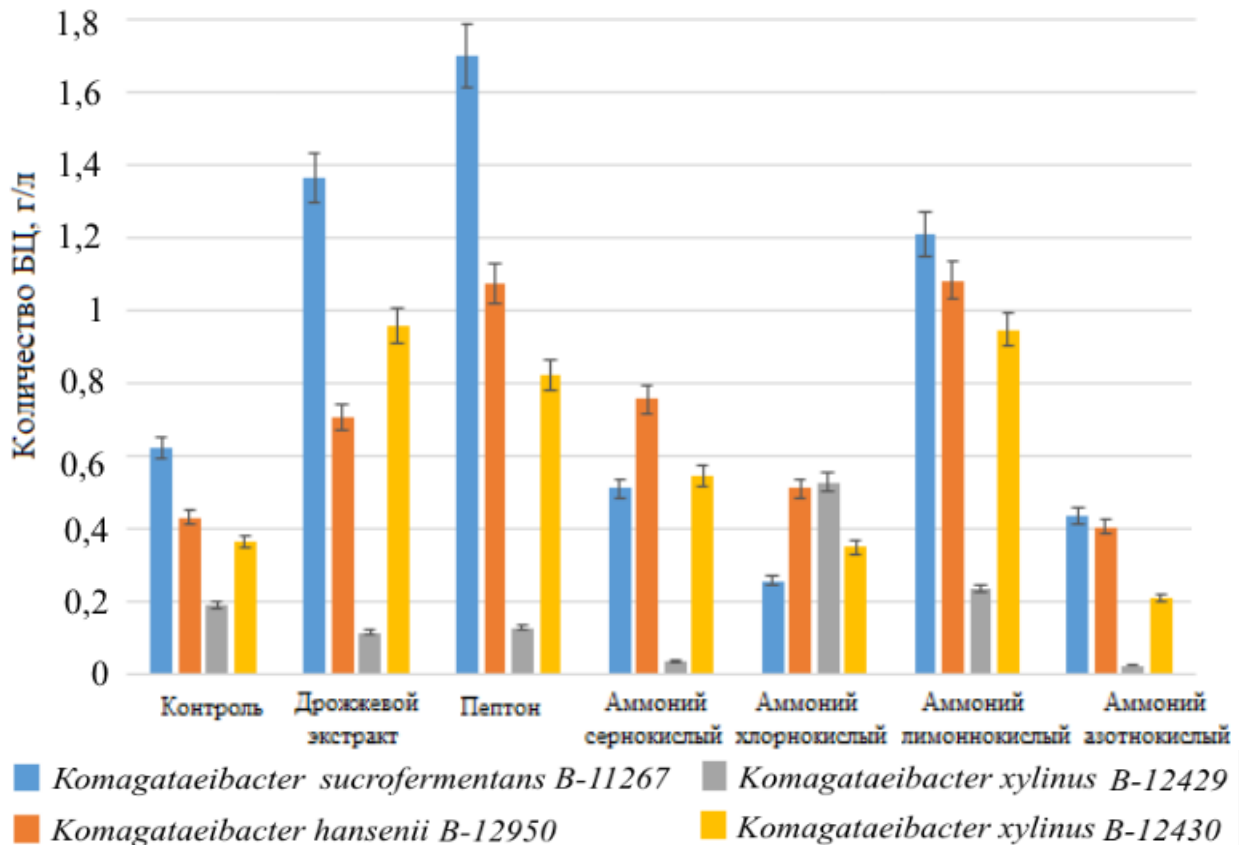


Рисунок 7. Динамика образования бактериальной целлюлозы различными штаммами продуцентами на стандартной среде NS в динамических условиях культивирования на 3 сут с различными источниками азота

Для большинства штаммов выход полимера достигал максимума при использовании в качестве источников азота дрожжевого экстракта, пептона и лимоннокислого аммония (рис. 7).

Поскольку выход и свойства бактериальной целлюлозы зависят не только от штамма продуцента, но и используемой среды культивирования, в ходе выполнения диссертационной работы проводилась оценка количества бактериальной целлюлозы, образуемой различными штаммами на различных средах в условиях динамического и статического культивирования.

Кроме того, в целях решения проблемы снижения себестоимости бактериальной целлюлозы (Богатырева, 2021) опыт проводился не только на стандартной среде NS, но также и на средах, состоящих из отходов биотехнологических производств – меласса и барда (рис. 8).

