

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Национальный исследовательский
Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва»

На правах рукописи

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук,
профессор,
В.В. Ревин

Москва – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Общая характеристика бактериальной целлюлозы	12
1.1.1 Строение и структура бактериальной целлюлозы	12
1.1.2 Физико-химические и физико-механические свойства бактериальной целлюлозы	16
1.2 Продуценты бактериальной целлюлозы	21
1.2.1 Общая характеристика продуцентов бактериальной целлюлозы	21
1.2.2 Выделение новых и получение высокопродуктивных штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы с использованием методов селекции, мутагенеза и генетической инженерии	27
1.2.3 Физиолого-биохимические свойства и питательные потребности бактерий, продуцирующих бактериальную целлюлозу	34
1.2.4 Механизм биосинтеза бактериальной целлюлозы бактериями	39
1.3 Применение бактериальной целлюлозы	46
1.4 Получение бикомпозиционных материалов на основе бактериальной целлюлозы	54
1.4.1 Биоконпозиты на основе бактериальной целлюлозы медицинского назначения	58
1.4.1.1 Гидрогели и аэрогели как перспективные материалы для медицины	58
1.4.1.2 Дополнительные агенты, применяемые для создания биоконпозитов	66

1.4.1.2.1 Хитозан	66
1.4.1.2.2 Фузидовая кислота	71
1.4.1.3 Использование биоконпозитов на основе бактериальной целлюлозы в медицине	74
1.4.2 Использование бактериальной целлюлозы для очистки воды	80
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	84
2.1 Объект исследования	84
2.2 Методы исследования	84
2.2.1 Условия культивирования продуцентов БЦ	84
2.2.2 Приготовление препаратов для микроскопии	85
2.2.3 Описание морфологии колоний	86
2.2.4 Определение состава жирных кислот	86
2.2.5 Проведение молекулярно-генетических исследований	86
2.2.6 Очистка и определение количества бактериальной целлюлозы	86
2.2.7 Определение pH	87
2.2.8 Определение концентрации сахаров в среде	87
2.2.9 ИК-спектроскопия	88
2.2.10 Рентгеноструктурный анализ	88
2.2.11 Метод компьютерной микротомографии	89
2.2.12 Сканирующая электронная микроскопия	89
2.2.13 Получение аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы и хитозана	90
2.2.14 Определение влагосвязывающей способности	91
2.2.15 Определение пористости	91
2.2.16 Гемокоагуляционный тест	91
2.2.17 Получение сорбентов на основе бактериальной целлюлозы с нанослоем оксида алюминия	92
2.2.18 Изучение механизма адсорбции	93

2.2.19 Статистическая обработка данных	94
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	95
3.1 Выделение нового штамма продуцента бактериальной целлюлозы	95
3.2 Сравнительная характеристика штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы	101
3.2.1 Изучение морфологии продуцентов бактериальной целлюлозы	102
3.2.2 Культуральные свойства штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы	103
3.2.3 Определение содержания жирных кислот	104
3.2.4 Физиологические свойства штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы	105
3.3 Получение биокompозитов на основе бактериальной целлюлозы и изучение их свойств	112
3.3.1 Получение аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы и хитозана	112
3.3.1.1 Способы получения биокompозитов на основе бактериальной целлюлозы и хитозана	114
3.3.1.2 Изучение физико-химических и физико-механических свойств, полученных композитов на основе бактериальной целлюлозы и хитозана	120
3.3.1.3 Получение композитов в форме аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы и хитозана с фузидовой кислотой	130
3.3.2 Получение сорбентов ионов фтора на основе бактериальной целлюлозы	132
3.3.2.1 Влияние толщины слоя пленки Al_2O_3 на сорбцию фторид-ионов	133
3.3.2.2 Влияние pH раствора на адсорбцию фтора	134
3.3.2.3 Кинетика процесса сорбции	135
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	140

ВЫВОДЫ	141
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	142
ПРИЛОЖЕНИЕ А	160
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	161
ПРИЛОЖЕНИЕ В	162

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия;

БЦ – бактериальная целлюлоза;

ГПМЦ – гидроксипропилметилцеллюлоза;

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза;

УФ – ультрафиолет;

ФК – фузидовая кислота;

ЭМС – этилметансульфонат;

HS – среда Хестрина-Шрама;

ННР – гидростатическое давление;

MW – молекулярная масса;

NTG – N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина.

ВВЕДЕНИЕ

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 с использованием глюкозы в качестве субстрата (Karimian et al., 2019; Ревин и др., 2014б).

Обладая тонкой сетчатой структурой и высокой чистотой, БЦ обеспечивает значительные преимущества по сравнению с растительной целлюлозой. БЦ имеет преимущества с точки зрения биосовместимости, нетоксичности, высокой механической прочности, высокой способности к набуханию и высокой устойчивости к изменениям pH (Portela et al., 2019; Azredo, 2019; Ревин и др., 2014б).

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

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. В связи с этим в настоящее время ведется поиск адсорбентов нового поколения для очистки вод от загрязняющих веществ (Torres et al., 2019; Mezzenga et al., 2019). Наибольший интерес представляют сорбенты на основе БЦ.

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 (Патент РФ №2624242). В данной сфере БЦ представляет особый интерес благодаря высокой абсорбционной и набухающей способности, нецитотоксичности. Также в ней могут быть иммобилизованы различные активные соединения, лекарственные вещества, ферменты, позволяющие ускорить процесс свертывания и придать композиту антибактериальные свойства (Gustaite et al., 2015).

Однако, несмотря на все преимущества бактериальной целлюлозы перед полимером растительного происхождения, 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, который, как правило, не превышает 5 г/л. Несомненно, это приведет к высокой конечной стоимости продукта. Для решения этой проблемы необходимо вести поиск новых высокопродуктивных штаммов, а также проводить селекцию с привлечением современных методов. (Lee et al., 2014). Кроме того, снижения стоимости полимера можно достичь, также адаптируя штаммы к питательным средам, состоящим из отходов биотехнологических производств, и подбирая условия культивирования микроорганизмов.

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.

1. В связи с поставленной целью были сформулированы следующие задачи исследования:

2. Выделить новые штаммы продуценты бактериальной целлюлозы.
3. Провести сравнительную характеристику выделенных штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы и штаммов, имеющих в коллекции кафедры биотехнологии и биологии МГУ им. Н.П. Огарёва.
4. Выявить наиболее продуктивный штамм и использовать его для получения бактериальной целлюлозы.
5. 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 новые биокомпозиционные 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 депонированный 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 Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет 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 и биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» за поддержку при выполнении диссертационного исследования.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика бактериальная целлюлозы

1.1.1 Строение и структура бактериальной целлюлозы

Целлюлоза представляет собой линейный полимер молекул глюкозы, в котором отдельные единицы глюкозы связаны через ацетальные связи между атомами углерода C₁ и C₄ в глюкопиранозных кольцах. Аномерный C₁-углерод находится в β-конфигурации, и каждая единица глюкозы поворачивается на 180° относительно своих соседей, образуя тем самым целлобиозо-дисахаридную повторяющуюся единицу.

Поскольку каждая единица глюкозы содержит как экваториальные гидроксильные группы, которые направлены радиально от поверхности пиранозного кольца, так и осевые атомы водорода, которые перпендикулярны поверхности пиранозного кольца, целлюлоза имеет различные гидрофильные и гидрофобные свойства (McNamara et al., 2015).

Иными словами, целлюлоза представляет собой полидисперсный линейный гомополимер β-1,4-гликозидно-связанных звеньев d-глюкопиранозы (Eslahi et al., 2020; Fontana et al., 2017). Это полимер с линейной цепью и большим количеством гидроксигрупп (три на единицу ангидроглюкозы), присутствующих в термодинамически предпочтительной конформации C₁ (рис. 1) (Fontana et al., 2017).

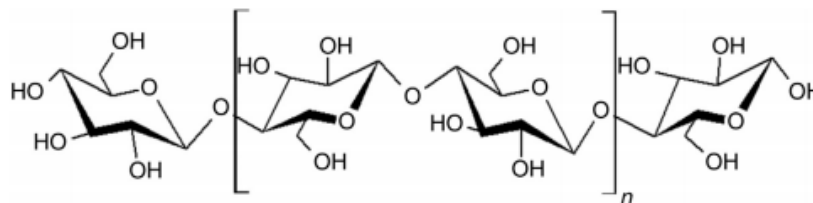


Рисунок 1 – Химическое строение целлюлозы (Fontana et al., 2017)

Элементарное звено макромолекулы целлюлозы находится в конформации кресла с экваториально расположенными группами OH и CH₂OH (Nainggnon, Veil, 2013). Теоретически рассчитанная конформация макромолекулы целлюлозы – жесткая спираль (шаг равен 2-3 элементарным звеньям). Порядок в расположении макромолекул целлюлозы поддерживается за счет сил межмолекулярного взаимодействия (сил Ван-дер-Ваальса) и главным образом внутримолекулярных и межмолекулярных водородных связей. В структуре целлюлозы, у которой каждое элементарное звено глюкозы имеет три гидроксильные группы, водородные связи имеют очень большое значение. Они оказывают влияние на физические, физико-химические и химические свойства данного полимера и отвечают за наиболее важные ее характеристики, а именно:

- образование мультимасштабной микрофибриллярной структуры;
- иерархическую организацию (образование участков с кристаллической и аморфной структурой);
- высокую когезионную силу.

Эти связи придают волокнам высокую прочность и нерастворимость в большинстве растворителей (Ревин и др., 2014б).

Основа надмолекулярной структуры целлюлозы – элементарные высокоупорядоченные фибриллы. Последние ассоциированы в агрегаты (микрофибриллы – содержат несколько сотен макромолекул; размеры в поперечном направлении от 4 до 10-20 нм), образующие матрицу, молекулярная структура которой значительно менее упорядочена, чем структура фибрилл (Nainggnon, Veil, 2013).

Целлюлоза – это полисахарид нерастворимый в воде, источником которого могут быть различные организмы, в том числе растения, животные, водоросли и бактерии (Azredo et al., 2019; Kim et al., 2006).

С момента своего открытия Брауном в 1886 году бактериальная целлюлоза (БЦ) приобрела большую популярность благодаря своим уникальным свойствам, таким как высокая чистота, ультрадисперсная и

высококристаллическая сетчатая структура, превосходная механическая прочность, биоразлагаемость, биосовместимость, большая влагоудерживающая способность и хорошая химическая стабильность (Cavka et al., 2013; Blanco Parte et al., 2020).

С точки зрения химической структуры, бактериальная целлюлоза идентична той, которую получают из растений. Однако, по сравнению с растительной целлюлозой, БЦ имеет ряд уникальных свойств (Thompson, Hamilton, 2001).

Молекулы бактериальной целлюлозы располагаются строго параллельно друг другу и образуют кристаллические микрофибриллы в 100 раз тоньше микрофибрилл растительной целлюлозы, то есть это структурные элементы наноразмерного размера (рис. 2).

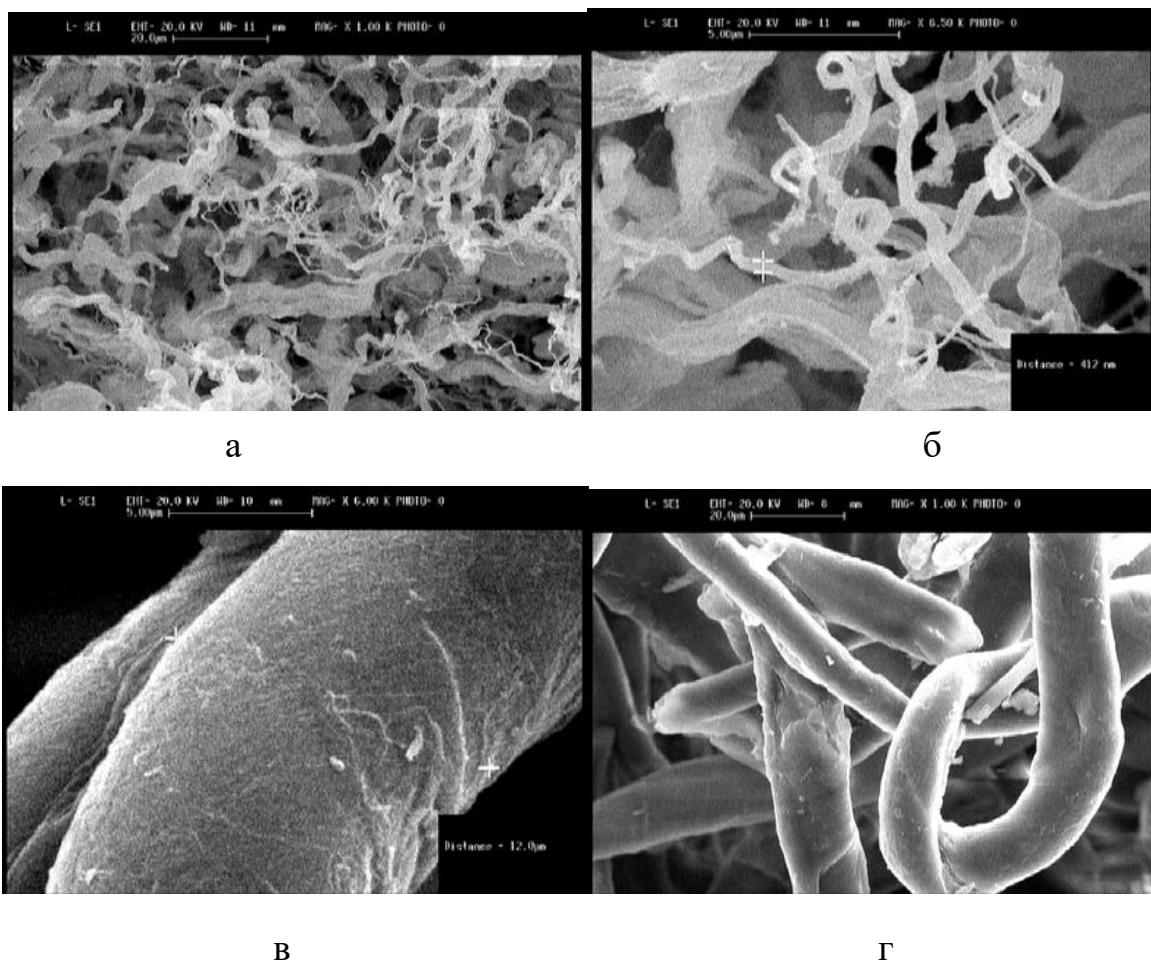


Рисунок 2 – Волокна бактериальной (а, б) и растительной (в, г) целлюлозы (Thompson, Hamilton, 2001)

Микрофибриллы БЦ соединяются в лентовидные волокна толщиной в одну миллионную сантиметра. Переплетение волокон образует пористую губку, которая впитывает и долго удерживает огромное количество воды, в 200 раз больше собственной массы. Удельная площадь поверхности волокон бактериальной целлюлозы в 200 раз больше, чем у волокон растительной целлюлозы. Кроме того, за счет правильного расположения волокон степень кристалличности БЦ достигает 80 % и чтобы их разорвать, нужно приложить силу до нескольких килограммов на квадратный миллиметр. БЦ проявляет два, казалось бы, несовместимых качества – тончайшая пористость и механическую прочность (Thompson, Hamilton, 2001).

Методами дифракции рентгеновских лучей, твердотельного ^{13}C ядерного магнитного резонанса были выделены 4 группы целлюлозы I, II, III и IV (Алешина, Глазкова, 2001; Баклагина и др., 2010).

Наиболее распространенная форма целлюлозы – целлюлоза I – может находиться в двух алломорфных формах I_α или I_β , которые могут быть обнаружены рядом друг с другом и различаются по своей кристаллической упаковке, молекулярной конформации и водородным связям (рис. 3).

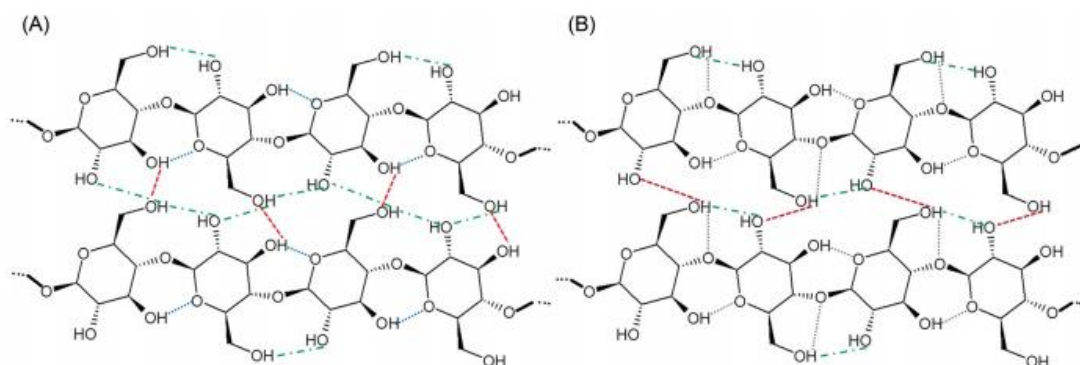


Рисунок 3 – Модель целлюлозы I_α (A) и I_β (B) (Fontana et al., 2017)

Эти различия могут влиять на физические свойства целлюлозы, соотношение алломорфов I_α / I_β зависит от происхождения целлюлозы. Целлюлоза I_α кристаллизуется в микрофибриллах большего размера, тогда как целлюлоза I_β образуется в микрофибриллах меньшего размера. Поскольку

целлюлоза I_{β} необратимо образуется из целлюлозы I_{α} , структура целлюлозы I_{β} должна быть термодинамически более стабильной, чем структура целлюлозы I_{α} . Исследователями было доказано, что целлюлоза, полученная от некоторых водорослей и бактерий богата формой I_{α} , а целлюлоза, источников которой являются хлопок и дерево – богата I_{β} формой. Поскольку целлюлозная микрофибрилла может содержать оба типа целлюлозы, некоторые физические свойства целлюлозных волокон будут зависеть от соотношения этих двух алломорфов. Целлюлоза I_{α} является метастабильной и может быть превращена в I_{β} путем отжига (Fontana et al., 2017).

Что касается целлюлозы II, то она может быть получена двумя способами: мерсеризацией (обработка щелочью) и восстановлением (растворение и последующая рекристаллизация) (Алешина, Глазкова, 2001; Баклагина и др., 2010). Целлюлозу III получают путем более мягкой предварительной обработки аммиаком, а целлюлозу IV при высоком нагревании целлюлозы II при температуре 260 °C в присутствии глицерина (Fontana et al., 2017; Klemm et al., 2005).

Несмотря на схожесть молекулярной структуры бактериальной и растительной целлюлозы, БЦ обладает рядом уникальных свойств, которые позволяют использовать данный полимер в различных отраслях промышленности (Torgbo, Sukuai, 2018).