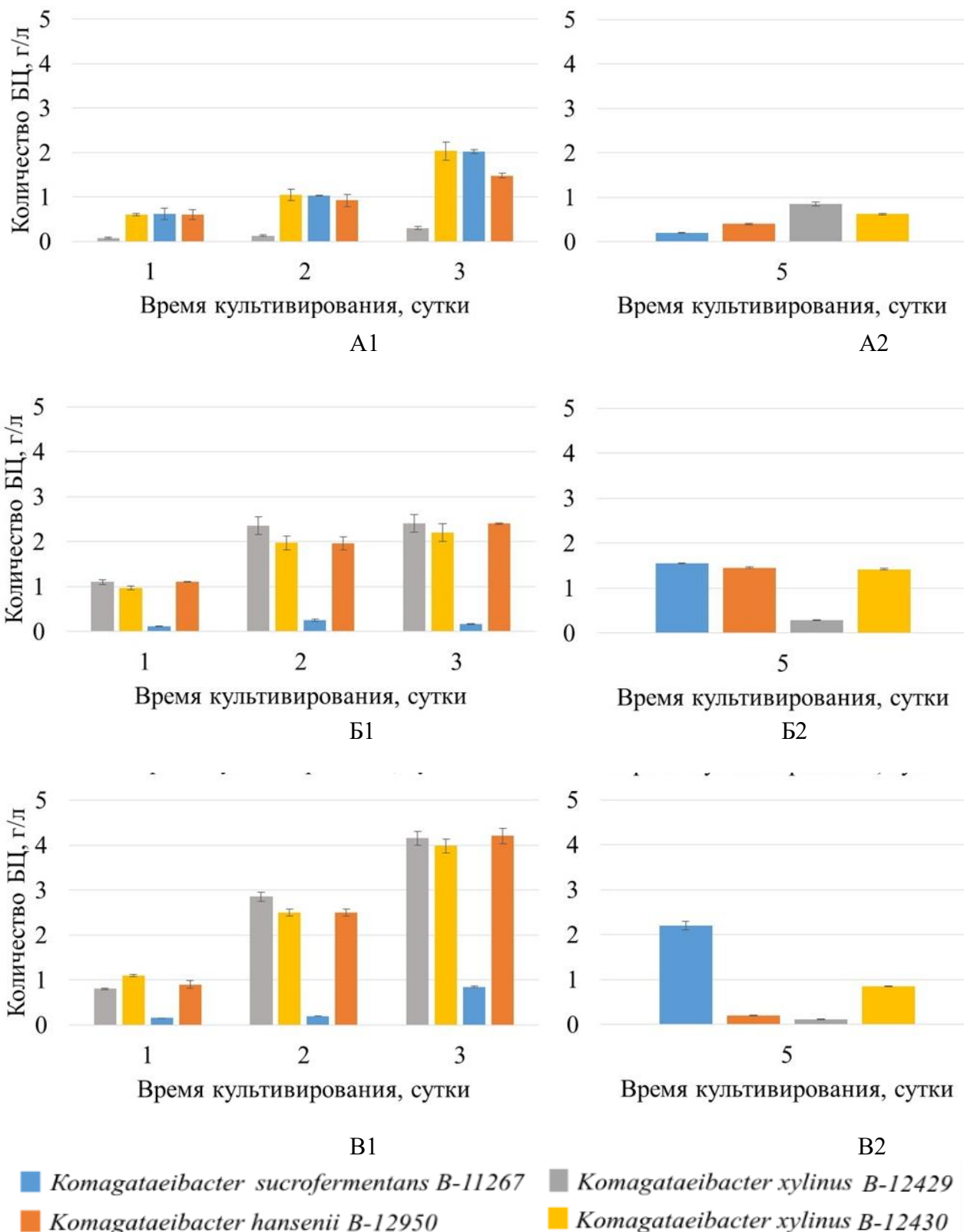


Рисунок 8. Динамика образования БЦ при культивировании штаммов продуцентов в динамических (1) и статических (2) условиях культивирования на среде NS (А), среде с мелассой (Б) и среде с бардой (В)

Согласно полученным данным максимальное количество БЦ образуется на среде с бардой. Выход полимера при этом составил для штамма *K. sucrofermentans* B-11267 – 4,34 г/л; для *K. hansenii* B-12950 – 4,19 г/л; *K. xylinus* B-12429 – 0,73 г/л; *K. xylinus* B-12430 – 4,01 г/л. Наименьший выход наблюдался при культивировании всех штаммов на стандартной среде (рис. 8).

Для изучения потребления источников углерода в ходе культивирования исследуемых штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы на различных средах использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (рис. 9, 10).

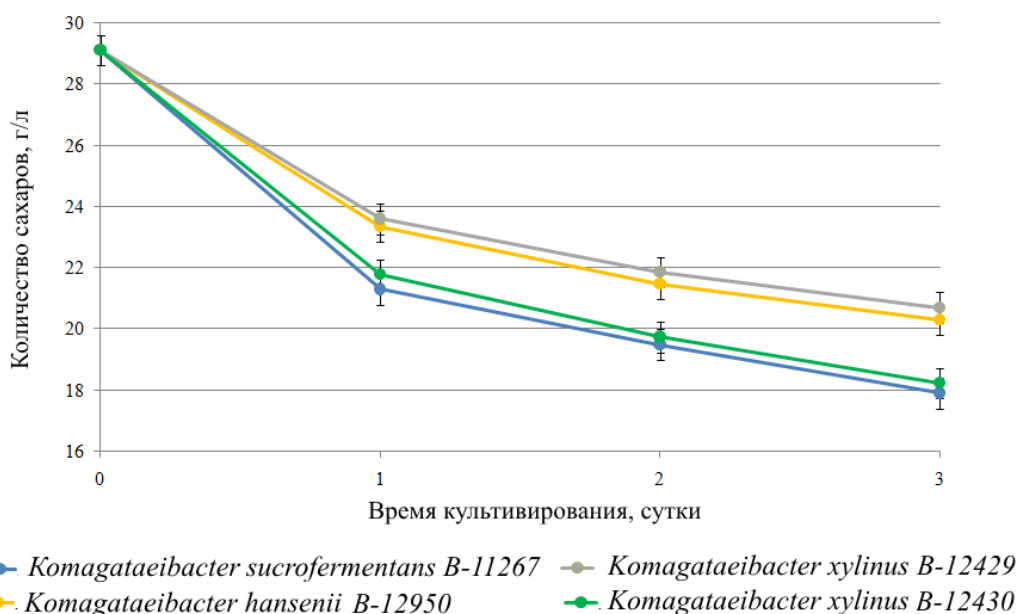


Рисунок 9. Динамика изменения общего количества сахаров при культивировании различных штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы на среде с мелассой

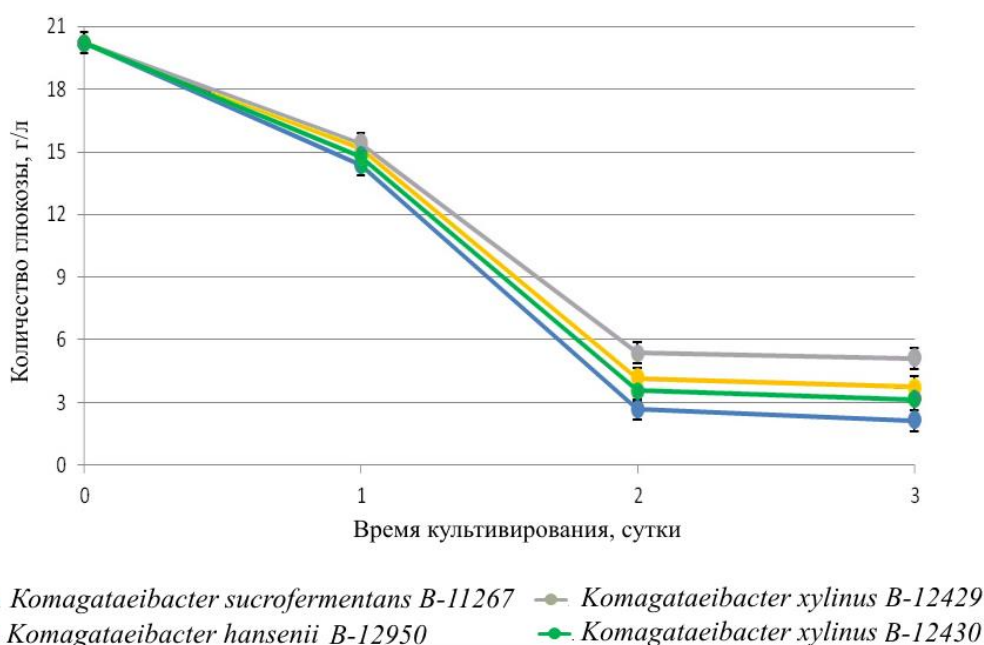


Рисунок 10. Динамика изменения количества глюкозы при культивировании различных штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы на среде HS

Можно отметить, что у всех исследуемых штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы наблюдается аналогичное друг другу снижение концентрации потребляемых сахаров в течение 3 суток культивирования как на стандартной среде, так и на среде с мелассой (рис. 9, 10).