1.1.2 Физико-химические и физико-механические свойства бактериальной целлюлозы

В основе строения молекулы целлюлозы лежат мономеры, каждый мономер имеет три гидроксильные группы. Эти гидроксильные группы и их способность образовывать водородные связи играют важную роль в кристаллической упаковке и определяют физико-химические свойства целлюлозы. Каждое целлюлозное волокно образовано объединением фибрилл, которые представляют собой длинный нитевидный пучок молекул,

стабилизированный с боков межмолекулярными водородными связями. Элементарные фибриллы, по-видимому, состоят из 36 цепей β -1,4-глюкана, и они образуются во время биосинтеза в плазматической мембране. Каждую фибриллу можно рассматривать как цепочку кристаллов целлюлозы, связанных вдоль оси фибрилл неупорядоченными аморфными доменами. Основная часть целлюлозы состоит из кристаллитов с вкраплениями аморфных областей, называемых природной целлюлозой или целлюлозой I, тогда как целлюлоза II, III и IV является аморфной (причем целлюлоза II является наиболее стабильной).

Целлюлоза I, как говорилось ранее, имеет две различные кристаллические структуры (рис. 4): целлюлоза I α , относящаяся к одноцепочечной триклинной клеточной единице, и I β , отнесенная к двухцепочечной моноклинной клетке. Доля обоих кристаллических типов связана с происхождением целлюлозы. Таким образом, бактериальная целлюлоза богата I α формой, тогда как I β в основном присутствует в клеточной стенке высших растений (Blanco et al., 2018).

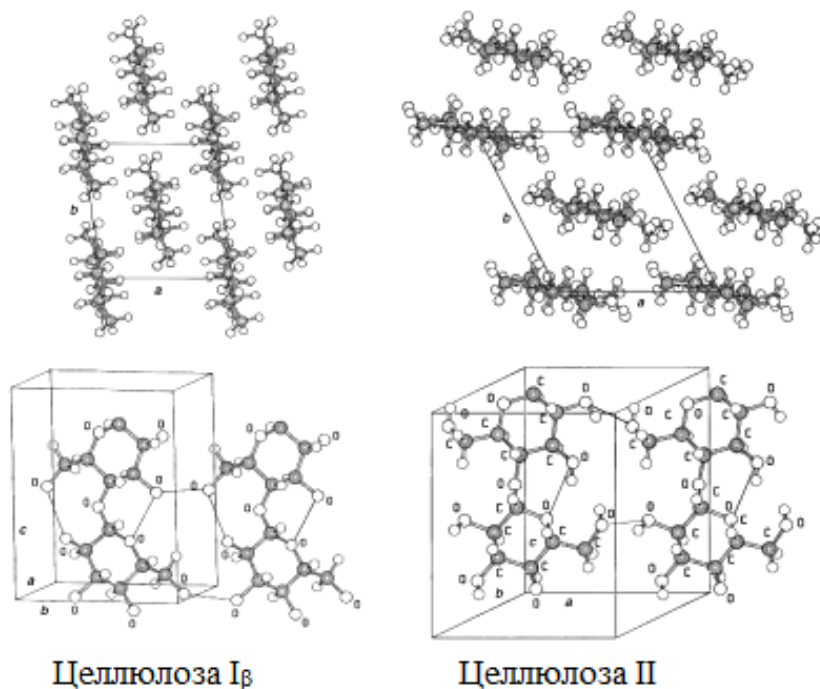


Рисунок 4 – Кристаллическая структура целлюлозы I и целлюлозы II (Blanco et al., 2018)

Бактериальная целлюлоза характеризуется высокой интенсивностью межмолекулярного взаимодействия, высокой степенью асимметрии макромолекул и высокой степенью ориентации. Водородные связи удерживают параллельно расположенные цепевидные макромолекулы на строго определенных расстояниях друг от друга, что приводит к возникновению кристаллической структуры (Campano et al., 2015; Fontana et al., 2017).

Геометрия материала определяется сеткой внутримолекулярных и межмолекулярных водородных связей, гидрофобными и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, образующими параллельные цепи (целлюлоза типа I). Обработка БЦ 5 % – 30 % гидроксидом натрия (процесс мерсеризации) образует антипараллельную упаковку (целлюлоза типа II), в основном стабилизированную плотной упаковкой с водородными связями, которая создает трехмерное расположение с более низкой энергией, гораздо более стабильное, чем целлюлоза типа I. В частности, пространственная конфигурация мерсеризованной БЦ создает уникальную структуру из нановолокон произвольной формы с повышенным модулем Юнга (Campano et al., 2015).

Некоторые свойства и параметры, которые можно использовать для дифференциации БЦ и нативных или химически обработанных растительных целлюлоз, включают степень полимеризации, пропорции алломорфов I_α и I_β , индекс кристалличности, единицы кристаллитов и модуль Юнга с высокой прочностью на растяжение (> 2 GPa), высокая чистота (полностью свободная от лигнина и гемицеллюлозы) и хорошая биосовместимость. Эти свойства приводят к быстрой биодegradации в почве и быстрому гидролизу целлюлолитическими микроорганизмами, которые обладают ферментативным комплексом (Fontana et al., 2017).

БЦ обладает высокой влагоудерживающей способностью и гидрофильностью (Campano et al., 2015). Этот полимер способен удерживать количество воды в десятки и сотни раз больше своего веса. Содержание воды в геле БЦ может составлять до 98 %, это делает ее более похожей на гидрогель

(Воронова и др., 2013; Campano et al., 2015). Одна из причин гидрофильности заключается в том, что целлюлозные ленты собираются внеклеточно в жидкой среде. Затем образуются мицеллы, которые задерживают большое количество жидкости. Кроме того, гидрофильность целлюлозной пленки частично является результатом обширной внутренней поверхности межузлового пространства пленки (Fontana et al., 2017).

Модуль упругости (модуль Юнга) является основным показателем для фиксирования жесткости материала: она определяется как напряженно-деформированное отношение в линейной области кривой деформации, т.е. представляет собой область упругого ответа материала. Исследования показали, что для лент БЦ шириной в пределах от 35 до 90 нм, модуль Юнга составляет (78 ± 17) ГПа. Фактически, модуль кристалла целлюлозы I (типа целлюлозы характерной для нативной целлюлозы, в том числе БЦ) в направлении, параллельном оси цепи, измеренный методом рентгеновской дифракции составляет 138 ГПа. Это свидетельствует о высоком значении модуле Юнга, что делает бактериальную целлюлозу перспективным материалом в качестве усилителя для биокompозитов (Fontana et al., 2017).

Основа надмолекулярной структуры целлюлозы – элементарные высокоупорядоченные фибриллы. Последние ассоциированы в агрегаты (микрофибриллы – содержат несколько сотен макромолекул; размеры в поперечном направлении от 4 до 10–20 нм), образующие матрицу, молекулярная структура которой значительно менее упорядочена, чем структура фибрилл (Auta et al., 2017; Ahmed et al., 2020).

Степень полимеризации БЦ колеблется от 300 до 10 000 в зависимости от условий культивирования, различных добавок и, наконец, штаммов бактерий. В отличие от растительной целлюлозы, БЦ, получаемая из микроорганизмов, обладает уникальным механизмом синтеза цепных молекул с последующей тонкой самосборкой. Пространственное расположение агрегации микрофибрилл обеспечивает высокую кристалличность до 84 – 89 %, в то время как данные варьируются от 40 % до 60 % для растительной целлюлозы.

Это приводит к типичному модулю Юнга БЦ в диапазоне 15–35 ГПа, а предел прочности при растяжении в диапазоне 200–300 МПа. Относительный высокий модуль упругости позволяет ему выступать в качестве армирующих элементов в полимерной матрице.

Бактериальная целлюлоза характеризуется высокоаспектным соотношением, которое позволяет увеличить площадь поверхности БЦ. Данное свойство обусловлено тем, что обычно нанофибриллы БЦ экстрадируются из цитоплазматической мембраны клеток и агрегируются в лентоподобную фибриллу (Campano et al., 2015).

Так, в таблице 1 представлена сравнительная характеристика параметров бактериальной и растительной целлюлозы (табл. 1) (Auta et al., 2017).

Таблица 1 – Сравнение свойств бактериальной и растительной целлюлозы (Castro et al., 2012)

Свойства	БЦ	Растительная целлюлоза
Толщина волокна, нм	70 – 80	14000 – 40000
Кристалличность, %	65 – 89	40 – 60
Степень полимеризации	300 – 10000	13000 – 14000
Модуль Юнга, МПа	15 – 30	5,5 – 12,6
Влагоудерживающая способность, %	98,5	60

Сложная, многоуровневая сверхмолекулярная структура целлюлозы является предметом интереса уже на протяжении нескольких десятилетий. Механические, физические и экологические свойства целлюлозы зависят от молекулярной, супрамолекулярной и морфологической структуры целлюлозы (Kondo, 2014).

Подводя итог можно сказать, что многоуровневая сверхмолекулярная структура целлюлозы является предметом интереса уже на протяжении нескольких десятилетий. При этом механические и физико-химические свойства, а также реакционная способность целлюлозы определяются ее

надмолекулярной структурой, зависящей от расположения макромолекулярных цепей и существования связывающих их сил.

1.2 Продуценты бактериальной целлюлозы

1.2.1 Общая характеристика штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы

Основным фактором, связанным с увеличением выхода бактериальной целлюлозы и получением полимера с заданными свойствами, является выбор штаммов бактерий, используемых для синтеза полисахарида (Campano et al., 2015; Huang et al., 2014).

Впервые бактериальная целлюлоза, в том числе и штамм-продуцент, ее образующий, были открыты и описаны Брауном в 1886 году (Fontana et al., 2017; Machado et al., 2016). Работая с культурой *Bacterium aceti* и изучая ее биохимию, ученый обнаружил и описал другую уксусную ферментацию в виде желеобразной полупрозрачной массы на поверхности культуральной жидкости (уксуса). Образующиеся на поверхности среды пластинки были тонкими и полностью разрушались при малейшем перемешивании, однако при соблюдении статических условий такая пластина могла оставаться нетронутой на протяжении нескольких дней.

Используя питательный раствор, состоящий из красного вина, разбавленного наполовину водой, и 1% уксусной кислоты, Брауну удалось получить на поверхности среды биопленку или мембрану. Исследователем было отмечено, что пленки в процессе роста приобретали цвет среды. Однако после промывки мембраны разбавленной соляной кислотой, а затем водой конечный продукт представлял собой бесцветную полупрозрачную пленку, сохраняющую форму и желатиновый характер исходной мембраны. Все анализы не оставляли сомнений в том, что такая мембрана была чистой целлюлозой.

Из-за способности образовывать целлюлозу Браун предположительно назвал этот неизвестный микроорганизм *Bacterium xylinum*. Однако, как бактерии, продуцирующие уксусную кислоту, этот микроорганизм впоследствии был переименован в *Acetobacter xylinum*, благодаря чему он стал широко известен (Fontana et al., 2017).

Бактериальную целлюлозу способны синтезировать грамотрицательные бактерии родов *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes*, а также грамположительные бактерии, такие как *Sarcina ventriculi*. Как говорилось ранее, целлюлозы, продуцируемые разными бактериями, обладают различной морфологией, структурой, свойствами и областями применения (Wang et al., 2019; Lin et al., 2020).

Наиболее известным продуцентом БЦ, как говорилось выше, является уксуснокислая бактерия *Acetobacter xylinum* (также известная как *Gluconacetobacter xylinus*), которая в настоящее время называется *Komagataeibacter (K.) xylinus* (Campano et al., 2015). Данный штамм характеризуется наибольшим выходом полимера и широкой распространенностью (Wang et al., 2019).

Род *Komagataeibacter* недавно появился в семействе уксуснокислых бактерий и состоит из четырнадцати видов (Ryngajłło et al., 2018). Этот род был назван в честь японского микробиолога, профессора Казуо Комагата, в знак признания его вклада в систематику уксуснокислых бактерий (Ryngajłło et al., 2018; Machado et al., 2016; Kim et al., 2017).

Бактерии, представители рода *Komagataeibacter*, обычно встречаются во многих природных источниках, таких как отходы агропромышленного комплекса, фруктовые отходы, цветы, отходы производства уксуса, растительные и фруктовые отходы, почва и сточные воды (Singh et al., 2017).

Как и все бактерии, синтезирующие целлюлозу, за исключением *K. persimmonis*, который обладает подвижностью, *K. xylinus* является грамотрицательным, палочковидным и неподвижным микроорганизмом. По отношению к потреблению кислорода является аэробом. Не фотосинтетический

и способен за несколько дней преобразовать глюкозу и другие органические субстраты в целлюлозу.

«Ксилинус» по-гречески значит «древесная, хлопковая» (в данном случае это означает, что бактерия может образовывать целлюлозу). «Глюконацето» говорит о том, что глюкоза окисляется не до конца, а только до глюконовой кислоты. Если бактерии скормить винный или этиловый спирт, то он будет окисляться до уксусной кислоты (Ревин и др., 2014а; Лияськина и др., 2010; Ревин и др., 2014б).

Иными словами, уникальность бактерий данного вида заключается в том, что во время роста способен превращать углеводы в уксусную кислоту и одновременно синтезировать целлюлозу. Благодаря наличию, так называемого, дыхательного метаболизма *K. xylinus* способен окислять этанол в уксусную кислоту и превращать глюкозу в глюконовую кислоту. Все эти кислотные образования вызывают снижение pH культуральной среды, особенно при периодическом культивировании (Campano et al., 2015).

Клетки рода бактерий *Komagataeibacter* имеют эллипсоидную или палочковидную форму, прямые или слегка изогнутые, $0,6 - 0,8 \times 1,0 - 4,0$ мкм, одиночные, в парах или цепочках (рис. 5). Размножаются клетки бинарным делением, подвижны и не образуют эндоспор. При ограничивающих условиях штаммы *Komagataeibacter* образуют инволюционные формы, то есть набухшие или удлиненные нити. В условиях, подходящих для роста бактерий, эти формы атрофируются или фрагментируются на более короткие кусочки, что обеспечивает восстановление нормальных клеток (Krystynowicz et al., 2005).

Представители рода *Komagataeibacter* способны образовывать целлюлозу на поверхности жидких и твердых питательных сред.

Желатиновые, подобные коже маты, сформированные на поверхности жидких питательных сред в статических условиях культивирования, содержат бактериальные клетки, захваченные сетью целлюлозных волокон. При динамических условиях культивирования осаждение пленок нарушается, и

целлюлоза образует неправильные гранулы звездчатых и волокнистых нитей (Krystynowicz et al., 2005).

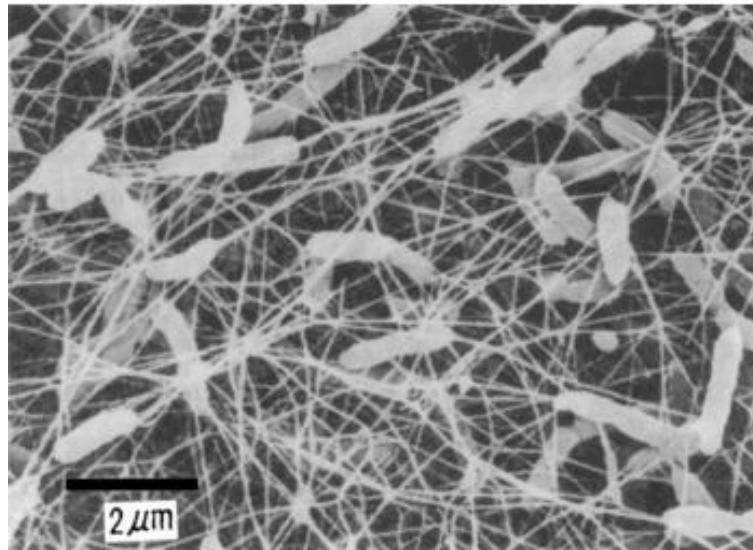
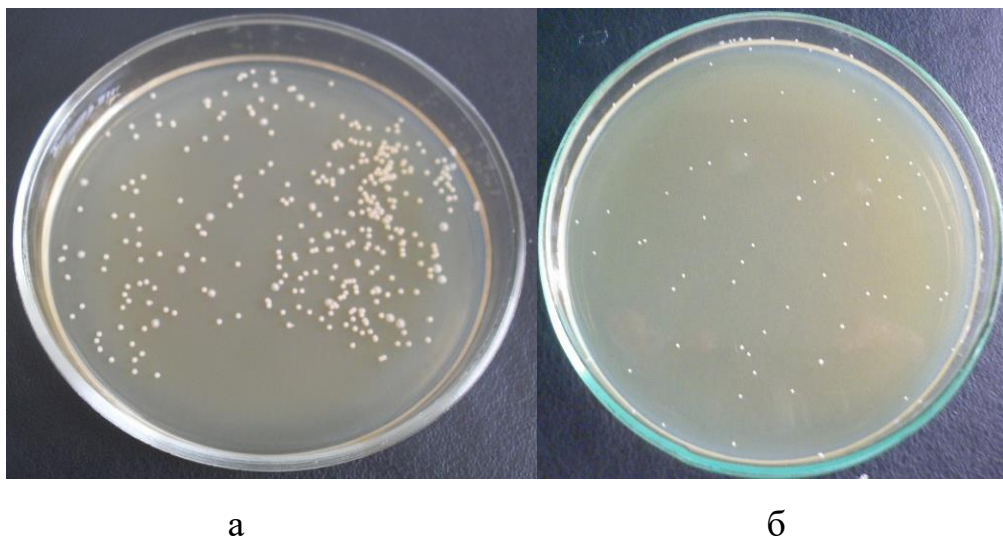


Рисунок 5 – СЭМ изображение клеток бактерий рода *Komagataeibacter*, продуцирующих БЦ (Campano et al., 2015)

На агаризованных средах бактерии образуют колонии с равными или волнистыми краями, прозрачные или белые, гладкие или шероховатые, плоские или выпуклые (рис. 6) (Ревин и др., 2014а; Krystynowicz et al., 2005).



а

б

Рисунок 6 – Колонии бактерий *K. sucrofermentans* В-11267 на среде с глюкозой (а) и среде с этанолом (среда YE) (б) на третьи сутки роста (Ревин и др., 2014б)

В природе данные микроорганизмы способны расти на поверхности гниющих плодов, откуда они получают энергию и питательные вещества, необходимые для размножения. Синтез, так называемых, целлюлозных пленок, которые образуются на поверхности, имеет, в первую очередь, защитную функцию, которая предохраняет бактерии от обезвоживания, солнечного света, конкурентов, а также создает резерв источников питательных веществ (Chang et al., 2016).

Принято считать, что культивирование продуцента в динамических условиях, приводит к снижению выхода полимера из-за действия целлюлозо-негативных мутантов (Cel-), которые становятся более обогащенными, чем клетки, продуцирующие целлюлозу. Целлюлозные мутанты образуются из-за напряжения сдвига, создаваемого либо в этих культурах, либо в этих условиях культивирования, и способствуют выработке побочных продуктов, которые различаются в зависимости от штамма бактерий. Так, в случае *K. xylinus*, побочным продуктом является водорастворимый полисахарид, обычно называемый ацетаном, структура которого аналогична структуре ксантана. Он состоит из глюкозы, маннозы, глюкуроновой кислоты и рамнозы в соотношении 4: 1: 1: 1 (Campano et al., 2015).