Поскольку состав среды, условия культивирования и используемый штамм продуцент БЦ влияют не только на выход полимера, но и на его структуру, определяли индекс кристалличности, полученных образцов целлюлозы (табл. 2).

Таблица 2 – Индекс кристалличности БЦ, образуемой исследуемыми штаммами на различных средах при динамическом и статическом культивировании

Штамм продуцент	Статика	Динамика
	Индекс кристалличности	
HS		
<i>K. sacrofermentans</i> B-11267	2,75	1,55
<i>K. xylinus</i> B-12429	2,24	1,02
<i>K. xylinus</i> B-12430	3,00	1,77
<i>K. hansenii</i> B-12950	2,59	1,29
Меласса		
<i>K. sacrofermentans</i> B-11267	3,50	1,68
<i>K. xylinus</i> B-12429	2,01	1,87
<i>K. xylinus</i> B-12430	3,74	1,62
<i>K. hansenii</i> B-12950	3,80	1,74
Барда		
<i>K. sacrofermentans</i> B-11267	3,45	1,53
<i>K. xylinus</i> B-12429	2,80	1,72
<i>K. xylinus</i> B-12430	3,57	2,27
<i>K. hansenii</i> B-12950	3,46	1,33

Исходя из полученных данных стоит отметить, что индекс кристалличности образцов БЦ, полученных в статических условиях выше, чем кристалличность образцов, полученных в динамике (табл. 2). Возможно, это связано с тем, что перемешивание снижает процесс формирования центров кристаллизации. Также стоит отметить, что все штаммы, за исключением *K. xylinus* B-12429, обладают близкими значениями индекса кристалличности (табл. 2).

Таким образом, можно сделать вывод, что наибольшим выходом БЦ характеризуется штамм *K. sacrofermentans* B-11267. Кроме того, образуемый данным штаммом полимер обладает наилучшими характеристиками (по кристалличности и прочностным свойствам) в связи с чем, он является оптимальным материалом для создания биокompозитов функционального назначения.

Получение функциональных материалов на основе бактериальной целлюлозы, синтезированной штаммом *K. sacrofermentans* B-11267

Получение аэрогелей медицинского назначения на основе бактериальной целлюлозы и хитозана

Бактериальная целлюлоза имеет большие перспективы использования в качестве медицинского материала. Однако обладая рядом уникальных свойств, БЦ редко используется в чистом виде. Для придания ей дополнительных свойств, например, для увеличения прочностных характеристик или придания полимеру антимикробной активности, в состав матрицы полимера вводят дополнительные вещества, создавая на ее основе биокompозиты (Portela, 2019). Наибольший интерес в качестве дополнительно вносимого материала представляют другие биосовместимые полисахариды. Одним из перспективных полисахаридов является хитозан (Богатырева, 2021).

Хитозан – это катионный аминополисахарид природного происхождения, сополимер глюкозамина и N-ацетилглюкозамина, получение которого осуществляют

путем частичного деацетилирования хитина (Rinaudo, 2006). Согласно литературным данным хитозан обладает антибактериальными свойствами в отношении многих бактерий, микроскопических грибов, вирусов, а также в отношении некоторых штаммов дрожжей (Ahsan, 2018).

Таким образом, объединение бактериальной целлюлозы и хитозана позволит устранить недостатки этих полимеров, а также получить материал с хорошими механическими свойствами, антибактериальной активностью и способностью к биоразложению (Богатырева, 2021).

Из данных литературы известно о получении композитов на основе бактериальной целлюлозы и хитозана в виде гидрогелей (Богатырева, 2021). Нами же были получены композиты в виде аэрогелей.

Аэрогели – класс мезопористых материалов, представляющих собой гель, в котором жидкая фаза полностью замещена газообразной (Журавлев, 2018). Уникальные физические свойства аэрогелей делают их весьма востребованным материалом, как в промышленности, так и в медицине.

Первоначально нами были получены композиты на основе бактериальной целлюлозы и хитозана в форме аэрогелей двумя основными способами получения композитов: *in situ* и *ex situ*. Для выбора наиболее оптимального варианта, используемого для дальнейших исследований, было необходимо провести сравнительный анализ их физико-химических и физико-механических характеристик.

Одним из основных критериев, которые должны учитываться при создании раневого покрытия – это способность удерживать влагу, поглощать экссудаты из поврежденной ткани и ускорять грануляцию, что будет способствовать скорейшему ранозаживлению. В связи с вышеизложенным необходимо было проанализировать влагосвязывающую способность, полученных композитов.

Согласно полученным в ходе эксперимента данным все образцы композитов проявили хорошие сорбционные свойства. Стоит отметить, что наибольшего значения показатель сорбции для большинства образцов достигает максимума при трех часах выдержки. При достижении пяти часов – показатель сорбции повышается, но незначительно, а в течение 24 часов – снижается. Максимальное значение влагосвязывающей способности показали образцы с соотношением БЦ-хитозан 80:20 (3250 %) и 50:50 (3337 %), полученные методом *ex situ*.

Таким образом, нами было выбрано несколько образцов композитов, обладающих наилучшими свойствами.

Как и в работе Богатыревой А.О. (Богатырева, 2021), а также других авторов (Wahid, 2019; Wang, 2019) для изучения структуры, полученных композитов, воспользовались методом ИК-спектроскопии (рис. 11). В спектре аэрогеля хитозана пик при 3420 см^{-1} представляет валентные колебания ОН и NH групп. Аэрогель хитозана показал сходные характерные пики с чистым хитозаном, но новый пик при 1705 см^{-1} принадлежит C = O альдегидной группы глутаральдегида.