В настоящее время выделено и описано большое количество штаммов рода *Komagataeibacter*. Изучены их молекулярно-генетические свойства.

Так, на кафедре биотехнологии и биохимии Мордовского государственного университета из чайного гриба выделена культура *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) sucrofermentans* Н-110 (Патент № 2523606). Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером В-11267. Также на кафедре был выделен штамм продуцент бактериальной целлюлозы *Komagataeibacter hansenii* С-110 (Патент № 2681281), депонированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером В-12950. Источником выделения для данного штамма послужил индийский рис (Revin et al., 2020).

Чайный гриб или ферментированный напиток под названием «Комбуча», полученный путем ферментации сахара в чае с симбиотической культурой дрожжевых и уксуснокислых бактерий, наиболее часто используемый источник выделения целлюлозосинтезирующих уксуснокислых бактерий (Semjonovs et al., 2016).

Исследователями из Латвии из чайного гриба был выделен штамм продуцент бактериальной целлюлозы *Komagataeibacter rhaeticus* P 1463, который был способен синтезировать целлюлозу, как в статических, так и в динамических условиях на стандартной среде Хестрина-Шрама (HS). Выход целлюлозы при культивировании штамма в статических условиях составил при этом $4,40 \pm 0,22$ г/л (Semjonovs et al., 2016).

Источником выделения целлюлозосинтезирующих уксуснокислых бактерий также может являться винный уксус. Так, Fernández и соавторами был выделен штамм продуцент бактериальной целлюлозы идентифицированный как *Komagataeibacter* JF2. Данный штамм отличался образованием целлюлозы с более высокой степенью кристалличности (Fernández et al., 2019).

Группой ученых из Китая из сока цитрусовых был выделен штамм бактерий, способных продуцировать целлюлозу. Выделенный штамм показал высокое значение сходства с *G. hansenii*. Штамм был идентифицирован как *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2. Полученная с помощью данного штамма целлюлоза являлась чистым полимером, не содержащим никаких других примесей, и обладала высокой прочностью на растяжение и высокой влагоудерживающей способностью, что позволяет использовать ее в качестве косметического и медицинского материала (Kim et al., 2017).

Еще одним штаммом, выделенным из фруктового сока, был *Komagataeibacter medius* FST213 – 1. Полученный штамм отличался более высоким выходом полимера по сравнению с контрольными исследуемыми образцами и был способен образовывать целлюлозу в гораздо более короткие сроки (Lin et al., 2016).

Castro и соавторы сообщили о выделении кислотоустойчивого штамма *Gluconacetobacter sp.*, который может продуцировать БЦ до 4,5 г/л при pH 3,5 (Castro et al., 2012).

Aydin и Aksoy продемонстрировали, что выделенные ими бактерии – *Gluconacetobacter hansenii* P2A предотвращают мутацию при их культивировании в динамических условиях (Aydin and Aksoy, 2014).

Jahan, Kumar, Rawat и Saxena выделили новый целлюлозосинтезирующий штамм из гнилых фруктов и овощей, а далее путем подбора оптимальной для культивирования среды смогли увеличить выход полимера с 0,52 г/л до 4,5 г/л (Jahan et al., 2012).

Известно также о выделенном штамме *Gluconacetobacter xylinus* TJU-S8, который был получен из китайского уксуса хурмы. БЦ, продуцируемая данным штаммом, показала хорошую термическую стабильность и типичную кристаллическую форму целлюлозы I, что также позволяет использовать полимер, полученный данным штаммом, во многих отраслях промышленности (Du et al., 2018).

Несмотря на усилия со стороны ученых и исследователей существующие продуценты бактериальной целлюлозы не отличаются высоким уровнем синтеза этого полимера, который, как правило, не превышает 5 г/л. Поэтому остается актуальным выделение новых культур продуцентов и получение высокопродуктивных штаммов методами селекции и генетической инженерии (Ревин и др., 2014б).

1.2.2 Выделение новых и получение высокопродуктивных штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы с использованием методов селекции, мутагенеза и генетической инженерии

Как упоминалось ранее, несмотря на перспективность использования бактериальной целлюлозы в различных сферах народного хозяйства, в России

до сих пор нет ее производства вследствие отсутствия эффективных продуцентов и разработки биотехнологии на их основе.

Природные микроорганизмы, как правило, обладают низкой продуктивностью тех веществ, которые интересуют селекционера.

Для использования в микробиологической промышленности нужны высокопродуктивные штаммы, которые создают различными методами селекции, в том числе отбором среди природных микроорганизмов.

Традиционная селекция микроорганизмов основана на экспериментальном мутагенезе и отборе наиболее продуктивных штаммов.

Мутагенез – метод в селекции микроорганизмов, который позволяет искусственно получать мутации. Основой мутагенеза являются изменения в молекулах нуклеиновых кислот. Под влиянием мутагенов у микроорганизмов возникают в основном, те же мутации, что и при естественной изменчивости, однако частота их значительно возрастает. Изменения могут касаться любых признаков микроорганизмов: морфолого-культуральных и физиологических.

В качестве мутагенов могут использоваться физические, химические и биологические агенты (Кривохижая и др., 2010).

Так, исследователями из Тайланда были выделены бактерии, способные синтезировать бактериальную целлюлозу. С целью увеличения выхода полимера данными штаммами бактерии были подвергнуты физическому воздействию УФ-облучения и/или химической мутации с помощью N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (NTG). Результаты исследования показали, что выход мутированных штаммов был на 54,68 % выше, чем у исходного (контрольного) штамма продуцента бактериальной целлюлозы. Данные штаммы показывали также и более лучшее потребление глюкозы (Siripong, 2012).

Hungund и Gupta были проведены подобные исследования, касающиеся использования физических и химических мутагенов для увеличения выхода БЦ. В качестве мутирующих факторов исследователями были использованы УФ-облучение и этилметансульфонат (ЭМС). Исследования показали увеличение

выхода полимера штаммом *Gluconacetobacter xylinus* NCIM 2526. Мутанты сравнивали с исходной культурой. Выход целлюлозы с использованием мутированного штамма составил 5,96 г/л, что на 50 % больше, чем у исходного штамма (Hungund and Gupta, 2010).

Таким образом, исследователями была доказана эффективность физических и химических мутагенов по отношению к увеличению выхода штаммами необходимого нам полимера. Однако, поскольку эти методы мутагенеза обладают радиацией или токсичностью, которая довольно вредна для здоровья человека, их применение весьма ограничено. В соответствии с этим имеет смысл найти новые мутагенные средства для увеличения выхода БЦ (Huang et al., 2014).

Одним из примеров такого решения является использование гидростатического давления (ННР). Исследуемый штамм *Gluconacetobacter xylinus* обрабатывали при 250 МПа и 25 °С в течение 15 мин для индукции мутагенеза с использованием аппарата ННР. Штамм показал более высокий выход БЦ по сравнению с контрольным образцом (Huang et al., 2014).

Однако еще более эффективным методом увеличения выхода полимера является использование методов генетической инженерии (Ревин и др., 2014б).

Когда в качестве источника углерода для *A. xylinum* используется глюкоза или сахароза, основным продуктом является не целлюлоза, а кетоглюконат, который образуется в результате окисления источника углерода. Чтобы ограничить превращение глюкозы в кетоглюконат и увеличить ее превращение в целлюлозу были выделены кетоглюконат-негативные штаммы *Acetobacter*. Авторы полученных модификаций сообщили, что выход БЦ увеличился с 1,8 г/л (исходный штамм) до 3,3 г/л после 10 дней культивирования, тогда как потребление глюкозы мутантным штаммом уменьшилось от 22,6 г/л для исходного штамма до 7,3 г/л. Это снижение потребления глюкозы связано с ингибированием метаболического пути, который превращает глюкозу в кетоглюконат (Lee et al., 2014).

Американские исследователи Nobles и Brown перенесли частичный оперон целлюлозосинтазы штамма *G. xylinus* в одноклеточные цианобактерии (штамм *Synechococcus leopoliensis* UTCC 100). Гены были успешно экспрессированы в этой цианобактерии, и поэтому генетически модифицированный *S. leopoliensis* продуцировал аморфную целлюлозу, не имеющую типичной фибриллярной структуры (рис. 7) (Nobles and Brown, 2008).

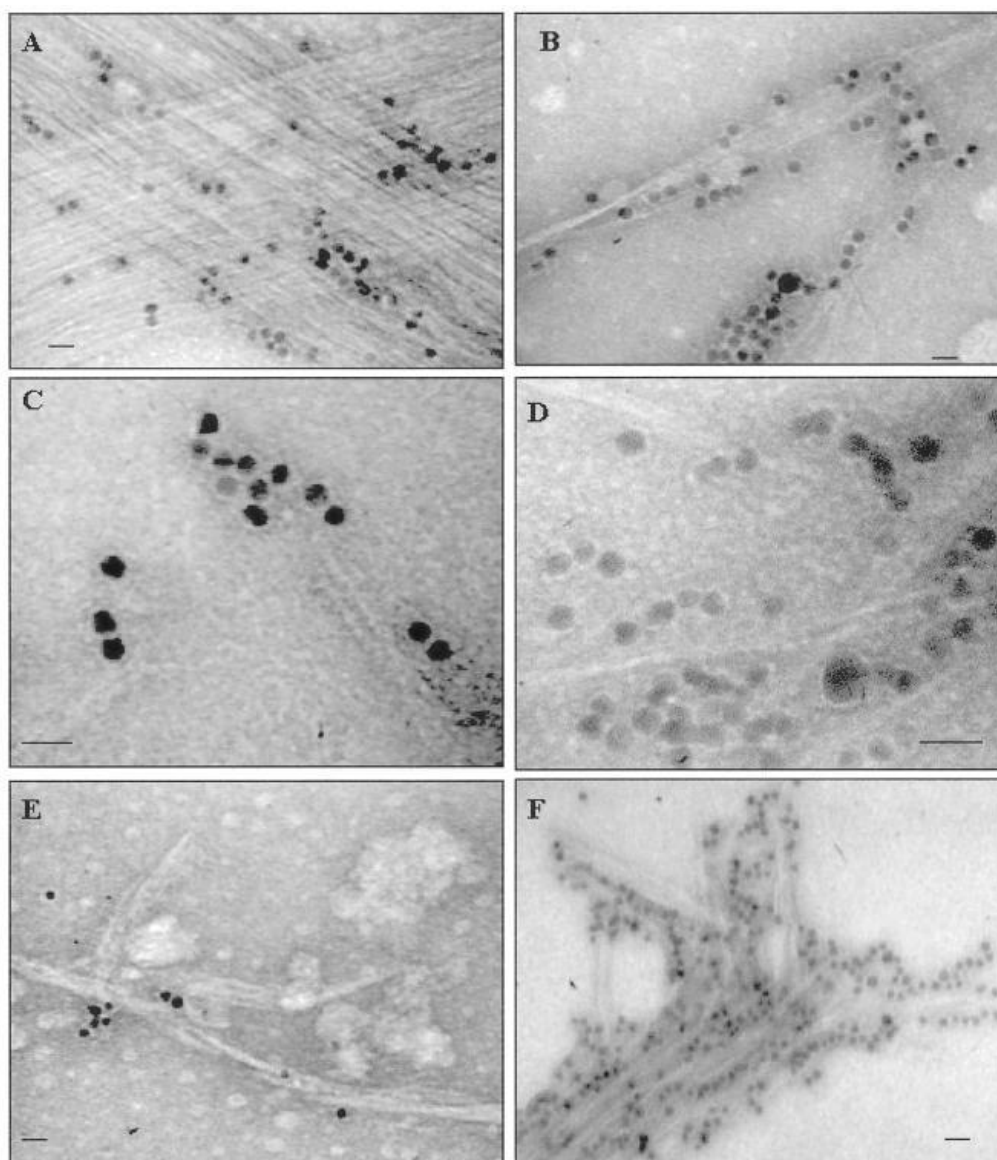


Рисунок 7 – Образование БЦ цианобактериями: А – *Gloeocapsa* sp., В – *N. muscorum*, С – *C. epipsammum* ATCC 49662, D – *P. autumnale*, Е – *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, F – *Anabaena* (Nobles and Brown, 2008)

Тем не менее, авторы предположили, что некристаллическая природа полученного полимера может быть полезна для производства биотоплива (Nobles and Brown, 2008).

Shigematsu и соавторы клонировали последовательность гена, кодирующую предполагаемую пирролохинолинхинон-глюкозодегидрогеназу из *G. xylinus* BPR2001. Клонированный фрагмент гена был использован для получения мутантного штамма BPR2001 (GD-I) с дефицитом глутаматдегидрогеназы (GDH). Штамм GD-I не продуцирует глюконовую кислоту, но он вырабатывает 4,1 г/л БЦ в аэробных условиях в среде, содержащей глюкозу в качестве источника углерода. При этом выход БЦ полученным штаммом было примерно в два раза выше, чем у исходного штамма (Shigematsu et al., 2005)

Группа исследователей под руководством Вае провели генетическую модификацию *A. xylinum* BPR2001 с целью сравнения продуктивности и структурных характеристик БЦ. Модификация была проведена по гену *dgc1*, который играет важную роль в активации синтеза БЦ и катализирует синтез *c-di-GMP*. Ожидалось, что разрушение *dgc1* должно снизить выход полимера. Однако, вопреки ожиданиям авторов, получение БЦ мутантами, нарушенными по *dgc1*, оставалось примерно таким же, как и для исходного штамма, как в статических, так и в динамических условиях культивирования. Исследование показало, что, хотя синтез *c-di-GMP* важен для активации целлюлозосинтазы, разрушения гена *dgc1*, который катализирует образование *c-di-GMP*, вероятно, не является ключевым моментом для синтеза БЦ. Было выдвинуто предположение, что *dgc2* и *dgc3*, которые имеют функции, аналогичные функциям *dgc1*, дополняют или даже усиливают скорость образования полимера (Вае et al., 2004b).

Стоит отметить, что другая группа исследователей под руководством Таl, наблюдали снижение выхода БЦ, когда ген *dgc1* был нарушен. Противоречивые результаты, о которых сообщают Вае и Таl, могут быть связаны с коротким

временем культивирования, использованным последней группой для оценки окончательного выхода БЦ (Lee et al., 2014).

Японскими учеными получены рекомбинантные бактерии *E. coli*, способные образовывать БЦ в результате переноса в них генов *G. xylinus* (рис. 8) (Imai et al., 2014).

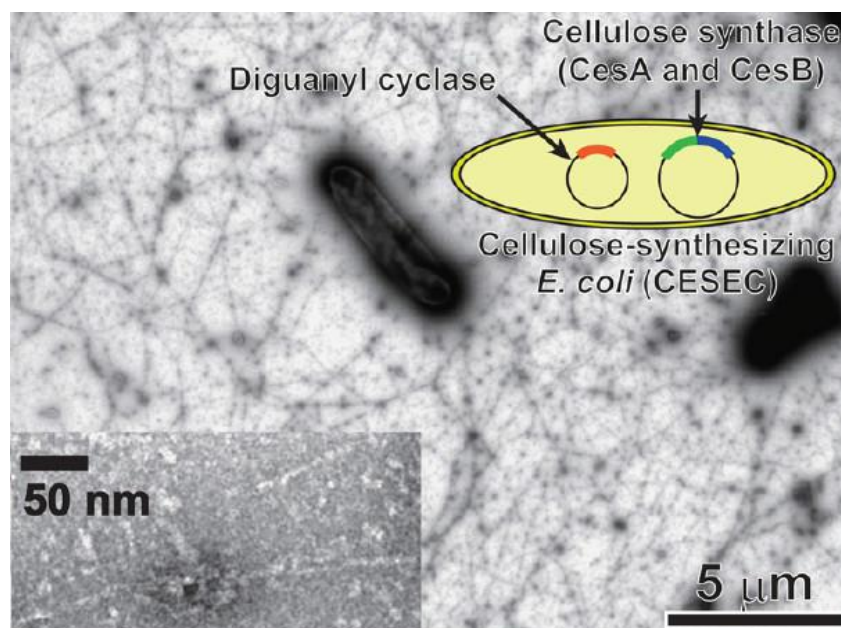


Рисунок 8 – Рекомбинантные бактерии *E.coli*, способные образовывать бактериальную целлюлозу (Imai et al., 2014)

Как упоминалось ранее, *Gluconacetobacter xylinus* выделяет вязкий водорастворимый полисахарид ацетан во время синтеза БЦ. Ацетан вырабатывается *G. xylinus* из UDPGlc, который также является исходным соединением для производства целлюлозы. Следовательно, ожидается, что ингибирование производства ацетана приведет к увеличению концентрации UDPGlc, что, в свою очередь, увеличит выход целлюлозы (Lee et al., 2014).

Этот подход был принят Ishida с соавторами, в соответствии с которым мутантный штамм, не продуцирующий ацетан (EP1), был получен из *G. xylinus* BPR2001. Вопреки тому, что ожидали авторы, продуктивность EP1 по отношению к БЦ снизилась по сравнению с исходным штаммом в условиях динамического культивирования. В статических условиях не наблюдалось существенной разницы в выходе БЦ между EP1 и исходным штаммом. Авторы

связывают снижение выхода БЦ с помощью мутанта EP1 с ролью, которую играет ацетан при культивировании бактерий. Выращивание EP1 приводило к гетерогенным суспензиям, содержащим большие скопления клеток и БЦ. Недостаток ацетана снижает вязкость культуральной среды и увеличивает вероятность коагуляции клеток и БЦ, что приводит к снижению выхода полимера (Ishida et al., 2002).

Отсутствие ферментов, гидролизующих целлюлозу в организме человека, и высокая кристалличность ограничивают применение биомедицинской и конверсионной биомассы полимера. Yadav и соавторы использовали генетически модифицированный штамм *G. xylinus* для получения модифицированной целлюлозы с улучшенной способностью к разложению *in vivo*. Целлюлозо-синтаза *G. xylinus* может использовать как UDP-глюкозу, так и UDP-N-ацетилглюкозамин (UDP-GlcNAc) в качестве субстратов. Присутствие GlcNAc делает БЦ чувствительным к лизоциму, а также нарушает высокоупорядоченную структуру кристаллической целлюлозы. Чтобы использовать эту особенность, оперон, содержащий три гена из *Candida albicans* для синтеза UDP-GlcNAc, был экспрессирован в *G. xylinus* для получения активированных цитоплазматических мономеров UDP-GlcNAc, доступных для синтазы целлюлозы, и для получения химерного полимера, содержащего как глюкозу, так и GlcNAc. Модифицированный полимер полностью разложился через 10 дней и совершенно не обнаружился через 20 дней. Исследование представило интересную разработку, демонстрирующую деградацию *in vivo* модифицированного биоматериала на основе БЦ (Lee et al., 2014).

Группа ученых под руководством Kawano клонировали 14,5 т.п.н. фрагментов ДНК, которые содержат гены, связанные с синтезом целлюлозы, в верхних и нижних участках оперона *bcs* в *A. xylinum* ATCC23769 и ATCC53582. Нуклеотидные последовательности в этих фрагментах содержат эндо- β -1,4-глюканазу, белок, дополняющий целлюлозу, субъединицы целлюлозосинтазы АВ, С и D и гены β -глюкозидазы. В течение семи суток культивирования выход

БЦ штаммом ATCC53582 практически в пять раз превысил выход штамма ATCC23769. Синтез БЦ продолжался штаммом ATCC53582 после того, как вся глюкоза была потреблена. Это говорит о том, что-либо глюконовая кислота использовалась в качестве источника углерода для производства БЦ, а не только как источник энергии, либо что путь гликонеогенеза может быть активирован. Это привело авторов к предположению, что ATCC23769 использует свою энергию для роста клеток, в то время как ATCC53582 использует свою энергию для производства БЦ (Kawano et al., 2005).

1.2.2 Физиолого-биохимические свойства и питательные потребности бактерий, продуцирующих бактериальную целлюлозу

Бактерии являются облигатными аэробами с метаболизмом дыхательного типа, не бродильного. Хемоорганотрофы окисляют этанол до уксусной кислоты, ацетат и лактат – до CO_2 и H_2O (табл. 2) (Ревин и др., 2014б).

Наилучшими источниками углерода для роста служат этанол, глицерол и лактат. Лактозу и крахмал не гидролизуют. Утилизируют маннитол и многие другие углеводы с образованием кислоты. Каталазоположительные и оксидазоотрицательные. Желатину не разжижают, индол и H_2S не образуют.

Оптимум pH культуральной среды для биосинтеза целлюлозы находится в диапазоне от 4,5 до 6,5. Выход целлюлозы при pH ниже 4,0 приводит к уменьшению ферментативной активности. Это связано с накоплением глюконовой, уксусной или молочной кислоты в культуральной жидкости. Поэтому весьма важно регулировать данный параметр во время культивирования микроорганизма. Температура также является важным параметром, который влияет на рост и образование целлюлозы. В большинстве экспериментов, максимальное образование целлюлозы наблюдается при температуре 28 °C – 30 °C (Aydogdu et al., 2018; Brown et al., 2013).

Питательная среда для производства БЦ должна содержать необходимое количество элементов: углерод, азот, фосфор, сера, соли калия и магния.

Углерод является необходимым элементом для роста клеток и производства целлюлозы.

Таблица 2 – Физиолого-биохимические признаки бактерий рода *Komagataeibacter* (Ревин и др., 2014б)

тип метаболизма	дыхательный
оксидаза	–
каталаза	+
образование индола	–
образование целлюлозы	+
окисление этанола	+
окисление уксусной кислоты	+
окисление лактата	±
рост при pH 3,2	+
утилизация цитрата натрия	±
разжижение желатины	–
рост в присутствии 0,35 % уксусной кислоты	+
рост в присутствии 30 % D-глюкозы	±
образование кислоты из этанола	+
D-глюкозы	+
D-ксилозы	+
сахарозы	±
фруктозы	±
лактозы	±
D-галактозы	±
маннозы	±
мальтозы	±
ксилозы	±
глицерина	+
образование из D-глюкозы кетоглюконовой кислоты	+

Для изучения влияния источника углерода в производстве целлюлозы, были использованы различные источники углерода: дисахариды (сахароза и

лактоза), моносахариды (глюкоза и фруктоза) и спирт (глицерин и маннит). *A. xylinum* культивировали с 50 г/л различных источников углерода, а затем определяли относительную производительность целлюлозы по сравнению с сахарозой (контрольная проба). По результатам исследований маннит показал самый высокий относительный выход (~ в 5 раз по сравнению с контрольным источником углерода). Тем не менее, влияние фруктозы (в 3,5 раза), глицерина (в 3 раза), глюкозы и лактозы (менее чем в 0,5 раза), также оказалось существенным (рис. 9) (Brown, 2007; Bae et al., 2004a).

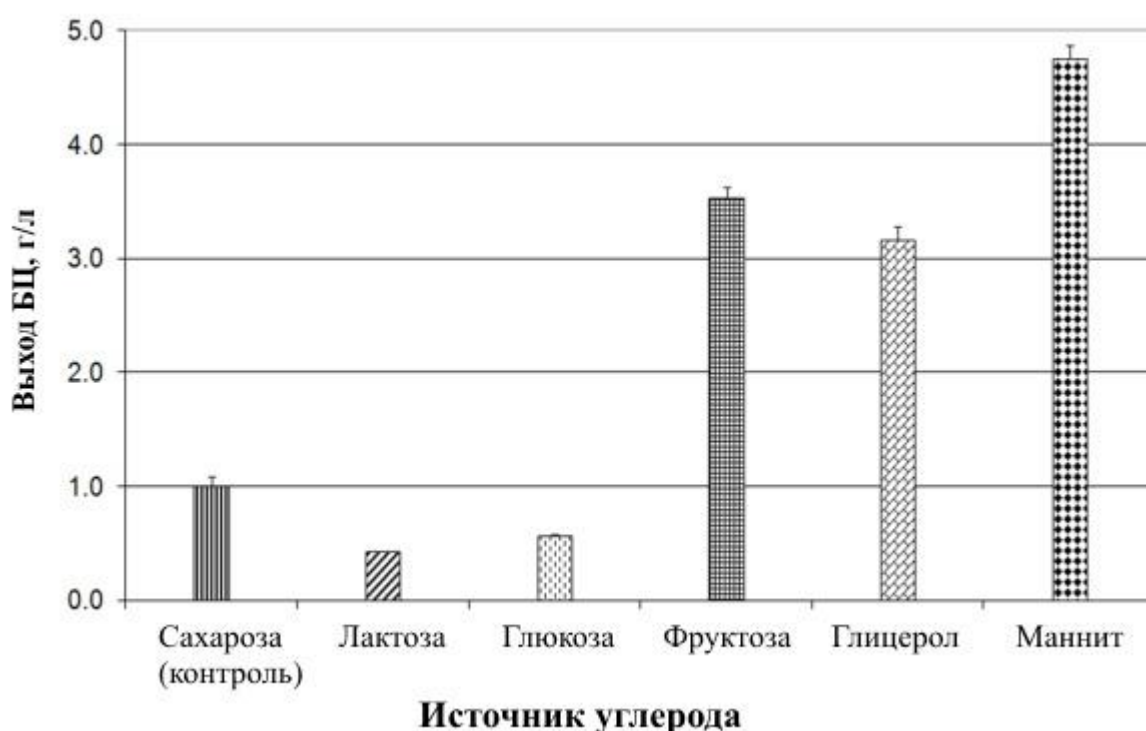


Рисунок 9 – Выход БЦ при культивировании с различными источниками углерода (Bae et al., 2004a)

Анализ показал, что различные типы источников углерода по-разному влияют на образование БЦ. Кроме того, эти результаты показали, что от дисахаридов (например, сахарозы и лактозы), не следует ожидать высокой доходности производства целлюлозы. Напротив, маннит, фруктоза, глицерин, по всей вероятности, более пригодны для синтеза целлюлозы. До сих пор во многих исследованиях сообщается, что производительность образования целлюлозы *A. xylinum* может быть увеличена добавлением разных источников

углерода, например, сахарного спирта (маннита и глицерина), фруктозы и глюкозы. Но в тоже время, большое количество глюкозы может ингибировать рост клеток и производство целлюлозы в связи с накоплением кетоглюконовой кислоты (низкий pH) (Bae et al., 2004a; Brown, 2007).

Согласно исследованиям Retegi, самый высокий выход целлюлозы – 5,65 г/л был получен на среде с фруктозой при общем потреблении сахара 95,57 %. Кроме того, значительное количество БЦ образовывалось с использованием смеси сахаров – 5,2 г/л. Это свидетельствует о высоком выходе целлюлозы – 17,72 г/г сахара по сравнению с 14,77 г/г фруктозы. Самое низкое количество БЦ – 1,1 и 1,75 г/л было получено на средах с ксилозой и глюкозой, соответственно, в то время как на средах с сахарозой и арабинозой достигнут относительно более высокий выход БЦ – 4,7 и 4,1 г/л, соответственно. Отклонение pH от оптимального значения 4-5 имело заметное влияние на биоцеллюлозное производство с одним источником сахара в среде. Тем не менее, окончательное значение pH в различных смесях сахаров составляло ~ 3,3–3,4, что практически не оказывало влияния на процесс биосинтеза (Retegi, Gabilondo, 2010).

На рисунке 10 показаны общая продуктивность образования БЦ и окончательное значение pH культуральной жидкости, полученной с использованием различного сырья, состоящего из простых сахаров и сахарной смеси. Согласно представленным данным, высокий выход БЦ 5,65 г/л был получен на среде с фруктозой, а самый низкий – 1,1 г/л на среде с ксилозой. Сахароза и арабиноза способствовали образованию БЦ в количестве 4,7 и 4,1 г/л, соответственно, в то время как на среде с глюкозой образовывалось в среднем только 1,75 г/л БЦ. Значение pH глюкозосодержащей среды, зафиксированное в конце процесса ферментации, составило 3,0, а pH 4,59 и 4,13 были зафиксированы в среде с фруктозой и сахарозой, соответственно (Brinchi et al., 2013; Castroa et al., 2011).

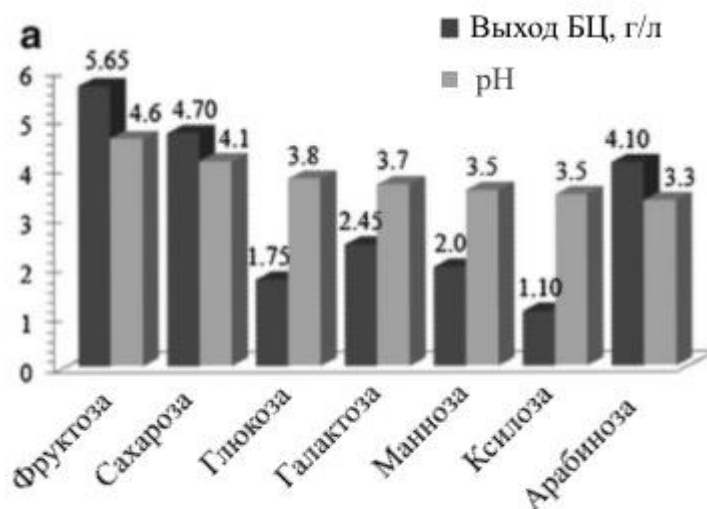


Рисунок 10 – Количество БЦ и конечное значение pH для различного сырья, использованного *G. xylinus* (ATCC 700178) при использовании различных сахаров (Brinchi et al., 2013)

Азот является основным компонентом белков, необходимых в метаболизме клеток и составляющих 8 % – 14 % от сухой массы клетки бактерий. Влияние различных источников азота на производство бактериальной целлюлозы также рассмотрим на примере культуры *G. xylinum*. Клетки культивировали в среде с сахарозой и различными источниками азота в количестве 5 г/л (дрожжевой экстракт, пептон, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, полипептон и гидролизат казеина). Среди изученных источников азота пептон / сульфат аммония или гидролизат казеина наиболее подходят для синтеза целлюлозы (табл. 3, рис. 11).

Таблица 3 – Влияние источников углерода (с начальной концентрацией 20 г/л) и азота (10 г/л) на производство целлюлозы культурой *G. xylinus* при статическом культивировании (на среде HS) (Castroa et al., 2011)

Источник углерода	Выход целлюлозы (г/л)	Источник азота	Выход целлюлозы (г/л)
маннитол	0.82 ± 0.03	кукурузный экстракт	1.07 ± 0.02
фруктоза	0.28 ± 0.02	пептон	0.85 ± 0.10
глюкоза	0.28 ± 0.01	дрожжевой экстракт	0.85 ± 0.05
сахароза	0.21 ± 0.01	мясной экстракт	0.75 ± 0.06
мальтоза	0.15 ± 0.01	солодовый экстракт	0.26 ± 0.04
глюкоза	0.07 ± 0.00		

Было также отмечено, что добавление метионина для культивирования *A. xylinum* стимулировало рост культуры, уменьшало время задержки и увеличило скорость производства целлюлозы (Brown, 2007; Chao et al., 2005; Basta et al., 2008).

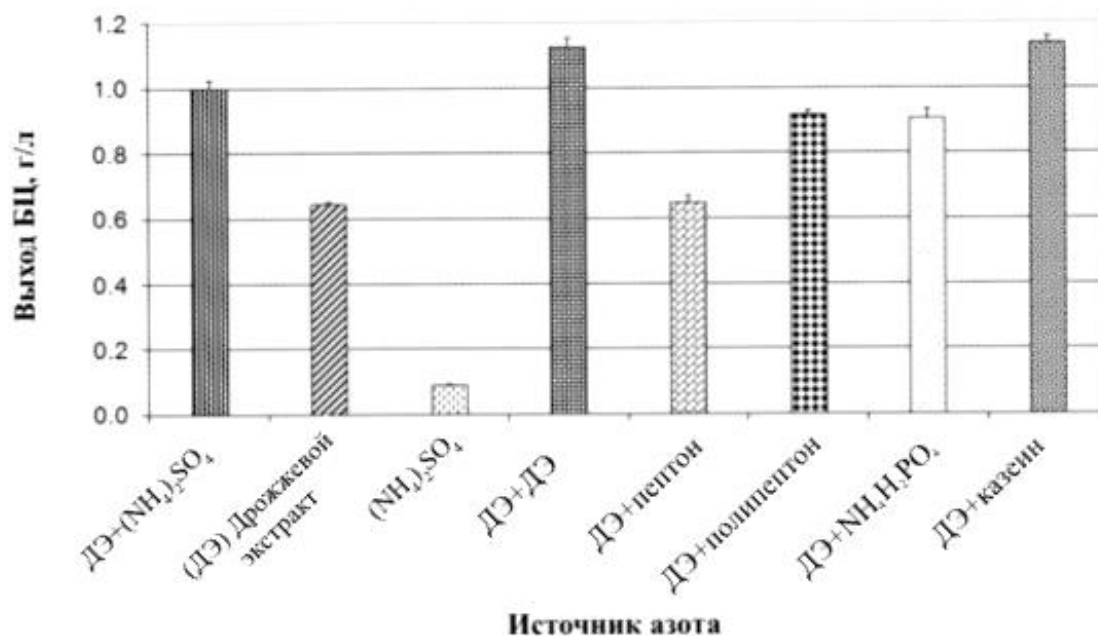


Рисунок 11 – Выход БЦ на средах с различными источниками азота (Castroa et al., 2011)

1.2.4 Механизм биосинтеза бактериальной целлюлозы бактериями

Модельным микроорганизмом для изучения процесса биосинтеза бактериальной целлюлозы является бактерия *Acetobacter (Gluconacetobacter, Komagataeibacter) xylinum* (Liu et al., 2018; Lee et al., 2014).

Целлюлозопродуцирующие бактерии, такие как *A. xylinum*, действуют в пентозофосфатном цикле или цикле Кребса, в зависимости от физиологического состояния клетки в сочетании с глюконеогенезом. Пентозофосфатный цикл включает окисление углеводов и цикл Кребса, а также окисление производных ацетата углеводов, жиров и белков, таких как оксалосукцинат и α -кетоглутарат. Однако *A. xylinum* не способен

метаболизировать глюкозу анаэробно, поскольку в ней отсутствует фосфофруктозо-киназа, которая необходима для гликолиза (Lee et al., 2014).

Биосинтез бактериальной целлюлозы является многоэтапным процессом с участием отдельных ферментов, каталитических комплексов и регуляторных белков. Он содержит четыре ключевых ферментативных этапа, когда глюкоза используется в качестве источника углерода (рис. 12):

I этап – фосфорилирование глюкозы глюкокиназой;

II этап – изомеризация глюкозо-6-фосфата (Glc-6-P) в глюкозо-1-фосфат (Glc-1-P) с помощью фосфоглюкомутазы;

III этап – синтез UDP-глюкозы (UDPGlc) с помощью UDPG-пирофосфорилазы (UGPase);

IV этап – реакция целлюлозосинтазы (Lee et al., 2014).

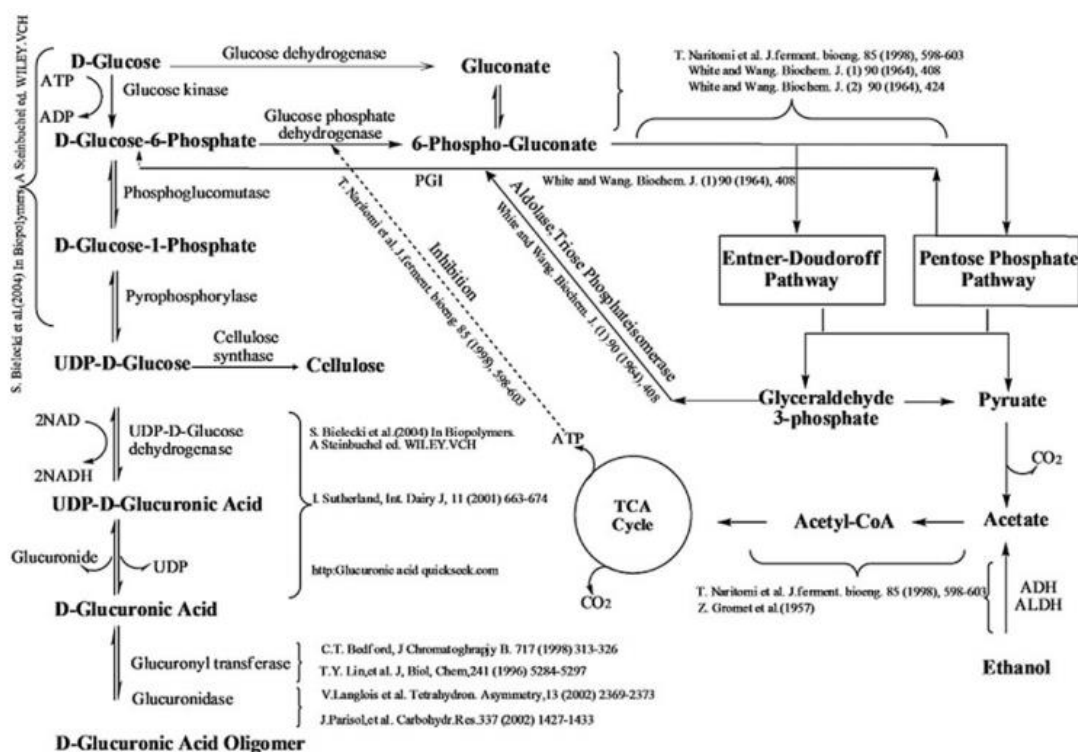


Рисунок 12 – Предполагаемый биохимический путь синтеза бактериальной целлюлозы (Huang et al., 2014)

UDPGlc, который распространен во многих организмах, является прямым предшественником целлюлозы. Считается, что UGPase играет важную роль в синтезе целлюлозы, поскольку она примерно в 100 раз более активна в

отношении продуцентов целлюлозы, чем бактерий, не продуцирующих целлюлозу. У бактерий биосинтез полимера начинается с гидролиза дисахаридов в моносахариды, такие как глюкоза и фруктоза. Хотя пути UDPGlc относительно хорошо известны, молекулярные механизмы полимеризации глюкозы в длинные и неразветвленные целлюлозные цепи до сих пор недоступны для ученых.