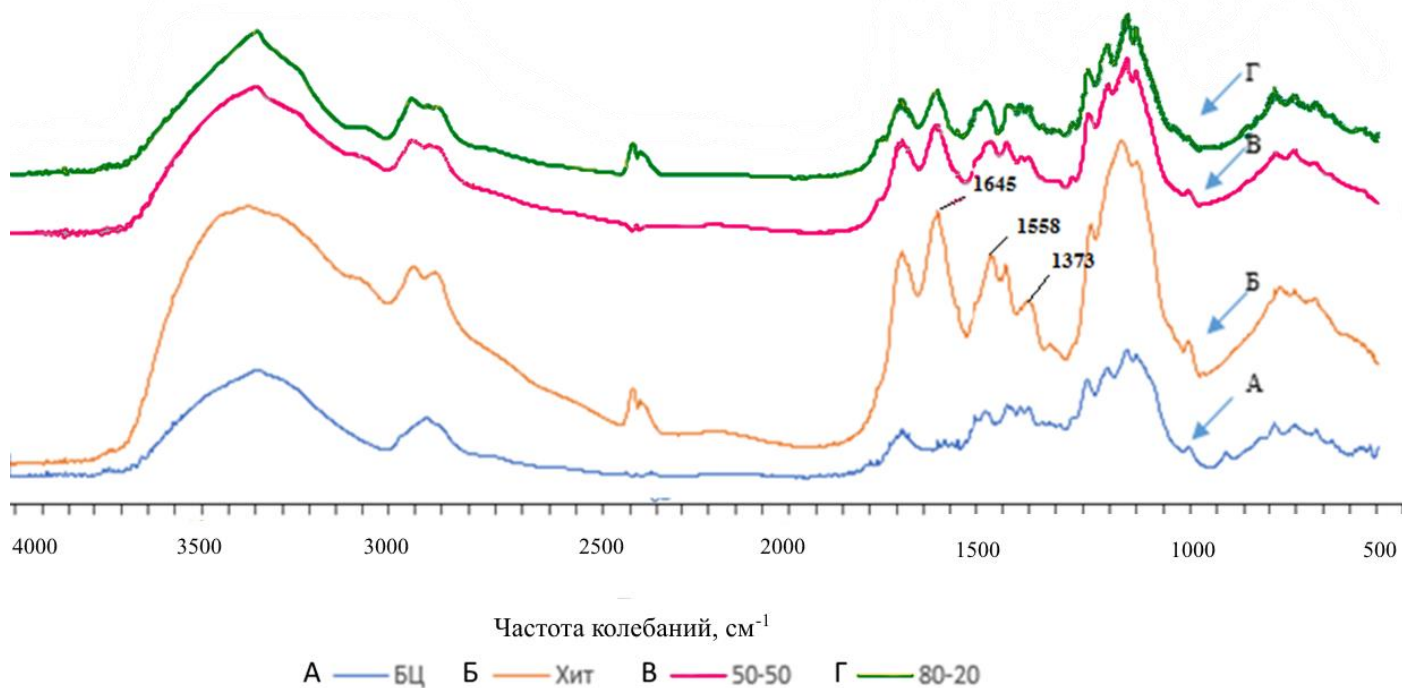


Рисунок 11. ИК-спектр аэрогелей: А – БЦ; Б – хитозан; В – биокompозит БЦ : хитозан в соотношении 50:50; Г – биокompозит БЦ : хитозан в соотношении 80:20

Другой пик при 1558 см^{-1} можно отнести к $\text{C} = \text{N}$ реакции глутаральдегида с аминогруппой хитозана с образованием имидной связи. БЦ показывает свои типичные пики, такие как $\sim 3370\text{ см}^{-1}$ для растяжения OH , $\sim 2896\text{ см}^{-1}$ для растяжения CH , 1647 см^{-1} для изгиба NOH поглощенной воды, деформация CH_2 при 1429 см^{-1} , CH_3 деформация при 1373 см^{-1} , деформация OH при 1338 см^{-1} и деформация $\text{C} - \text{O}$ при $1300\text{--}1030\text{ см}^{-1}$. ИК-спектры БЦ и хитозана довольно схожи из-за структурного сходства обоих полимеров. Спектр аэрогелей БЦ-хитозан показал характеристические пики как для хитозана, так и для БЦ. Однако смещение пиков для OH , NH_2 (аэрогель хитозана), H-O-N (БЦ) в более низкое волновое число может быть связано с образованием водородных связей в аэрогелях БЦ-хитозан. Никаких других очевидных изменений или новых пиков не наблюдалось, что указывает на то, что БЦ была физически присоединена к хитозану.

Морфологию поперечного сечения аэрогелей изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 24). Аналогично исследованиям Богатыревой А.О. (Богатырева, 2021) все исследуемые аэрогели представлены микропористыми структурами, что справедливо для всех видов лиофилизированных аэрогелей. Однако размер пор аэрогелей различный. Наименьший размер пор наблюдается у аэрогелей, полученных на основе БЦ (рис. 12А). Это может быть связано с более упорядоченной структурой полимера. При добавлении в композит хитозана размер пор увеличивается (рис. 12Б, 12В, 12Г).

Для дополнительного изучения структуры полученных композиционных материалов использовали метод компьютерной микротомографии (рис. 13). При сканировании образцов установлено, что поры присутствуют по всей толщине материала аэрогеля. Структура аэрогелей при этом является ассиметричной.

Проанализировав полученные результаты, мы пришли к выводу, что наиболее оптимальным по способу получения и физико-механическим характеристикам является композит на основе бактериальной целлюлозы и хитозана в соотношении 80:20. Данный образец был подвергнут дальнейшим модификациям и исследованиям.

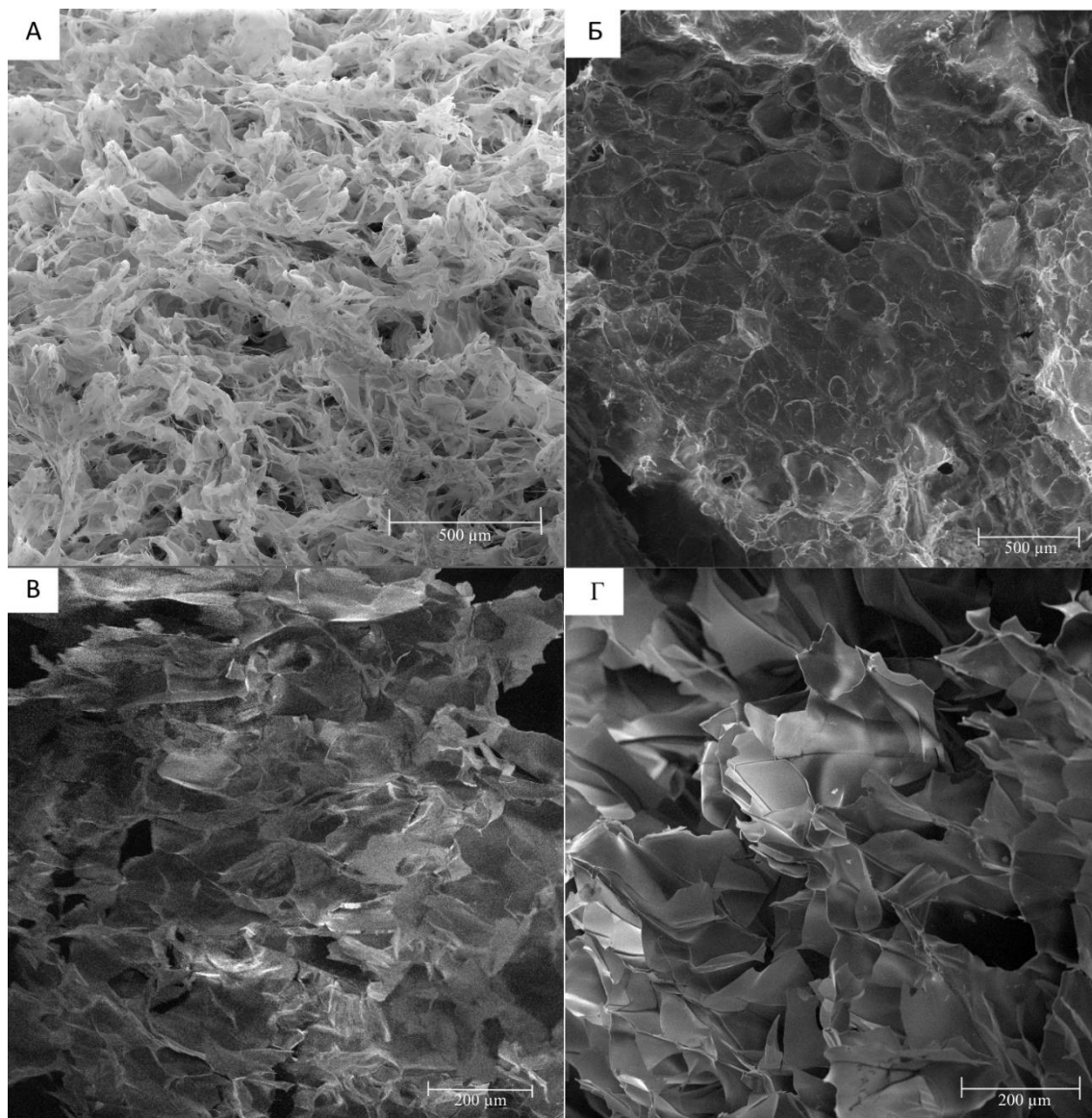


Рисунок 12. Структура аэрогеля БЦ (а), биокомпозита БЦ : хитозан в соотношении 50:50 (б), биокомпозита БЦ : хитозан в соотношении 80:20 (в), хитозана (г)

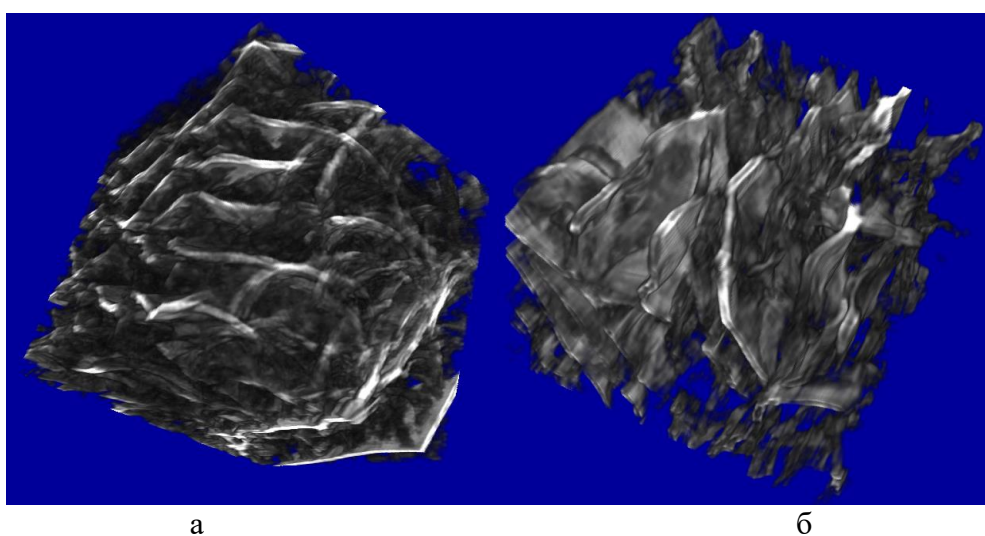


Рисунок 13. Рентгеновские микротомографии композиционных материалов:
а – аэрогель БЦ:хитозан (50:50); б – аэрогель БЦ:хитозан (80:20)

С целью придания композиту дополнительных антибактериальных свойств в его состав был внесен фузидин натрия в концентрации 200 мкг на 1 г композита.

Согласно литературным данным фузидовая кислота обладает бактериостатической, а в высоких дозах и бактерицидной активностью преимущественно против грамположительных бактерий (особенно по отношению к стафилококкам и стрептококкам) (Маслюкова, 2007).

Как и в работе Богатыревой А.О. (Богатырева, 2021) проводили определение антибактериальных свойств полученных аэрогелей. В качестве тест-микроорганизмов использовали бактерии *Staphylococcus aureus* 209P, *Bacillus licheniformis* B-7847(рис. 14).

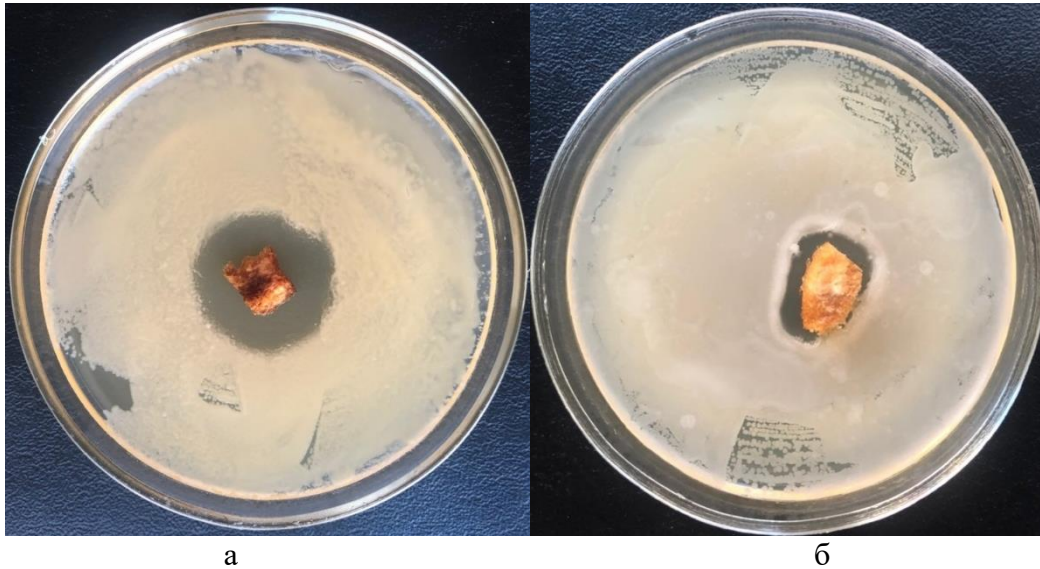


Рисунок 14. Зоны отсутствия роста тест-культуры при использовании биокомпозитов, полученных на основе аэрогелей БЦ: хитозан (80:20) и добавлении фузидовой кислоты в концентрации 200 мкг на 1 г композита: а – *S. aureus* 209 P; б – *B. licheniformis* B-7847

Согласно полученным данным зоны отсутствия роста тест-культур при использовании аэрогелей, полученных на основе бактериальной целлюлозы, хитозана и фузидовой кислоты в концентрации 200 мкг на 1 г композита составляют $26,7 \pm 2,0$ мм и $18 \pm 1,7$ мм для *Staphylococcus aureus* 209P, *Bacillus licheniformis* B-7847, соответственно, что подтверждает антибактериальную активность исследуемых образцов.