Циклическая дигуаниловая кислота (с-di-GMP) также играет важную роль в синтезе БЦ. Это аллостерический активатор для целлюлозосинтазы. В отсутствие с-di-GMP целлюлозосинтаза остается неактивной или проявляет низкую активность фермента с-di-GMP-связывающий белок является мембранным белком, который структурно связан с целлюлозосинтазой. 90 % клеточного с-di-GMP обратимо связано с с-di-GMP-связывающим белком. Равновесие между связанным и свободным с-di-GMP модулируется внутриклеточной концентрацией калия.

Целлюлоза синтезируется в микроорганизмах в две промежуточные стадии:

- образование 1,4-β-глюкановых цепей;
- сборка и кристаллизация целлюлозных цепей.

Этап, ограничивающий скорость, заключается в сборке и кристаллизации целлюлозы. БЦ образуется между внешней и цитоплазматической мембранами клетки. Молекулы целлюлозы сначала синтезируются внутри бактерий. Затем эти молекулы возвращаются через компоненты экспорта целлюлозы с образованием протофибрилл, диаметр которых составляет приблизительно 2–4 нм. Из этих протофибрилл собирается микрофибрилла в форме ленты (Lee et al., 2014).

Если рассматривать процесс биосинтеза бактериальной целлюлозы с точки зрения генетического аппарата бактерий, то данный полимер синтезируется опероном синтеза целлюлозы, который является функциональной единицей геномной ДНК, содержащей несколько генов. Оперон синтеза целлюлозы *Acetobacter* (ACS ABCD) и оперон синтеза БЦ

(ABC ABC) являются двумя гомологичными функциональными единицами, которые кодируют необходимые белки для синтеза целлюлозы в *A. xylinum* ATCC 53582 и 1306-3, соответственно.

Синтез целлюлозы, который синтезирует целлюлаза из UDP-глюкозы кодирует три (*acs AB*, *acs C* и *acs D*) или четыре (*bcs A*, *bcs B*, *bcs C* и *bcs D*) субъединицы (рис. 13) (Lee et al., 2014). Они составляют оперон, называемый *acs* (*acetobactercellulosesynthase*) (Deng et al., 2013).

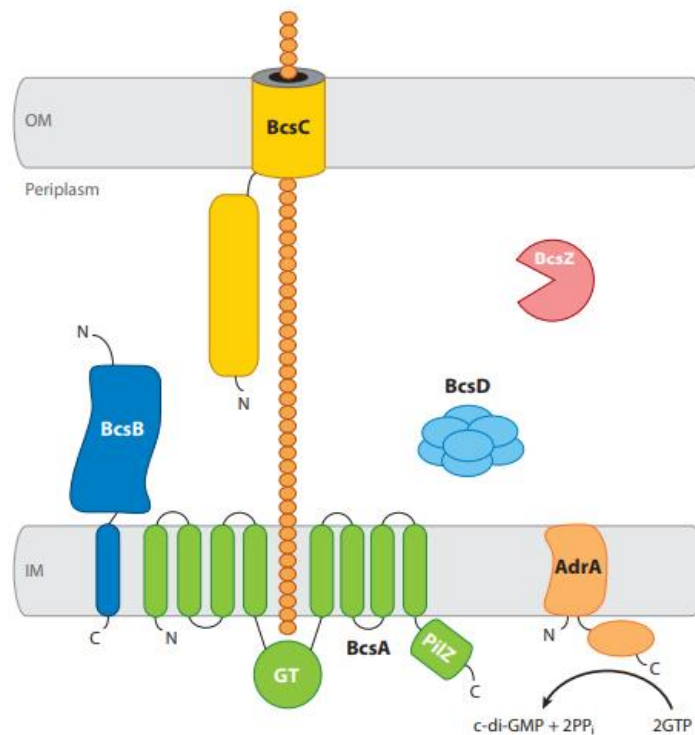


Рисунок 13 – Схематическое изображение субъединиц, кодирующих целлюлозосинтазу (McNamara et al., 2015)

Первый ген оперона *bcs ABCD*, *bcs A*, кодирует каталитическую субъединицу целлюлозосинтазы и связывается с UDPglc. Второй ген, *bcs B*, кодирует регуляторную субъединицу целлюлозосинтазы, которая связывается с *c-di-GMP*. Он также играет важную роль в качестве второго мессенджера и активирует процесс синтеза целлюлозы. *acs A* и *acs B* кодируют один полипептид, который имеет как субстрат-связывающие, так и активатор-связывающие области. Однако функции *ACS C/ BCS C* и *ACS D / BCS D* еще не

выяснены. *acsC*/*bcsC* кодирует белки, которые похожи на белки, участвующие в мембранных каналах или порообразовании, что говорит о том, что *acsC* / *bcsC* отвечают за образование пор для секреции целлюлозы. Что касается ACSD, то он контролирует кристаллизацию целлюлозы в нановибриллы. Исследователями было выдвинуто предположение, что ACSD может обеспечить проходы для экструзии цепей глюкоана (Lee et al., 2014).

Верхняя область оперона имеет два гена: *smcA*х и *ssrA*х соответственно (рис. 14). Белок *SMC*ах, который кодируется геном *smcA*х, кодирует эндо-β-1,4-глюканазу, которая обладает гидролизующей целлюлозной активностью. Он усиливает синтез целлюлозы. Однако функции *SMC*ах в биосинтезе целлюлозы не были определены. Исследователи предположили, что *SMC*ах *A. xylinum* может влиять на сборку целлюлозной ленты согласно электронно-микроскопическому анализу, который показал, что целлюлозные ленты, секретируемые из сверхпродуцирующего штамма *SMC*ах, были диспергированы по сравнению с таковыми из штамма дикого типа. Другим белком в верхней области оперона *acs* является *ssrA*х. Этот белок имеет важное значение для производства и улучшения производства БЦ. Белок, кодируемый *ssrA*х, выполняет функцию комплемента, но природу этой функции еще предстоит выяснить (Lee et al., 2014).

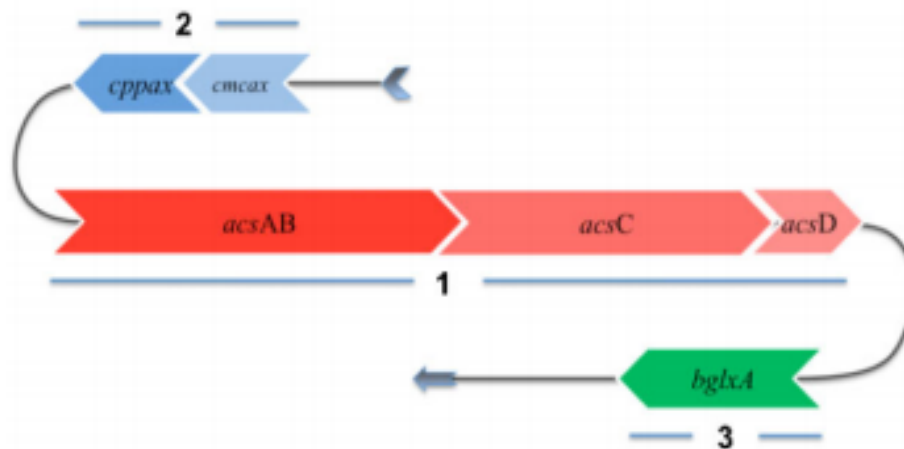


Рисунок 14 – Принципиальная схема, показывающая генетический путь *A. xylinum* ATCC 53582 (Lee et al., 2014)

Нижняя область оперона содержит ген *bglxA*, который кодирует β -глюкозидазу, которая гидролизует более трех β -1,4-глюкозных единиц. Было отмечено, что разрушение гена *bglxA* вызывает снижение выхода полимера (Lee et al., 2014).

Несмотря на значительное количество публикаций по молекулярным механизмам биосинтеза бактериальной целлюлозы, регуляторные механизмы этого процесса раскрыты не до конца (Lee et al., 2014).

Одна из гипотез состоит в следующем: полимеризация β -1,4-глюкановых цепей происходит при участии липидного интермедиата, глюкоза передается от UDP-глюкозы к молекуле липидов в плазматической мембране, в результате чего формируется липид-глюкозный интермедиат. Процесс происходит с помощью гликозилтрансферазы (Lee et al., 2014).

Существует и другая теория, предложенная Брауном и Саксенем (Brown and Saxena, 2000). Остатки глюкозы присоединяются к невозстанавливающему концу полисахарида, который выходит в периплазматическое пространство в процессе полимеризации (Lee et al., 2014).

Можно также говорить о том, что после завершения этой первой степени организации – формирования полимера – линейные цепочки собираются в нановолокна из 10–15 полимерных цепей и затем располагаются в микрофибриллы, а затем в пучки микрофибрилл. Группировка таких пучков приводит к образованию целлюлозных волокон толщиной 3–4 нм и шириной 70–80 нм. Данные волокна создают трехмерную сеть, которая стабилизируется посредством водородных связей. Данные связи устанавливают внутри- и межхимические связи между слоями целлюлозы, образуя толстую мембрану, характеризующуюся высокой механической прочностью в сочетании с высоким растяжением. Данные свойства позволяют материалу идеально облепать рану и активно использоваться в медицине. Схема данного процесса представлена на рисунке 15 (Portela et al., 2019).

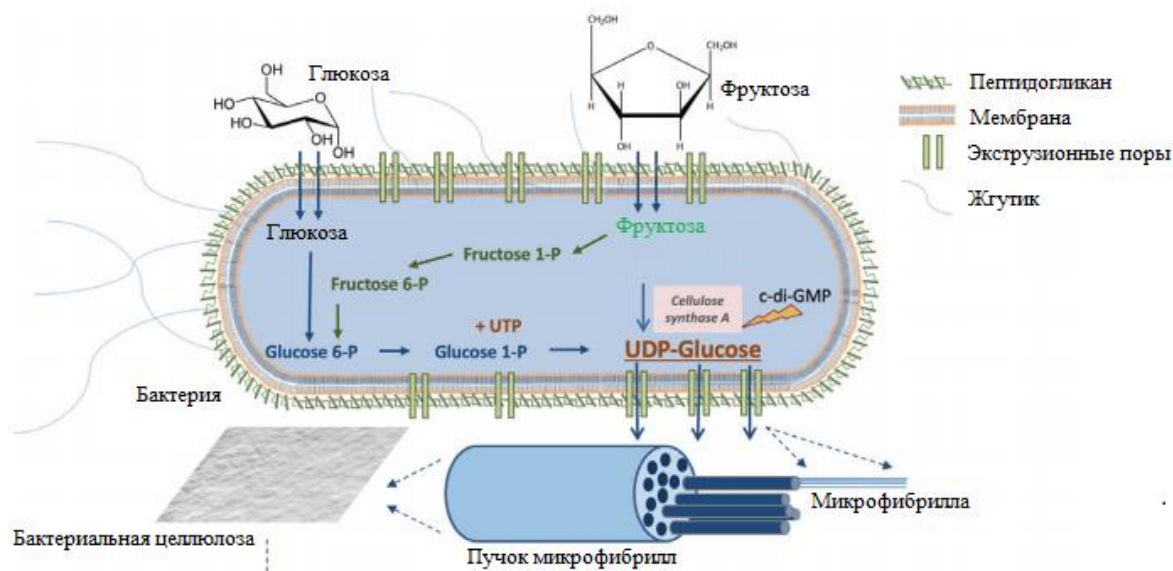


Рисунок 15 – Схематическое изображение этапов молекулярного механизма биосинтеза целлюлозы с использованием бактерий (Portela et al., 2019)

Важную роль в биосинтезе БЦ играет циклическая дигуаниловая кислота (c-di-GMP) – это аллостерический активатор синтазы целлюлозы *bcsA*. В ее отсутствие целлюлозосинтаза остается неактивной или проявляет низкую ферментативную активность (Portela et al., 2019).

G. xylinus выделяет не только нерастворимую в воде целлюлозу, но и ацетан – вязкий водорастворимый полисахарид, сходный по структуре с ксантаном. Он состоит из глюкозы, маннозы, глюкуроновой кислоты и рамнозы в соотношении 4:1:1:1. Ацетан синтезируется из уридиндифосфоглюкозы (УДФГ), которая также является исходным материалом для синтеза целлюлозы. Если ацетан не синтезируется, то, как предполагается, количество УДФГ для синтеза целлюлозы увеличивается. Был создан мутантный ацетан-несинтезирующий штамм EP1 от родительского штамма *G. xylinus* BPR2001. Однако синтез целлюлозы у этого мутанта уменьшился по сравнению с исходным штаммом. Ученые обнаружили, что культуральная жидкость EP1 стала гетерогенной суспензией, содержащей большие хлопья из слипшихся клеток и целлюлозы. Это может быть результатом того, что образующийся

ацетан делал культуральную среду более вязкой и тем самым предотвращал коагуляцию клеток и целлюлозы (Ullah et al., 2015).

1.3 Применение бактериальной целлюлозы

Экономическое и социальное развитие стран в значительной степени определяется более рациональным использованием доступных ресурсов с целью внедрения продуктов с добавленной стоимостью. Между тем спрос на новые технологии, требующие высокоэффективных материалов с превосходными свойствами, обусловлен нанотехнологиями. Параллельно с растущей потребностью в возобновляемых источниках энергии общество предъявляет все большие требования к экологичности устройств хранения энергии. Таким образом, также растет интерес к разработке биопродуктов, полученных из возобновляемых источников, и инновационных технологий обработки, которые могут снизить потребность в ископаемом топливе и стимулировать движение за устойчивые ресурсы (MuhdJulkapli and Bagheri, 2017).

Свойства бактериальной целлюлозы, а именно чистота, высокая степень кристалличности, высокая плотность, способность сохранять форму, способность связывать воду и большая площадь поверхности обуславливают использование данного материала в различных областях человеческой деятельности: медицине, косметологии, пищевой промышленности и т.д. (рис. 16) (Jozala et al., 2018; Sionkowska et al., 2020).

Если говорить о пищевой промышленности, то в мире существует потребность в создании новых пищевых добавок и ингредиентов, в том числе для создания продуктов с низким содержанием жира. Интерес к использованию растительной целлюлозы в комбинированных продуктах появился давно примерно с 60-х годов XX века. Идея, при этом, состояла в использовании растительной целлюлозы в качестве текстурирующего агента, наполнителя и натурального ингредиента низкой жирности (Shi et al., 2014).

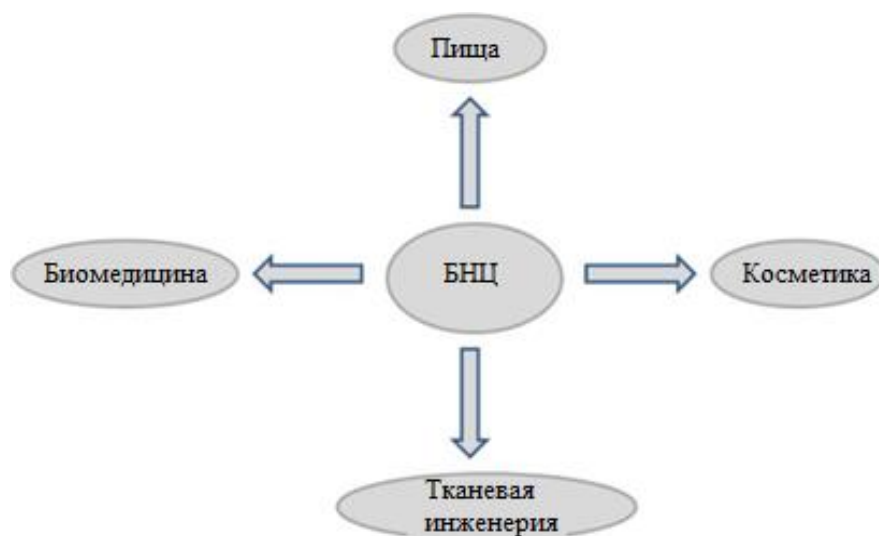


Рисунок 16 – Области применения бактериальной целлюлозы
(Sionkowska et al., 2020)

Одним из основных условий, позволяющих использовать тот или иной ингредиент в пищевой промышленности, является успешно пройденная продуктом токсикологическая оценка, доказывающая его безопасное влияние на организм человека. В связи с этим, стоит отметить, что токсикологические тесты, в том числе и БЦ, должны проводиться перед употреблением продукта человеком.

В последнее время большое количество токсикологических экспериментов, включая анализы острой, подострой и субхронической пероральной токсичности, доказали, что потребление БЦ не имело репродуктивной токсичности, эмбриотоксичности и тератогенности, а также воспалительной реакции у мышей. Кроме того, несколько исследований показали, что БЦ не генотоксична. Принимая во внимание ее давнюю историю потребления человеком в азиатских странах и ее использование в биомедицинских материалах, можно сделать вывод, что БЦ безопасна для применения в пищевой промышленности (Lin et al., 2020).

В связи с установленным выше фактом, БЦ была одобрена в качестве «общеизвестного безопасного продукта питания» Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) (Shi et al., 2014). При использовании

БЦ в качестве пищевого ингредиента одним из ее главных преимуществ является возможность использования для создания диетических продуктов, обусловленная ее неперевариваемостью человеком (Azredo et al., 2019). Кроме того, как и другие пищевые волокна, бактериальная целлюлоза оказывает благоприятное воздействие на желудочно-кишечный тракт (Fontana et al., 2017).

Пищевые волокна из злаков, фруктов и овощей обладают разнообразными питательными преимуществами, обусловленными положительным воздействием, как на тонкий, так и на толстый кишечник человека. Сообщалось, что кормление крыс растительной клетчаткой и БЦ в одинаковой степени способно увеличить выведение общих липидов (144 % – 182 %), холестерина (136 % – 203 %) и желчных кислот (259 % – 479 %) с калом. Тем не менее, эффективность использования БЦ в снижении содержания липидов и холестерина в сыворотке крови у хомяков была значительно выше, чем у растительной целлюлозы, что позволяет предположить, что БЦ является перспективным низкокалорийным наполнителем для разработки новых функциональных пищевых продуктов богатых клетчаткой (Lin et al., 2020).

При сравнении с другими пищевыми волокнами БЦ имеет ряд преимуществ:

- бактериальная целлюлоза, полученная путем микробиологического синтеза, является высокочистой формой целлюлозы и не требует жесткой химической обработки для выделения и очистки, как это необходимо для целлюлозы, полученной из растительных источников;

- в качестве питательной среды для роста и синтеза полимера путем *in situ* бактерии могут использовать фруктовые сиропы или соки. Таким образом, бактериальная целлюлоза, полученная, например, на фруктовых средах, может приобрести аромат и цвет исходного плода, который послужил основой для создания питательной среды. Это может позволить снизить использование пищевых добавок при производстве того или иного продукта;

- бактерии способны образовывать полимер в виде различных форм, обладающих различной текстурой – это могут быть пленки, многослойные

агломераты, нити, сферы, частицы и т. д. Данное свойство позволяет найти широкое применение полисахаридам, в том числе и в пищевой промышленности;

– благодаря своим волокнам наноразмерного масштаба, с тонкой трехмерной сетчатой структурой, БЦ обладает улучшенными свойствами, что позволяет использовать ее в новых процессах производства пищевых продуктов (Shi et al., 2014).

Таким образом, применение именно бактериального аналога в пищевой промышленности особенно перспективно. Основные области применения БЦ для пищевой промышленности представлены на рисунке 17.



Рисунок 17 – Применение бактериальной целлюлозы в пищевой промышленности (Azredo et al., 2019)

Бактериальная целлюлоза широко используется в пищевой промышленности в качестве загустителя для поддержания вязкости пищи и в качестве стабилизирующего агента. Благодаря своей уникальной текстуре и высокому содержанию клетчатки, бактериальная целлюлоза может стать компонентом многих пищевых продуктов. Наиболее известной добавкой является «Cellulon», который применяется как загуститель, текстурирующий агент и/или восстановитель калорий (Матуа, 2018).

Свойства и структура БЦ позволяют использовать ее даже при низких концентрациях, а также избегать вкусового взаимодействия, повышать стабильность пищевых продуктов в широком диапазоне рН, температур и условий замораживания-оттаивания.

БЦ может играть роль:

– загустителя: после добавления БЦ в пастообразную приправу клейкость приправы заметно улучшается, что упрощает ее использование;

– стабилизирующего агента: продукт, содержащий БЦ, может сохранять свою влажность не менее одного месяца во время хранения;

– желирующего агента: прочность геля тофу значительно увеличилась при добавлении 0,3 % БЦ. Было доказано, что БЦ улучшает текстуру, плотность и прочность, а также трещиностойкость. Модифицированный путем добавления бактериальной целлюлозы тофу лучше выдерживал процесс старения, и в большей степени удовлетворял требованиям сенсорной и органолептической оценки;

– суспендирующего агента: бактериальная целлюлоза, полученная в условиях динамического культивирования может быть добавлена в шоколадный напиток. Добавление полимера предотвращает осаждение какао, поскольку сеть волокон БЦ может удерживать частицы в себе. Кроме того, в ходе испытаний данный напиток показал большую стабильность после тепловой стерилизации, поскольку его вязкость осталась неизменной после термической обработки (Ullah et al., 2015).

Было предложено создание мясных аналогов на основе БЦ с экстрактом Монаскус. *Monascus purpureus* – это плесень, которая производит желтые, оранжевые и/или красные пигменты, а также антигиперхолестеринемические агенты, такие как монаколин и мевинолин. Ферментация привела к появлению окрашенных продуктов БЦ, на цвет которых повлияли источники углерода и азота, используемые для ферментации. Окрашенный композит был представлен в качестве сырья для новых функциональных продуктов питания, главным образом мясных аналогов. Цвет композита был достаточно устойчив к

промывке, автоклавированию, замораживанию или подкислению (Sheu et al., 2000).

Исследователи, занимающиеся данной разработкой, предположили, что аналог мяса, произведенный из комплекса *Monascus* – БЦ, будет иметь ряд преимуществ, а именно он будет содержать диетические волокна полимера. Пищевые волокна, как известно, способны снижать уровень холестерина, кроме того, полученный продукт может относиться к продуктам неживотного происхождения, что сделает его подходящим заменителем мясных продуктов для потребителей диетического питания и вегетарианцев (Ullah et al., 2016).

Таким образом, бактериальная целлюлоза может быть перспективной пищевой добавкой при производстве мясных продуктов (Хань, Громовых, 2010).

Пробиотики все чаще используются в пищевых продуктах, чтобы сбалансировать микрофлору кишечника и принести пользу для здоровья потребителей. Однако выживаемость пробиотиков при хранении и проходе через желудочно-кишечную систему, как правило, невелика (Azredo et al., 2019).

Фиалковский и соавторы иммобилизовали пробиотические штаммы *Lactobacillus spp* путем пропитки пленок БЦ пробиотическими бактериями и путем включения пробиотика в культуральную среду для синтеза БЦ. Второй способ оказался наиболее эффективным с точки зрения защиты пробиотика от воздействия желудочных соков. С другой стороны, этот подход несовместим с обычным методом, используемым для очистки БЦ после ферментации, который подразумевает выдержку полимера в растворе щелочи при температурах, обычно превышающих 80 °С, для удаления оставшихся клеток бактерий (Fijałkowski et al., 2016). Однако, исследование показало, что БЦ может быть использована в качестве иммобилизационной матрицы для клеток лактобацилл, защищая их от желудочного сока.

К сожалению, исследования с использованием пробиотических материалов на основе БЦ обычно сосредоточены только на влиянии

технологических параметров на выживаемость бактерий, но не на оценке способности БЦ высвободить пробиотические бактерии в кишечнике, где бы они могли играть свою роль. Для решения этих проблем необходимы дальнейшие исследования, поскольку эффективная функциональность любого пробиотического продукта зависит от того, как бактерии высвобождаются в месте их колонизации (Azredo et al., 2019).

БЦ также используют для иммобилизации ферментов, которые могут быть полезны в пищевой промышленности. Ферменты, которые уже были успешно иммобилизованы для контролируемого высвобождения из БЦ, включают липазу, лакказу и лизоцим (Bayazidi et al., 2018).

Пленки и покрытия на био-основе представляют собой мембраны, полученные из возобновляемых материалов, имеющие по меньшей мере два компонента: матрицу, которая обычно состоит из макромолекулы, способной образовывать когезионную сеть, и пластификатора, который обычно необходим для снижения хрупкости, присущей большинству матриц. В такие покрытия могут быть также добавлены и другие компоненты с целью улучшения барьерных, механических свойств или повышения их устойчивости к влаге. Иногда различные матрицы объединяются для получения материала с желательными свойствами (Azredo et al., 2019).

Исследования, касающиеся разработки и создания всевозможных упаковок пищевых продуктов, направлены либо на увеличение, либо на сохранение срока годности или безопасности продуктов. Антимикробные агенты, поглотители кислорода и этилена, влагоудалители и удалители загрязнений – все это активно используется при создании упаковочных систем для пищевых продуктов. Упаковочный материал должен быть прочным и сохранять барьерные свойства (Shi et al., 2014).

Съедобные пленки и покрытия обычно требуют дополнительной внешней упаковки по гигиеническим соображениям. В некоторые съедобные пленки могут быть добавлены вкусовые компоненты, такие как фруктовые пюре, и они

также могут быть применены в качестве закусок или оберток для суши и новых разновидностей сэндвичей (Otoni and Avena-Bustillos, 2017).

Будучи пищевым продуктом, БЦ может использоваться в качестве пленок и покрытий для пищевых продуктов.

Мембраны БЦ представляют собой разветвленную наноразмерную структуру с распределенными внутри пустотами, что позволяет захватывать другие компоненты (Malheiros et al., 2018).

Бактериальная целлюлоза и получаемые на ее основе композиты могут быть использованы для разработки гибкой, носимой, портативной, растягиваемой и переходной электроники. По данным Global Market Insights ожидается, что к 2024 году рынок композитов на основе наноцеллюлозы вырастет до 1 миллиарда долларов США. На рисунке 18 схематически показаны композиты на основе наноцеллюлозы, используемые в электронике (Nizam et al., 2021)

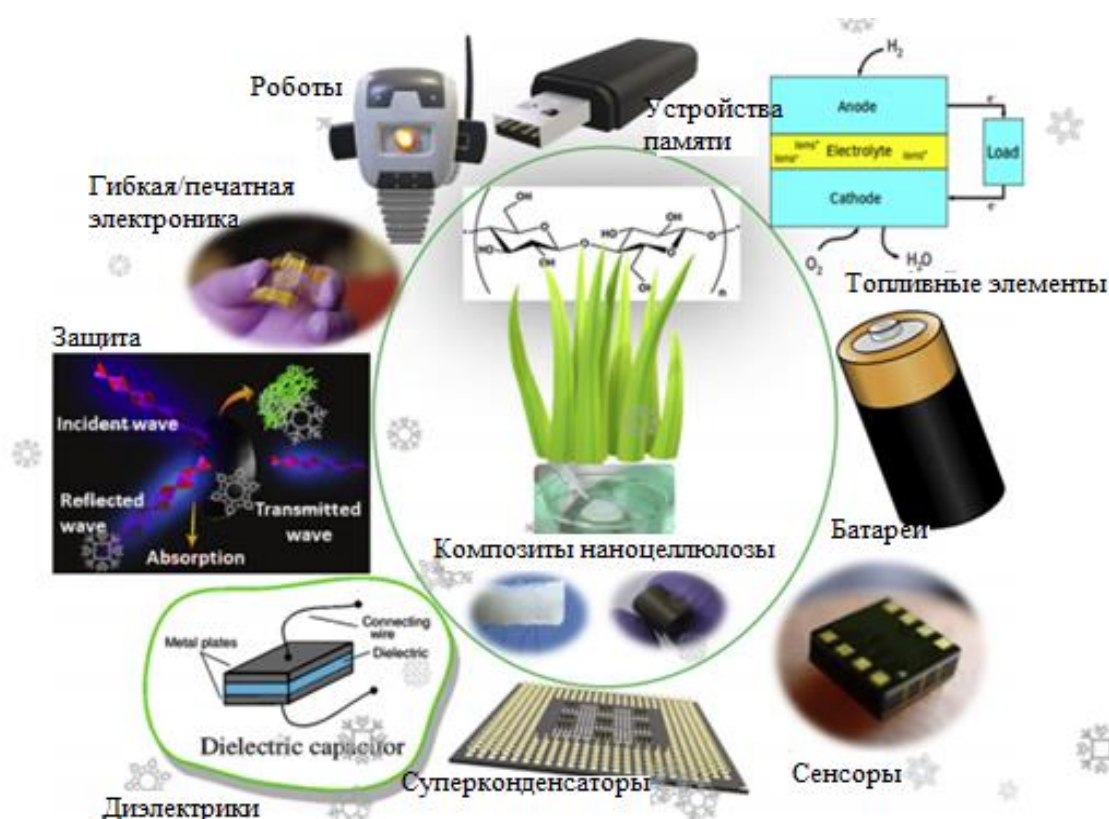


Рисунок 18 – Схематическое изображение композитов на основе наноцеллюлозы, используемых в электронике (Nizam et al., 2021)

Группа исследователей из Китая под руководством Y.Wan проводили ряд экспериментов по одновременному осаждению полианилина на поверхность нановолокон бактериальной целлюлозы и наноллистов графена. В результате был получен тройной композит с улучшенной электропроводностью. Была исследована зависимость морфологии, электропроводности и механических свойств бактериальной целлюлозы / графеновых наноллистов / полианилина от параметров обработки, таких как время реакции и температура. Результаты показали, что осаждение полианилина на нанокompозит бактериальная целлюлоза / графеновые наноллисты может быть многообещающим методом для получения бактериального наноллистого материала целлюлоза / графен / полианилин как электропроводящего нанокompозита для электромагнитного экранирования и материалов гибких электродов (Wan et al., 2018; de Amorim et al., 2020).

Xie и соавторы создали биосовместимый композит из бактериальной целлюлозы и гибкого проводящего полидофамина с двухпроводящей электронной и ионной емкостью. Этот композит был приготовлен путем автополимеризации дофамина в бактериальной целлюлозе в условиях нейтрального pH, что дает отличные характеристики для его использования в биологических электродах и гибких биосенсорах для медицинских устройств (Xie et al., 2018; de Amorim et al., 2020).

Однако наибольший интерес со стороны исследователей нанокристаллическая бактериальная целлюлоза имеет в медицине.

1.4 Получение биокompозиционных материалов на основе бактериальной целлюлозы

Одним из препятствий для эффективного использования БЦ является ограниченный поверхностный заряд и отсутствие функциональных групп для закрепления биологически активных соединений (Титок и др., 2007).

Вследствие надмолекулярной архитектуры полимера, организованной тесной сетью водородных связей, нерастворимость материала в воде, а также в обычных органических растворителях препятствует эффективной функционализации активных химических групп при сохранении его биосовместимости и трехмерной структуры. Следовательно, захват биологически активных соединений, таких как лекарственные средства, полиэлектролиты или белки, не происходит, что представляет собой актуальную проблему.

Чтобы преодолеть эти ограничения, было разработано несколько методов функционализации целлюлозы для добавления межфазных заряженных групп, биопознания, электростатического потенциала или проводимости, чтобы, в конечном счете, создать более желательный биоматериал для широкого применения (Guilherme Fadel et al., 2017).

Так, одним из способов улучшения свойств БЦ является получение композитов на ее основе.

Композит – это материал, который сочетает в себе, по крайней мере, два разных материала, с четкой границей между ними, приобретая дополнительные свойства своих компонентов. Как правило, целью производства композитных материалов является обеспечение базового материала свойствами (от армирования), которыми он сам не обладал и которые необходимы для конкретного применения. В большинстве случаев эти свойства не могут быть достигнуты с изолированным базовым компонентом. Фаза усиления, которая может состоять из волокон, частиц, листов (слоев), взаимопроникающих сетей или клеток, рассредоточенных в так называемой матрице или в непрерывной фазе (обычно той, которая представляет более высокий процент). Свойства композитов зависят как от природы используемых материалов, так и от степени связи между ними через поверхность раздела. Все виды материалов могут быть использованы для производства композитов от полимеров до керамики или металлов (Portela et al., 2019).

Композиционные материалы на основе БЦ могут быть синтезированы двумя основными способами: химической модификацией и адсорбцией (рис. 19). Химическая модификация БЦ может быть проведена при помощи гидроксильных групп глюкозы. Возможно сульфирование, окисление и силилирование целлюлозы (Tsouko et al., 2015).

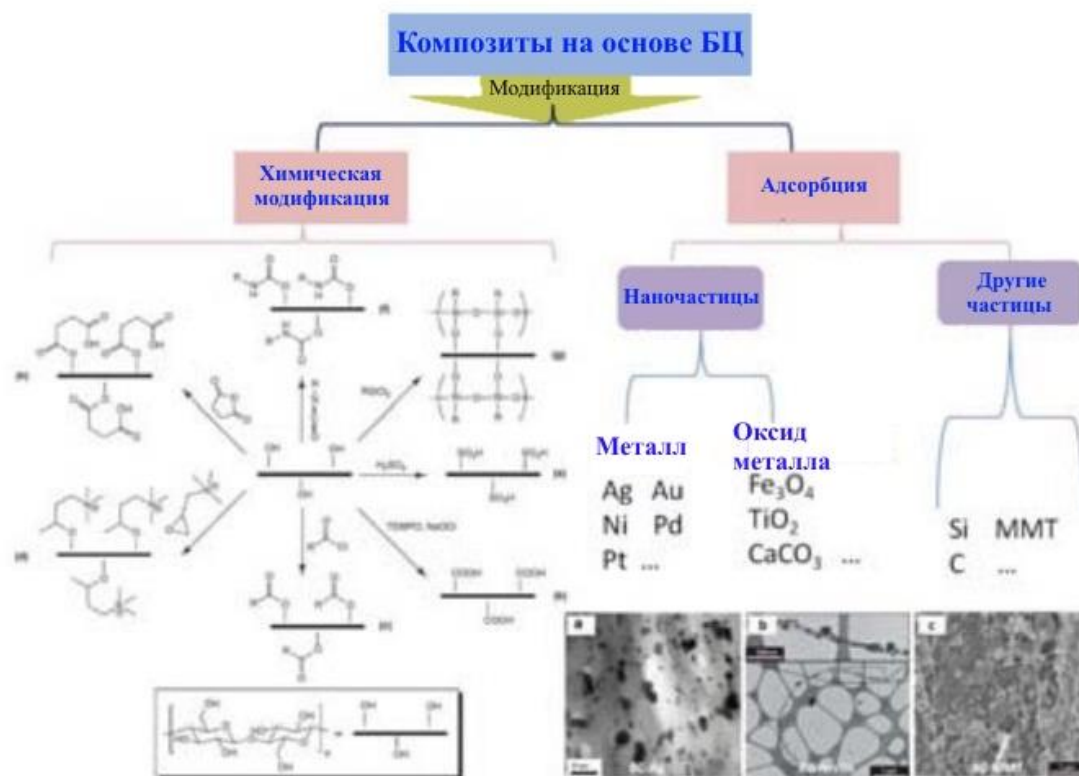


Рисунок 19 – Способы получения композитов на основе БЦ (Tsouko et al., 2015)

Также способы создания биокompозитов на основе бактериальной целлюлозы можно сгруппировать между собой в зависимости от типа техники: *in situ* и *ex situ* (Cacicedo et al., 2016).

Под получением композита путем *in situ* подразумевается добавление тех или иных компонентов в питательную среду во время культивирования бактериальной целлюлозы, с целью обеспечения материала новыми свойствами. Основная цель состоит в том, чтобы ввести новые свойства в матрицу путем изменения внутренних физико-химических свойств бактериальной целлюлозы. Эти «вспомогательные» молекулы, являющие

частью вводимых веществ, становятся частью нано- или микрофибриллярной сети БЦ, взаимодействуя обычно с многочисленными –ОН-фрагментами глюкозы, присутствующими в цепочках полимера, создавая новые взаимосвязанные водородные мостики. Для этих целей можно использовать широкий спектр материалов различной природы. Обычно выбирают гидрофильные и водорастворимые молекулы, но также были опубликованы некоторые отчеты с гидрофобными материалами.

Например, пленки БЦ получали в присутствии различных молекул, таких как Tween 80, гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ) и карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), среди прочих. Одной из основных целей этих модификаций было получение биополимерной пленки с улучшенной регидратационной способностью, что является одним из ограничений использования мембран полимера после сушки. Авторы описали межмолекулярные взаимодействия между волокнами БЦ и экзогенными молекулами путем объединения механизма гелеобразования двух различных молекулярных компонентов. Таким образом, полимеры с высокой молекулярной массой, такие как КМЦ и ГПМЦ, не могут попасть в кристаллическую зону между субфибриллами. Однако они могут модифицировать сборку микрофибрилл за счет стерических помех, избегая образования гибридных соединений между ними. Поэтому новые гибридные матрицы БЦ с ГПМЦ или КМЦ показали ослабленную и уменьшенную кристаллическую структуру, способствующую образованию более крупных аморфных областей, которые облегчают поглощение воды в процессе регидратации. Новые гибридные материалы БЦ приводят к образованию взаимопроникающих сетей, соответствующих модели I Морриса, которая включает в себя сеть, образованную активными полимерами, которые структурно взаимодействуют из-за переплетения двух сетей.