Таким образом, в ходе проведенных исследований получены биокомпозиты в форме аэрогелей на основе БЦ, хитозана и фузидовой кислоты, которые обладают высокой антибактериальной активностью по отношению к *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis* и могут быть использованы в медицине в качестве раневых покрытий.

Получение сорбентов на основе бактериальной целлюлозы с нанослоем оксида алюминия

Наличие в воде большого количества фтора является насущной проблемой во всем мире и обусловлено как геохимическими процессами, так и промышленным производством. Чрезмерное потребление фтора может вызывать различные заболевания, такие как образование пятнистой эмали на зубах и флюороз скелета. Поэтому многие страны и организации ввели строгие критерии контроля фторидов.

На сегодняшний день существует несколько методов удаления фтора, в том числе химическое осаждение, адсорбция, обратный осмос и электродиализ. В отличие

от всех остальных, методы, основанные на адсорбции, включают простые операционные процедуры, просты в реализации, требуют меньших затрат энергии и при достаточной оптимизации могут обеспечивать эффективную производительность. В настоящее время ведется поиск адсорбентов нового поколения для очистки вод от загрязняющих веществ (Mezzenga, 2019).

Обладая уникальным сочетанием свойств: высокой степенью кристалличности с большим количеством «якорных» гидроксильных групп на поверхности, бактериальная целлюлоза является перспективным материалом для создания на ее основе сорбентов для удаления из воды ионов фтора.

Первым этапом данной части работы было определение зависимости адсорбционной емкости сорбента от толщины слоя нанесенного на поверхность пленки БЦ оксида алюминия (рис. 15). Оптимум исследуемых значений составлял от 50 до 200 нм.

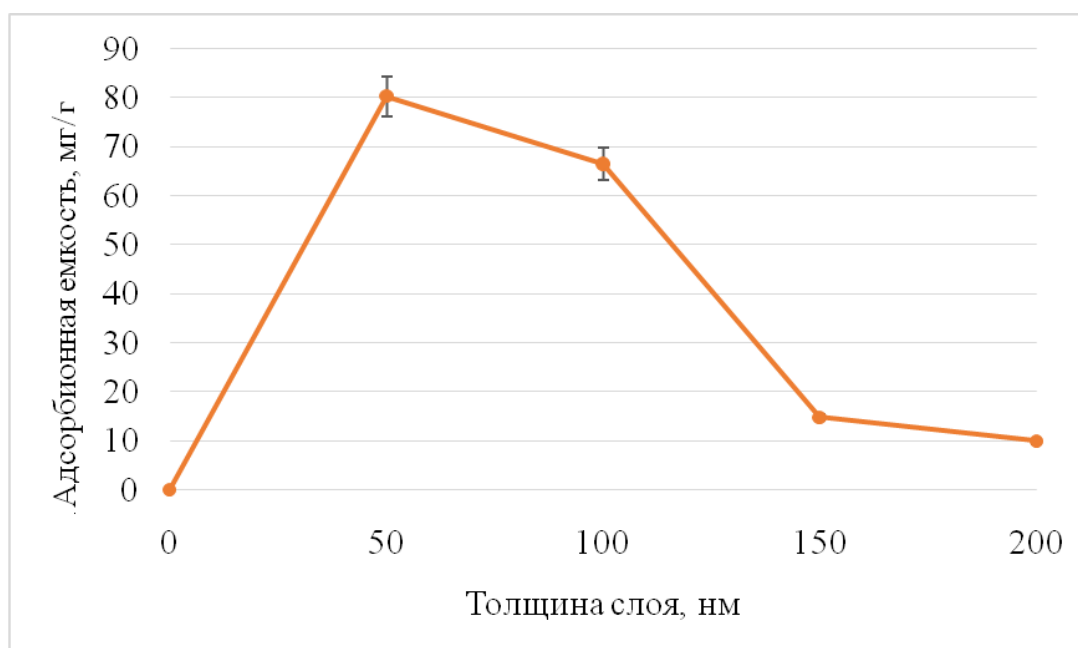


Рисунок 15. Зависимость значений адсорбционной ёмкости от толщины слоя оксида алюминия на биополимере

Результаты эксперимента показали, что максимальная адсорбционная способность была достигнута при толщине слоя оксида алюминия 50 нм (80,1 мг/г), а минимальное значение — при толщине 200 нм (9,8 мг/г) (рис. 15). Снижение адсорбционной емкости при увеличении толщины слоя оксида алюминия можно объяснить тем, что более толстый слой способствует образованию кристаллической фазы, что затрудняет связывание фторид ионов.

Таким образом, нами был получен сорбент на основе гель-пленки бактериальной целлюлозы путем нанесения на ее поверхность оксида алюминия толщиной 50 нм с помощью ALD-технологии.

Далее было необходимо исследовать влияние pH раствора на процесс адсорбции. Как видно из графика (рис. 16) при увеличении pH до 7 адсорбционная способность увеличивалась, а затем резко снижалась при pH 8 (рис. 16). Логично предположить, что повышение основности раствора приводит к возникновению конкуренции между ионами фтора и гидроксид-ионами. В сильноокислых же растворах большая часть фторид-ионов находится в недиссоциированной форме, что снижает их способность связываться с вакантными центрами сорбента.

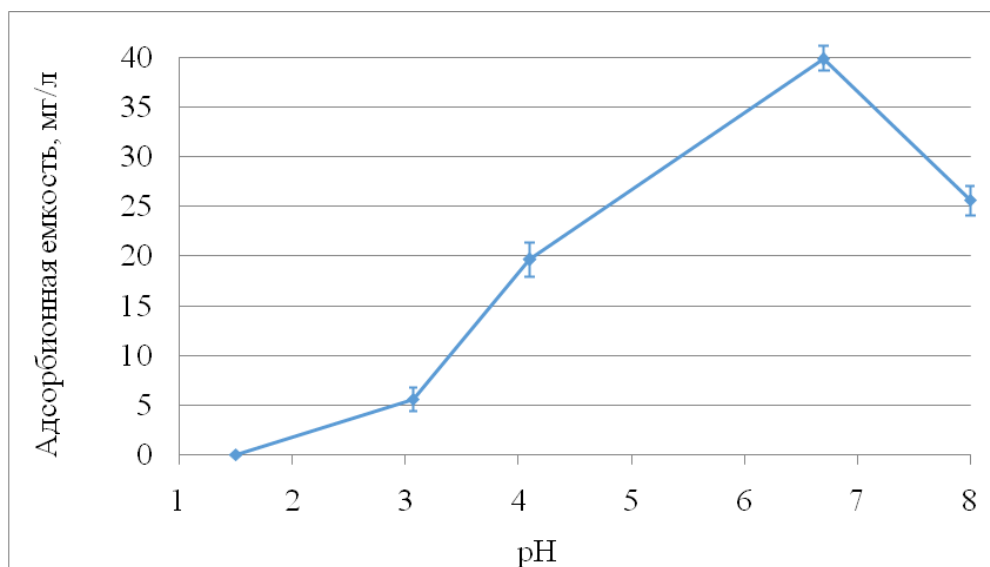


Рисунок 16. Зависимость значений адсорбционной ёмкости от pH

Исследование кинетики сорбции позволяет установить скорость достижения равновесия, максимальную рабочую емкость сорбента для раствора определенного состава, а также механизм взаимодействия ионов фтора с сорбентом при сорбции. В связи с этим нами была изучена зависимость адсорбции ионов фтора от времени контакта композита и раствора (рис. 17). Согласно полученным данным первые 60 мин адсорбционная емкость значительно увеличивается, а после часа происходит ее незначительное изменение (рис. 17). Это объясняется тем, что до 60 мин активно образуется нерастворимый в воде комплекс AlF_3 , который остается на поверхности сорбента, после достижения равновесия идет образование комплексного иона AlF_6^{3-} , переходящего в раствор.

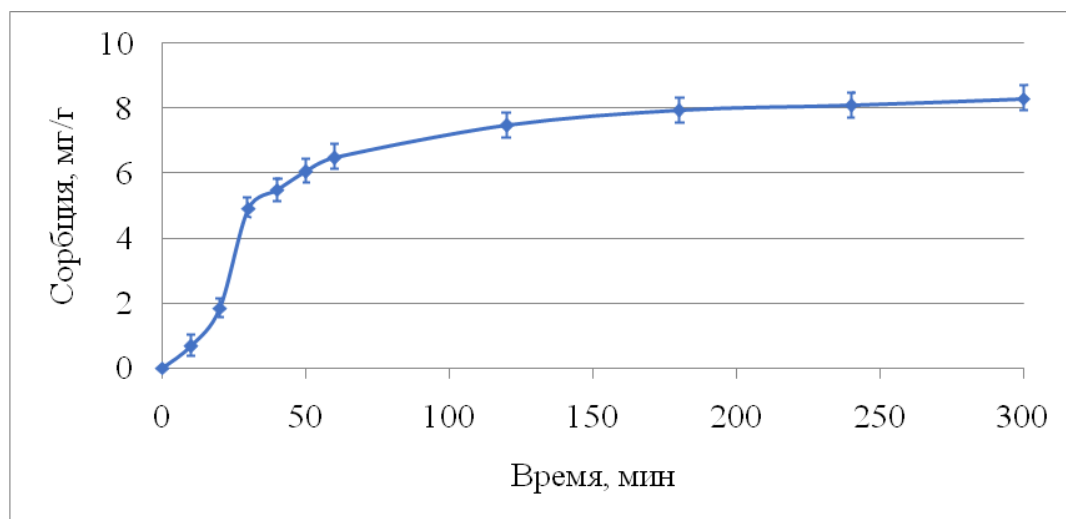


Рисунок 17. Сорбция фторид-ионов из водного раствора в зависимости от времени

Из литературы известно, что механизм сорбции ионов имеет сложный, многостадийный характер и рассмотрение всех стадий процесса трудно осуществимо, поэтому, чаще всего, при его изучении широко используются модели, основанные на принципах определения лимитирующей стадии сорбции.

Для определения лимитирующей стадии изучаемых процессов были использованы обе модели.

В случае образца имеющего 100 нм слой Al_2O_3 (рис. 18, кривая 1) только на начальном участке зависимости $-\ln(1-F)$ от t наблюдается прямолинейный характер функции $-\ln(1-F)=f(t)$, что соответствует протеканию процесса по внешнедиффузионному механизму.

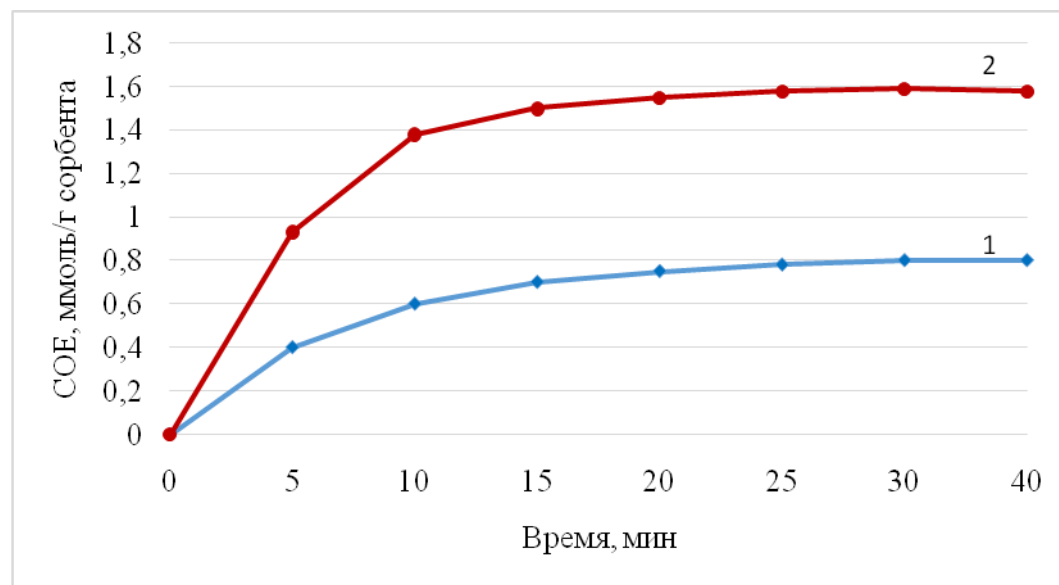


Рисунок 18. Изотермы сорбции фторид-ионов образцами 1 (100 нм) и 2 (50 нм)

В дальнейшем прямолинейность кинетической кривой нарушается, что свидетельствует о смене механизма сорбции на внутريدиффузионный механизм. Таким образом, полученная закономерность показывает классический смешанно-диффузионный механизм сорбции, то есть диффузия сорбата из раствора к поверхности сорбента через пленку и диффузию сорбата в зерне сорбента. Как показано на рис. 18 (кривая 2), у образца имеющего 50 нм слой Al_2O_3 практически на всем интервале сорбции наблюдается прямолинейный характер функции $-\ln(1-F)=f(t)$, свидетельствующий о внешнедиффузионном механизме сорбции фторид-ионов образцом 2.