Чрезвычайно интересно, как синтез БЦ-композитов методом *in situ* можно понять, изучая межмолекулярные связи между БЦ-цепями и экзогенными молекулами. Описание взаимодействия между двумя полимерами,

образующими новую матрицу, было определено как взаимопроникающая полимерная сеть, в которой сеть образуется путем синтеза и сшивания БЦ с другим полимером (Cacicedo et al., 2016).

Получение композитов методом *ex situ* подразумевает модификацию бактериальной целлюлозы после ее получения и очистки. Наиболее часто используемый метод создания композита – это простое погружение чистой матрицы БЦ в раствор, где она может взаимодействовать с экзогенными молекулами, также называемыми вспомогательным материалом. Одним из наиболее важных моментов, касающихся этого метода, является то, что исходная БЦ сохраняет свою первичную структуру практически без изменений. Кроме того, только наноразмерные материалы могут быть импрегнированы в матрицу БЦ только посредством диффузионных механизмов, чтобы пройти через поры сети. Основным недостатком метода является обратимость процедуры, которая зависит не только от взаимодействия нанообъекта с матрицей БЦ, но и от физико-химических условий окружающей среды (Ullah et al., 2015).

1.4.1 Биокompозиты на основе бактериальной целлюлозы медицинского назначения

1.4.1.1 Гидрогели и аэрогели как перспективные материалы для медицины

Гидрогели представляют собой трехмерную сетчатую структуру, состоящую из сшитых полимерных цепей (рис. 20), которая обладает способностью поглощать растворы большого объема. Такая способность связана с наличием в структуре гидрофильных остатков ($-\text{OH}$, $-\text{CONH}-$, $-\text{CONH}_2-$ и $-\text{SO}_3\text{H}$), которые находятся на цепях мономера или боковых концевых цепях, что приводит к соответствующему осмотическому давлению (Fennell et al., 2019; Namidi et al., 2008). Количество впитываемой жидкости

может варьироваться от 10 % – 20 % до нескольких тысяч превосходящего массу самого гидрогеля в сухом состоянии (Гусев, 2005).

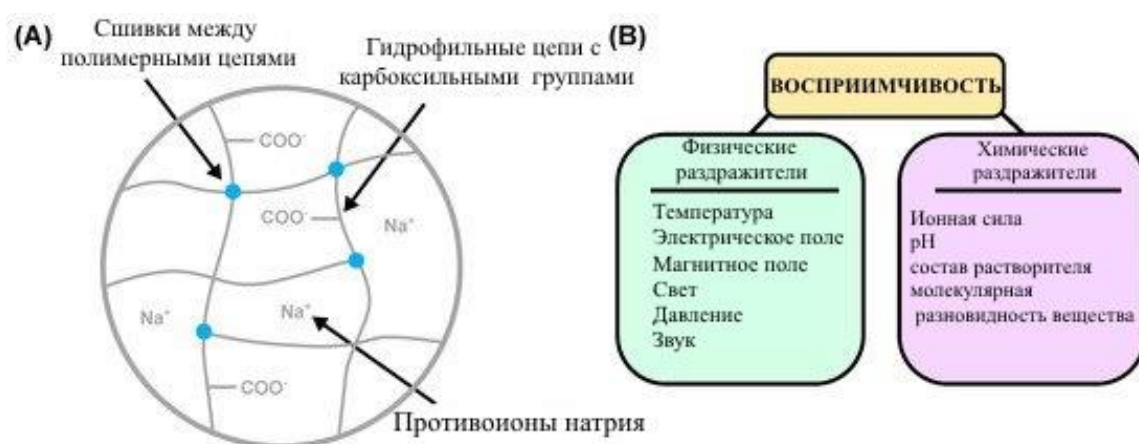


Рисунок 20 – Структура (А) и классификация (В) гидрогелей (Fennell et al., 2019)

Химический состав и молекулярный вес определяют плотность поперечных сшивок, которая, в свою очередь, влияет на набухание и величину пор геля. Кроме того, именно перекрестные сшивки определяют характеристики гидрогелей как твердого вещества, а не раствора, определяя эластичный ответ на натяжение (Гусев, 2005).

Классифицировать гидрогели можно по разным признакам: по природе боковых цепей, механическим и структурным особенностям, способу получения, физической структуре и т.д. (Hamidi et al., 2008).

По источнику получения гидрогели можно разделить на две категории: синтетические (первоначально синтезированные в лаборатории) и натуральные (полученные из природных ресурсов). Природные гидрогели могут иметь разную природу, например, быть белками (желатин, коллаген, фибрин и др.) или полисахаридами (например, альгинатом, гиалуроновой кислотой, хитозаном и агарозой). Природные гидрогели образуют сети посредством физических или ионных взаимодействий; между тем, синтетические гидрогели, которые включают полиэтиленгликоль (PEG), полиакриловую кислоту (PAA) и поливиниловый спирт (PVA), синтезируются посредством радикальной цепной

или ступенчатой полимеризации, и, следовательно, используют ковалентные связи в качестве сшивок (Ahmed, 2015; Mohamed et al., 2020).

В зависимости от полимерного состава гидрогели подразделяют на:

- гомополимерные (состоят из одного вида мономера, который является базовой структурной единицей. Гомополимеры могут иметь сшитую скелетную структуру в зависимости от природы мономера и метода полимеризации);
- сополимерные (состоят из двух или более видов мономеров, по крайней мере, с одним гидрофильным компонентом, расположенным в случайной, блочной или чередующейся конфигурации вдоль цепи полимерной сетки);
- мультиполимерные (состоят из двух независимых сшитых синтетических и / или природных полимерных компонентов. В мультиполимерном гидрогеле один компонент представляет собой сшитый полимер, а другой компонент – несшитый полимер) (Ahmed, 2015).

В зависимости от физической структуры выделяют гидрогели:

- аморфные (некристаллические);
- полукристаллические (сложная смесь аморфной и кристаллической фаз);
- кристаллические.

В зависимости от наличия или отсутствия электрического заряда, расположенного на сшитых цепях, гидрогели подразделяют на:

- неионогенные (нейтральные);
- ионные (катионные и анионные);
- амфотерные или амфолитические (содержат как кислотные, так и основные группы);
- цвиттер-ионные или полибетаины (содержат как анионные, так и катионные группы в каждом структурном повторяющемся звене) (Ahmed, 2015; Perras et al., 2000).

По внешнему виду гидрогели классифицируются в зависимости от технологии полимеризации. Они могут быть в виде матрицы, пленки или микросферы (Ahmed, 2015).

Получение гидрогелей осуществляется посредством процесса, известного как гелеобразование. Этот процесс состоит из связывания макромолекулярных цепей мономера с целью создания разветвленных цепей большего размера. Каркас этих полидисперсных растворимых разветвленных цепей называется «золь». Процесс связывания продолжает увеличивать размер сети с уменьшением растворимости и образованием полимера с конечными разветвленными цепями. Это образование структурированной сети известно как переход «золь-гель».

В зависимости от типа взаимодействий гелеобразование можно разделить на две отдельные категории – физическое или химическое. Химическое гелеобразование связано с образованием ковалентных связей между разветвленными цепями и всегда приводит к образованию прочного геля (т.е. постоянного и необратимого). Физическое гелеобразование может привести к образованию сильного или слабого геля, состоящего из физических связей (т.е. взаимодействий, таких как ионные, полярные или индуцированные дипольные взаимодействия) между полимерными цепями (Ahmed, 2015).

Аэрогели (от лат. aer – воздух и gelatus – замороженный) – класс мезопористых материалов, представляющих собой гель, в котором жидкая фаза полностью замещена газообразной (Девятаева, Пестов, 2019; Журавлев, Горожанкина, 2018).

Впервые аэрогели были получены почти 90 лет назад Кистлером. Однако само определение «аэрогель» до сих пор остается спорным.

Термин «аэрогель» долгое время использовался для материалов, полученных путем сверхкритической сушки, в то время как другие пористые золь-гелевые материалы, полученные с помощью испарительной и сублимационной сушки, назывались амбигелями или ксерогелями и криогелями соответственно. С открытием несверхкритических методов сушки, позволяющих производить материалы, которые сохраняют большую часть исходной микроструктуры гелей, определение аэрогеля сместилось в сторону определения, основанного на свойствах материала, а не на протоколе сушки. В

настоящее время любой материал низкой плотности золь-гелевого происхождения, преимущественно мезопористый, теперь считается аэрогелем (Zhao et al., 2018).

Аэрогели синтезируются в основном золь-гель процессом. Их состав и наноструктурирование контролируются путем управления параметрами химических реакций, а также с помощью ряда этапов обработки для получения сухого пористого тела в форме монолита или гранул. В основном это аморфные материалы, а не кристаллические.

Микроструктура аэрогелей образована сплошной непрерывной сеткой первичных и вторичных коллоидных частиц, связанных друг с другом либо путем конденсации или сшивания, либо путем образования и агрегации фибрилл из-за перестройки полимерных цепей или макромолекул (рис. 21). Что касается обработки геля, экстракция жидкости из полостей твердого влажного геля осуществляется с помощью методов, которые позволяют гелю высохнуть с низкими или минимальными структурными деформациями (Montes and Maleki, 2020).

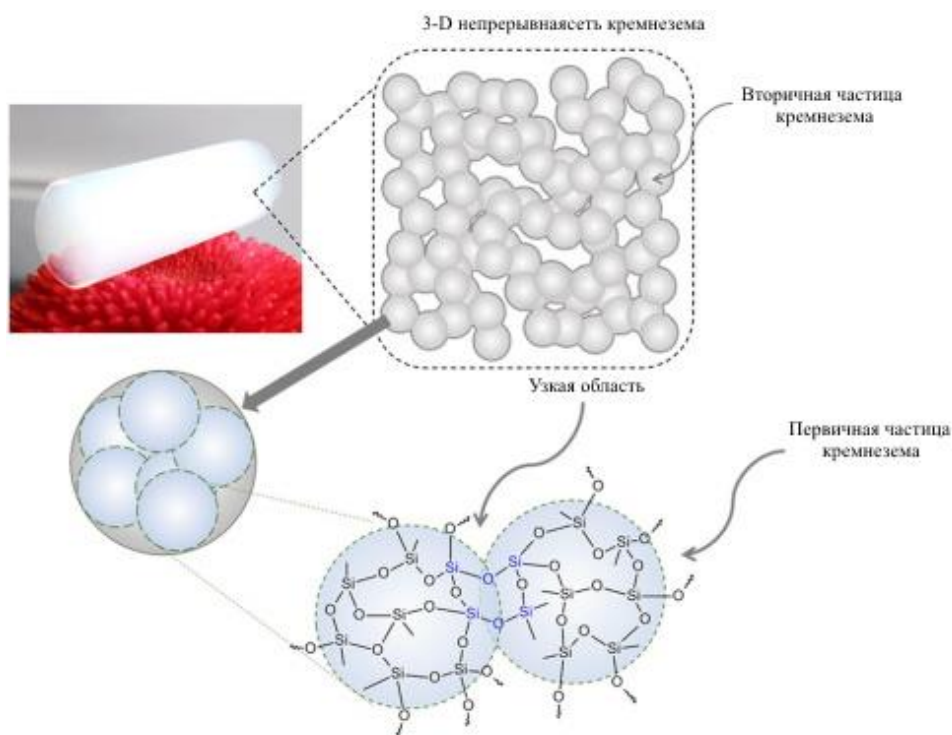


Рисунок 21 – Схематическое строение монолитного структурного кремнеземного аэрогеля (Montes and Maleki, 2020)

Уникальные физические свойства аэрогелей делают их весьма востребовательным материалом в промышленности.

Одно из самых интересных свойства аэрогелей – низкая плотность. Типичные значения плотности стабильных аэрогелей диоксида кремния составляют от 0,02 до 0,2 г на см³. Низкое соотношение веса и объема делает их универсальным материалом для множества применений.

Благодаря наличию непрерывных открытых микро- и мезопор в твердой фазе аэрогели имеют очень высокую удельную поверхность, составляющую около 300 – 1500 м²/г. Воздух или газ, содержащиеся в полостях аэрогеля, делают их хорошими теплоизоляторами и глушителями волн или вибраций.

Теплопроводность аэрогелей может иметь типичные значения от 0,005 до 0,1 Вт·м⁻¹·К⁻¹, сравнимые с теплопроводностью пенополистирола или полиуретана. Их звукопередача составляет около 100 м / с, что характерно для мягких полимерных пен (Montes and Maleki, 2020).

Стоит отметить, что аэрогели не лишены достаточной прочности: на разрыв прочность аэрогеля составляет 16 кПа, образцы аэрогелей выдерживают нагрузку, превышающую собственный вес в 2000 раз. Аэрогели гидрофобны и благодаря очень развитой наноразмерной внутренней пористой структуре они обладают высокой сорбционной способностью и, как уже упоминалось ранее, превосходными теплоизоляционными характеристиками (Девятаева, Пестов, 2019).

Существует несколько вариантов классификации аэрогелей: по природе исходных веществ, из которых получена аэрогель, по типу внутренней структуры аэрогеля, по пористости и размерам пор аэрогеля. По природе исходных веществ выделяют три большие группы: неорганические, органические и гибридные (рис. 22).

Неорганические аэрогели получают на основе диоксида кремния, металлов или их оксидов, органические – из различных природных и синтетических веществ органической природы.

Органические аэрогели менее рыхлые и хрупкие, не рассыпаются в порошок при деформации. Структура органических аэрогелей зависит от прекурсоров, растворителей и природы катализаторов, участвующих в золь – гель реакции. В формировании структуры аэрогелей огромную роль играют коагуляция и вид сушки, которые приводят к определенным усадкам объема по сравнению с объемом исходного раствора в кристаллизаторе (Девятаева, Пестов, 2019).



Рисунок 22 – Система классификации аэрогелей (Девятаева, Пестов, 2019)

Гибридные аэрогели представляют собой композитные материалы, включающие как неорганические, так и органические составляющие. Композиционные аэрогели обладают комплексом особых свойств. Так, аэрогели на основе бактериальной целлюлозы и полиакриламида обладают целым рядом уникальных функциональных свойств. Они имеют одновременно высокие показатели жесткости, эластичности и прочности при разных механических воздействиях, включая длительные циклические нагрузки в виде сжатия.

По типу внутренней структуры аэрогели можно разделить на кластеры первичных глобул, аэрогели с сетевой структурой и аэрогели с гибридной структурой. По пористости выделяют высокоплотные, среднеплотные и низкоплотные аэрогели. Существует также классификация аэрогелей по размеру пор, в соответствии с которой аэрогели могут быть разделены на нанопористые, мезопористые и макропористые (Девятаева, Пестов, 2019).

Производство аэрогелей сложно и многостадийно. Данный процесс включает в себя стадии образования основной матрицы, поры которой заполнены растворителем, и стадию сушки, от которой во многом зависит качество получаемого аэрогеля (рис. 23).



Рисунок 23 – Общая схема процесса получения аэрогелей
(Montes and Maleki, 2020)

После растворения исходного сырья, служащего для образования каркаса аэрогеля, в определенной среде и образования золя (коллоидного раствора) в

раствор прибавляют сшивающий агент, меняющий качества растворителя и ведущий к процессу гелеобразования – происходит сшивка макромолекул или сборка наночастиц в гель, в котором молекулы растворителя заключены в гибкую, но достаточно устойчивую трехмерную сеть (каркас будущего аэрогеля) (Девятаева, Пестов, 2019).

Естественная сушка для получения аэрогелей неприемлема, так как при такой сушке за счет капиллярных явлений из пор геля испаряется только небольшая часть жидкой дисперсной среды. Кроме того, структура геля не сохраняется из-за капиллярного давления, действующего на стенки пор. Другим методом сушки гелей, сохраняющей его структуру, является метод лиофильной сушки. Он включает в себя обезвоживание геля за счет возгонки жидкости из твердого состояния (лед) сразу в пар, избегая фазы воды, что может быть выполнено только в условиях вакуума. Таким образом, при таком способе сушки мы также избегаем влияния капиллярных сил на структуру геля (Девятаева, Пестов, 2019).

1.4.1.2 Дополнительные агенты, применяемые для создания биокompозитов

1.4.1.2.1 Хитозан

Хитин, поли (β -(1-4)-N-ацетил-D-глюкозамин) (рис. 24), представляет собой природный полисахарид большой важности, впервые идентифицированный в 1884 году. Этот биополимер синтезируется огромным количеством живых организмов, и учитывая количество ежегодно производимого хитина в мире, он является наиболее распространенным полимером после целлюлозы. Хитин встречается в природе в виде упорядоченных кристаллических микрофибрилл, образующих структурные компоненты в экзоскелете членистоногих или в клеточных стенках грибов и дрожжей (Rinaudo, 2006).

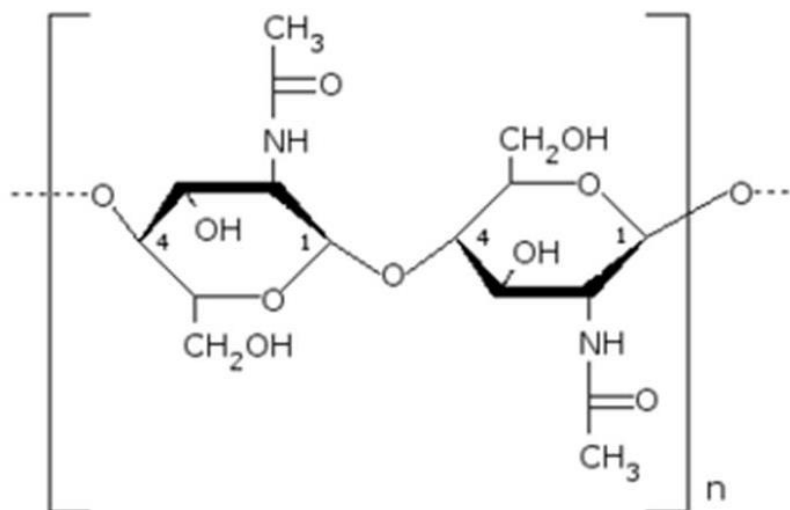


Рисунок 24 – Структура хитина (Younes and Rinaudo, 2015)

Пока что основными коммерческими источниками хитина являются раковины крабов и креветок. При промышленной переработке хитин экстрагируют кислотной обработкой для растворения карбоната кальция, а затем щелочным раствором для растворения белков. Кроме того, часто добавляют стадию обесцвечивания, чтобы удалить пигменты и получить бесцветный чистый хитин (Younes and Rinaudo, 2015).

Структурно можно обнаружить три различных полиморфа хитина:

- α -хитин, который соответствует плотно сложенной ромбической клетке, образованной чередующимися слоями параллельных и антипараллельных цепей;
- β -хитин, в котором полисахаридные цепи расположены параллельно, и межмолекулярные силы намного слабее, чем между цепями α -хитина;
- γ -хитин, с расположением двух параллельных и одного антипараллельного листа.