С помощью полученных зависимостей определены кинетические параметры (константы скорости внутренней диффузии K_d), характеризующие внутреннюю диффузию фторид-ионов образцами 1 и 2: $K_{d1} = 0,13$; $K_{d2} = 0,22$. Константы скорости внутренней диффузии K_d , найденные по тангенсу угла наклона Γ_t от $t^{1/2}$ к оси абсцисс, показывают, что скорость внутренней диффузии для образца 2 больше, чем для образца 1.

Получены изотермы сорбции фторид-ионов образцами 1 и 2. В обоих случаях они соответствовали изотермам модели Ленгмюра. Начальные прямолинейные участки кривых показывают, что адсорбция локализована на отдельных адсорбционных центрах, каждый из которых взаимодействует только с одной молекулой, образуя мономолекулярный слой. Участки на изотермах, соответствующие большим концентрациям, отвечают поверхности сорбента полностью насыщенной сорбатом. Средние участки изотерм сорбции соответствуют промежуточным степеням заполнения поверхности сорбента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целлюлоза является наиболее распространенной биологической макромолекулой на Земле и вырабатывается различными организмами, в том числе бактериями. В отличие от целлюлозы растительного происхождения, бактериальная целлюлоза лишена других загрязняющих полисахаридов, а ее выделение и очистка относительно просты и не требуют энергоемких или химических процессов.

Хотя бактериальная целлюлоза является продуктом с большим рыночным потенциалом, широкое коммерческое использование данного полимера сдерживается его высокими производственными затратами. Медленный синтез целлюлозы бактериальными клетками является одной из причин этого и может быть обусловлен низкой скоростью роста бактерий, продуцирующих целлюлозу, и низкой скоростью кристаллизации целлюлозы клетками. Решением данного вопроса является выделение абсолютно новых штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы.

Важнейшей проблемой современной медицины является остановка кровотечений, возникающих во время хирургических операций и при травматических повреждениях органов. Особое внимание уделяется местным гемостатическим средствам, которые эффективно действуют в локальных зонах и могут быть использованы в случаях диффузной кровоточивости (раневая поверхность паренхиматозного органа, губчатая ткань и др.), когда другие методы остановки кровотечений могут быть малоэффективными. В данной сфере БЦ представляет особый интерес благодаря высокой абсорбционной и набухающей способности, отсутствию цитотоксичности.

Немаловажным является и использование бактериальной целлюлозы в качестве матрицы сорбентов, используемых для очистки вод от загрязнений, в частности от ионов фтора.

Полученные нами новые штаммы продуценты показали высокую эффективность синтеза БЦ и могут быть использованы для получения функциональных материалов различного назначения.

ВЫВОДЫ

1. Впервые из индийского риса был выделен новый штамм продуцент бактериальной целлюлозы *K. hansenii* В-12950, обладающий стабильностью в отношении выхода полимера.

2. Изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства коллекционных штаммов продуцентов БЦ *K. sacrofermentans* В-11267, *K. xylinus* В-12429, *K. xylinus* В-12430 и *K. hansenii* В-12950. Установлено, что наибольшим выходом БЦ с необходимыми характеристиками обладает штамм *K. sacrofermentans* В-11267.

3. Впервые получены аэрогели на основе бактериальной целлюлозы, хитозана и фузидина натрия, обладающие антибактериальной активностью. Полученные материалы могут быть использованы в медицине в качестве кровоостанавливающего материала благодаря своей высокой водоудерживающей способности, высокой пористости, антибактериальной активности.

4. Впервые получены адсорбенты на основе бактериальной целлюлозы с нанесением на ее поверхность нанослоя оксида алюминия толщиной 50 нм, обладающие высокой адсорбционной способностью по отношению к ионам фтора. Максимальная адсорбционная способность композита составляет 80,1 мг/г (F/композит).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в журналах Перечня ВАК РФ и международных цитатно-аналитических баз:

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

2. Melnikova N., Knyazev A., Nikolskiy V., Peretyagin P., Belyaeva K., **Nazarova N.***, Liyaskina E., Malygina D., Revin V. Wound healing composite materials of bacterial cellulose and zinc oxide nanoparticles with immobilized betulin diphosphate // *Nanomaterials*. – 2021. – 11(3). – 713; <https://doi.org/10.3390/nano11030713>

3. Revin V.V., Dolganov A.V., Liyaskina E.V., **Nazarova N.B.***, Balandina A.V., Devyataeva A.A., Revin V.D. Characterizing bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter sacrofermentans* H-110 on molasses medium and obtaining a biocomposite based on it for the adsorption of fluoride // *Polymers*. – 2021. – 13(9). – 1422; <https://doi.org/10.3390/polym13091422>

4. Revin V.V., **Nazarova N.B.***, Tsareva E.E., Liyaskina E.V., Revin V.D., Pestov N.A. Production of bacterial cellulose aerogels with improved physico-mechanical properties and antibacterial effect // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2020. – 8. – 603407. doi: 10.3389/fbioe.2020.603407

Патенты:

1. Патент № 2681281, Российская Федерация. Штамм бактерии *Komagataeibacter hansenii* – продуцент бактериальной целлюлозы / Ревин В.В., Сапунова Н.Б.*, Лияськина Е.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (RU) – опубл. 05.03.2019

2. Патент № 2736061, Российская Федерация. Способ получения биокompозита на основе аэрогеля бактериальной целлюлозы, обладающего кровоостанавливающими свойствами / Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назарова Н.Б.*, Саликов А.В., Федоров И.Г.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (RU) – опубл. 11.11.2020

Монография:

1. Ревин В.В., Кадималиев Д.А., Шутова В.В., Лияськина Е.В., Новокупцев Н.В., Богатырева А.О., Назарова Н.Б., Щанкин М.В., Желев Н., Янг Г. Биокompозиционные материалы на основе биополимеров, полученных путем микробиологического синтеза. Издательство Мордовского университета, Саранск, 2021. – 330 с. – ISBN 978-5-7103-4219-0.

Тезисы докладов на российских и международных конференциях:

1 Сапунова Н.Б.*, Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальной целлюлозы в динамических условиях // 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. 126.

2 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.

3 Liyaskina E., Sapunova N*, Revina N., Grigorkina E., Vaskina A., Khramova O., Revin V. Biocomposites from bacterial cellulose for antibacterial wound dressing // Journal of Biotechnology. – 2019. – V. 305. – Supplement. – European Biotechnology Congress 2019. – P. S15.

4 Khramova O.O., Nazarova N.B.*, Liyaskina A.I., Revin V.V., Liyaskina E.V., Guang Yang, Sabu Thomas, Revin V. Functional composites for biomedical applications // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2021. – Vol. 35. – Iss. SUP 1. – Special Issue: European Biotechnology Congress 2020. – S62-128. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1871545>

*Сапунова =Назарова=Sapunova=Nazarova