Из всех этих структур большинство природных хитинов имеют структуру α -хитина (Muxika et al., 2017).

Алломорфные формы хитина можно различить с помощью инфракрасной ЯМР-спектроскопии вместе с дифракцией рентгеновских лучей. В твердом состоянии хитиновые цепи собираются с помощью сети Н-связей, которые

контролируют растворимость, набухание и реакционную способность. α -хитин является изоморфом, что обуславливает его большую распространённость. Он встречается в клеточных стенках грибов и дрожжей, в сухожилиях лобстеров и крабов, а также в раковинах креветок, кутикуле насекомых. Помимо нативного хитина, α -хитин систематически образуется путем перекристаллизации из раствора хитина, биосинтеза *in vitro* или ферментативной полимеризации благодаря высокой термодинамической стабильности этой изоморфы (Younes and Rinaudo, 2015).

Более редкий β -хитин обнаруживается в связи с белками в загонках для кальмаров. Кристаллографические параметры двух изоморфов позволяют сделать вывод о том, что на α -хитин приходится две антипараллельные молекулы на элементарную ячейку, но только одна на β -хитин при параллельном расположении. В этих двух структурах цепи организованы в виде листов и удерживаются внутрипластовыми водородными связями. Кроме того, в α -хитине межслойные водородные связи предотвращают диффузию малых молекул в кристаллическую фазу. В кристаллической структуре β -хитина не обнаружены водородные связи между листами. Это может объяснить его набухание в присутствии полярных молекул (от воды до спирта и аминов), которые проникают в кристаллическую решетку, не нарушая организацию листа и кристалличность образца. Удаление молекулы позволяет нам вернуться к исходному состоянию безводного β -хитина. Реакционная способность изоморфа β -хитина больше, чем α -изоморфа, что важно для ферментативных и химических превращений хитина. Таким образом, формы α и β нерастворимы во всех распространенных растворителях. Эта нерастворимость является серьезной проблемой с точки зрения развития переработки и применения хитина (Chenite et al., 2000; Chenite et al., 2001; Molinaro et al., 2002).

Несмотря на то, что хитин обладает исключительными функциональными характеристиками, такими как биосовместимость, биоактивность, биоразлагаемость и высокая механическая прочность, он имеет ограниченную полезность из-за своей плохой растворимости (Philibert et al., 2017). Это делает

хитин не очень пригодным для использования. Хитин имеет больше применений при превращении в хитозан (Rinaudo, 2006; Younes and Rinaudo, 2015). Хитин может превращаться в хитозан с помощью ферментативных или химических процессов; однако химическое превращение является предпочтительным из-за его более низкой стоимости и пригодности для массового производства. Химическое деацетилирование включает обработку хитина гидроксидами при высоких температурах, обычно выше 80 °C (Muxika et al., 2017).

Хитозан представляет собой случайный сополимер, полученный в результате щелочного деацетилирования хитина, образованного d-глюкозаминными и N-ацетил-глюкозаминными звеньями, связанных β -1,4 гликозидными связями (рис. 25).



Рисунок 25 – Реакция деацетилирования при переходе хитина в хитозан (Muxika et al., 2017)

Соотношение между двумя единицами считается степенью деацетилирования (Muxika et al., 2017). Степень ацетилирования хитозана характеризуется молярной долей N-ацетилированных звеньев (DA) или в процентах от ацетилирования (DA %) (Younes and Rinaudo, 2015). Когда степень деацетилирования хитозана достигает 50 %, он становится растворимым в водных кислых средах. Когда хитозан растворяется в кислой среде, аминогруппы в цепочке протонируют, и полимер становится катионным, что позволяет ему взаимодействовать с различными типами молекул, превращая его в единственный катионный морской полисахарид. Считается,

что этот положительный заряд отвечает за его антимикробную активность благодаря взаимодействию с отрицательно заряженными клеточными мембранами микроорганизмов (Muxika et al., 2017).

Помимо очевидных биомедицинских применений, основанных на антибактериальных и антиоксидантных свойствах хитозана, селективные хелатирующие свойства также были описаны для железа, меди, кадмия и магния.

Растворимость хитозана обеспечивает возможность его получения во многих различных формах, таких как пленки, нановолокна, гидрогели или пасты, хотя некоторые применения в нерастворенной порошкообразной форме также были недавно изучены (Philibert et al., 2017; Verlee et al., 2017).

Хитозан образует меж- и внутримолекулярные водородные связи благодаря аминным и гидроксильным группам; следовательно, он имеет жесткую кристаллическую структуру. Хитозан обладает различной биологической активностью из-за обилия первичных аминогрупп в основной цепи хитозана. По этой причине хитозан широко используется в биомедицинских областях, таких как доставка лекарств и / или генов, а также в промышленных областях, таких как очистка воды (например, борьба с вредными водорослями), флокулянтов тяжелых металлов и функциональных пищевых продуктов (Choi et al., 2016).

Хитозан растворим в кислотном растворе, но нерастворим при естественных и щелочных значениях pH. Растворимость хитозана в значительной степени зависит от степени деацетилирования.

Кроме того, молекулярная масса (MW) хитозана и ионная сила раствора также влияют на его растворимость. Сообщая о химических свойствах хитозана, включая катионные свойства, Сэнфорд отметил, что высокая плотность заряда при $\text{pH} < 6,5$ образует гели с полианионами, прилипает к отрицательно заряженным поверхностям, хелатирует некоторые переходные металлы и легко подвержена химической модификации (Choi et al., 2016).

Молекулярная масса и степень ацетилирования являются двумя основными свойствами хитозана, которые влияют на его использование в качестве молекулы-матрицы для доставки лекарств. Эти свойства влияют на его растворимость в воде и гидрофобность, тем самым изменяя эффективность капсулирования лекарственного средства (Ahsan et al., 2018).

Хитозан широко используется в качестве адсорбента для красителей, переходных металлов и органических соединений, поскольку амино (-NH₂) и гидроксильные (-OH) группы в цепях хитозана могут служить координационными и реакционными центрами. Однако, как уже говорилось ранее, этот биополимер легко растворим в разбавленных кислотных растворах ниже pH (5,5±0,5), что является недостатком, когда хитозан используется в качестве адсорбента при удалении красителей в кислотных стоках. Одним из способов преодоления этого недостатка для практического применения является химическая модификация полимера методом сшивания. Хитозан может быть сшит с глутаральдегидом, эпихлоргидрином, этиленгликолем, диглицидиловым эфиром и триполифосфатом натрия. После сшивания материал сохраняет свои свойства и исходные характеристики, в частности, его адсорбционную способность (López-Cervantes et al., 2017; Yu et al., 2017). Такая модификация хитозана путем сшивки его тем или иным соединением позволяет использовать его в дальнейшем и для получения биокompозитов медицинского назначения в совокупности с другими биосовместимыми полисахаридами.

1.4.1.2 Фузидовая кислота

Фузидовая кислота – это стероидный антибиотик, полученный путем культивирования гриба *Fusidium coccineum* (Williamson et al., 2017). Данный антибиотик используется в клинической практике в Европе и Австралии с 1960-х годов для лечения инфекций кожи и кожных структур (SSSI), а также инфекций костей и суставов, вызываемых грамположительными организмами (Farrell et al., 2011).

Одной из важных особенностей фузидиевой кислоты является то, что ее можно вводить перорально, внутривенно или местно (Tomlinson et al., 2020). В частности, фузидиевая кислота для местного применения может вводиться в виде различных препаратов, включая формы мазей, кремов, лосьонов и гелей (Williamson et al., 2017).

Хотя химическая структура фузидиевой кислоты (рис. 26) аналогична цефалоспоринолу Р, в отличие от цефалоспоринов, фузидиевая кислота не действует на клеточную стенку, а действует как ингибитор синтеза белка, особенно в фазе трансляции.

Инструментально фузидиевая кислота действует через четыре фазы: инициацию, удлинение, транслокацию и высвобождение. Все четыре фазы участвуют в синтезе белка и активируются четырьмя белками (IF-2; фактор инициации-2; EF-Tu; фактор элонгации, термостабильный EF-G; фактор элонгации-G и RRF; фактор рециклинга рибосом). Более того, все четыре белка обладают активностью GTPase, и, если какой-либо белок подавляется, он автоматически блокирует синтез белка. Кроме того, фузидиевая кислота соединяется с EF-G-GDP, который «прыгая» на рибосому, в конечном итоге препятствует синтезу белка, подавляя транслокацию развивающегося полипептида, идентичную репроцессингу субъединиц рибосомы (достижению стоп-кодона на мРНК) (Borg et al., 2015).

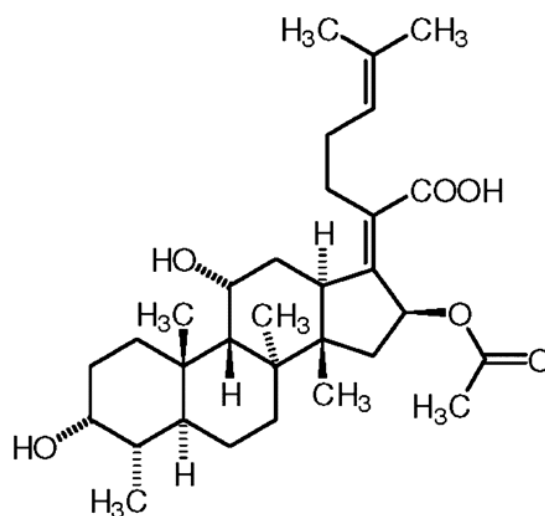


Рисунок 26 – Химическая структура фузидиевой кислоты (Farrell et al., 2011)

Во время первой фазы преждевременная пептидная цепь ограничивается рибосомой в сайте Р, в то время как тРНК с другой аминокислотой перемещается в сайт А. EF-Tu, первый белок GTPase из Р-сайта, переносит преждевременный пептид в А-сайт с гидролизованным GTP-переходом к нему. Затем, во второй фазе, преждевременный пептид соединяется со свежей аминокислотой в сайте А. Комплекс тРНК вместе с недавно созданным пептидом должен переносить один кодон аминокислот на мРНК и дополнительно сдвигать тРНК-пептид на Р-сайт. В продолжение, на стадии третьей фазы пептидной цепи мешает EF-G, связанный с GTP, сопровождаемый тРНК, выведенной из А-сайта. Примечательно, что отказ от сайта А способствует переходу тРНК в сайт А для переноса дополнительной аминокислоты и завершения цикла синтеза пептида.

Точно так же к стадии транслокации также присоединяется гидролиз EF-GGTP с образованием EF-G-GDP. Он осторожно фокусируется EF-G, чтобы гарантировать отсутствие проскальзывания, которое могло бы вызвать неправильный перевод во время растяжения пептидной цепи. Наконец, на четвертой фазе пептиды прочно перемещаются в сайт Р, EF-G легко высвобождает GDP и в конечном итоге уходит из рибосомы. Цикл пептидной цепи, слияние и удлинение продолжают до достижения стоп-кодона на мРНК (Chen et al., 2010).

В настоящее время EF-G, связанный с дополнительным белком GTPase, RRF, собирает разделенные рибосомные субъединицы, таким образом, ответственные за выделение пептида и мРНК свежей формы. Кроме того, на этапе транслокации фузидиевая кислота связывается с EF-G-GDP, что в конечном итоге не позволяет EF-G выделяться из уже ограниченного GDP, поэтому комплекс EF-G-GDP не может освободить Р-сайт рибосомы (рис. 27).

Фузидиевая кислота имеет умеренное сродство к свободному EF-G-GTP или EF-G, следовательно, допускает различное окружение гидролиза GTP до блокирования EF-G-GDP на рибосоме (Jyoti et al., 2020).

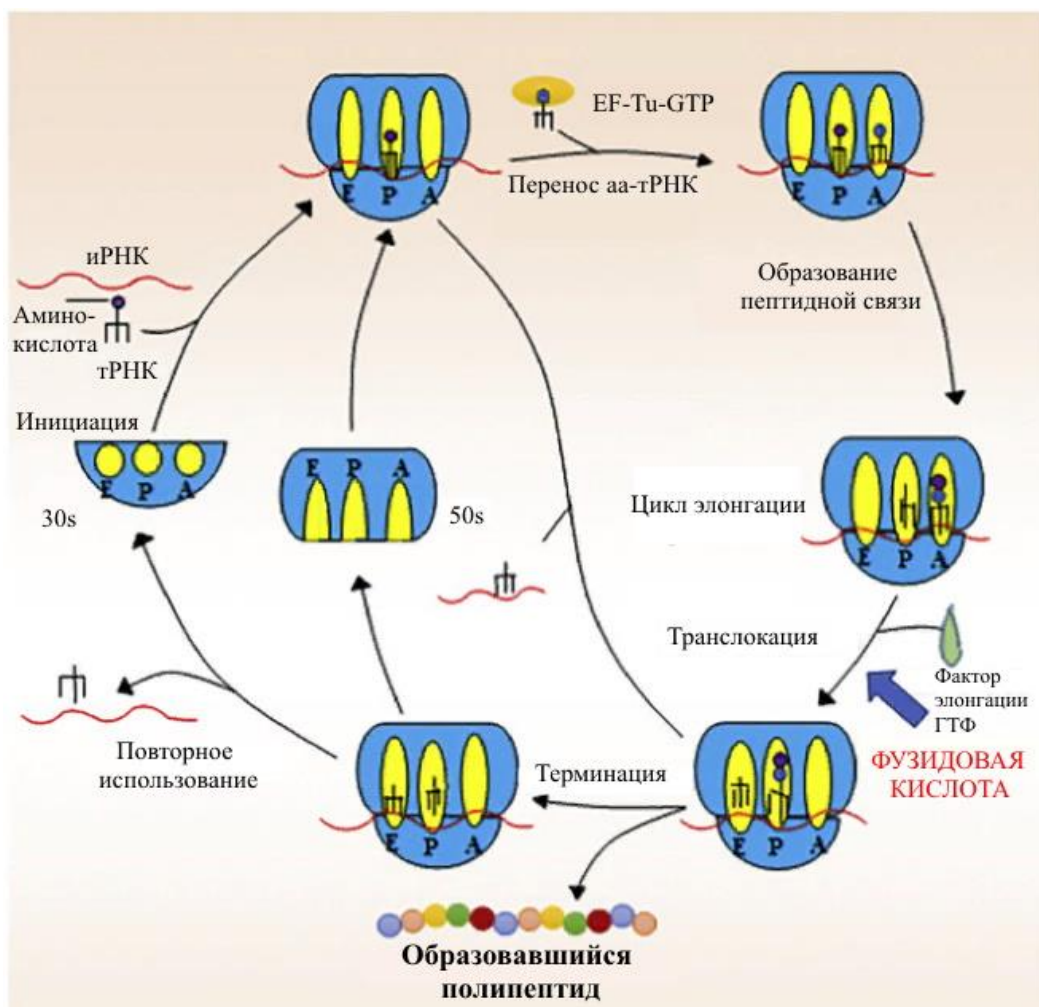


Рисунок 27 – Механизм действия фузидовой кислоты (Jyoti et al., 2020)

1.4.1.3 Использование биокompозитов на основе бактериальной целлюлозы в медицине

Как уже отмечалось ранее, наибольший интерес со стороны исследователей бактериальная целлюлоза имеет в медицине. Возможность прямого управления процессом биосинтеза полимера, биосовместимость, повышенная влажность и отсутствие токсичности позволяют использовать БЦ в процессах заживления хронических ран и ожогов. Помимо раневых покрытий и повязок, бактериальная целлюлоза изучается как материал, имеющий большой потенциал, при создании искусственных кровеносных сосудов, хрящей, сердечных клапанов и тканевой инженерии (рис. 28) (de Amorim et al., 2020; Esa et al., 2014).

Заживление ран – это длительный процесс, поэтому наука стремится помочь человеку ускорить процесс выздоровления, подготовив новое поколение повязок для ран.



Рисунок 28 – Перспективные направления использования БЦ в медицине (Sanyang et al., 2017)

Повязки на раны обладают способностью впитывать экссудат в процессе заживления. Доступные на рынке повязки (например, марля) имеют некоторые недостатки. Одним из основных недостатков является прилипание повязки к сухой ране, что приводит к повторному повреждению травмированного участка. Интерес к использованию БНЦ при перевязке ран растет. Исследования БНЦ показывают, что этот биоматериал подходит для восстановления кожных тканей и способствует их заживлению. БНЦ для восстановления кожных тканей может быть получена путем многослойной ферментации, что показывает низкую цитотоксичность и высокую пролиферацию стволовых клеток, полученных из жировой ткани человека. Эксперименты, проведенные на животных, подтвердили, что ткань регенерируется быстрее на биоматериале, полученном на основе БНЦ. Более того, наблюдается более быстрое формирование капилляров в области раны (Sionkowska et al., 2020).

В тканевой инженерии наиболее важным вопросом является восстановление двух основных слоев кожи – эпидермиса и дермы. БНЦ чаще всего используется для реконструкции кожи по сравнению со всеми типами целлюлозы, потому что она имеет некоторое сходство с мягкими тканями. Также в этом случае ключевую роль играет способность удержания влаги, что является очень большим преимуществом для этого типа тканевой инженерии. Дополнительными преимуществами БНЦ являются эластичность, прочность и пластичность, а также модуль Юнга.

Первые отчеты об использовании БНЦ для лечения кожных ран в качестве «временных заменителей кожи» для лечения ожогов, язв, ссадин и других повреждений кожи были опубликованы в 1990 году. Комбинация БНЦ с другими биологически активными молекулами может улучшить адгезию и, кроме того, рост клеток кожи на целлюлозе. Примером является улучшение адгезии мембран кератиноцитов человека и целлюлозных пленок путем обогащения этих пленок хитозаном. Интересной комбинацией является также включение кератина, полученного из человеческих волос, в БНЦ. Было подтверждено, что эта комбинация прикрепления, пролиферации и морфологии кератиноцитов кожи человека линии клеток HS2 и фибробластов кожи человека линии клеток Detroit 562.60 БЦ и желатина оказывает положительное влияние на улучшение адгезии и пролиферации человеческих кератиноцитов и их проникновение в каркас. Эксперимент, проведенный на мышах, четко показал, что комбинация БЦ-желатин (93 %) лучше закрывает раны, чем чистая БЦ (63 %) (Sionkowska et al., 2020).

БЦ можно рассматривать как подходящий биоматериал, поддерживающий регенерацию кости. Было показано, что БЦ оказывает влияние на рост остеобластических клеток, высокий уровень щелочной фосфатазы и более выраженное образование костных узелков.

Недавно была предложена новая идея, а именно включение апатита козьей кости в БЦ. Таким образом, были приготовлены новые биоматериалы для восстановления костей, которые могут стимулировать пролиферацию

костных клеток и способствовать дифференцировке клеток (Sionkowska et al., 2020).

БЦ может использоваться в качестве носителя лекарственных средств в медицине и косметологии. Ожидается, что из-за своей наноразмерной трехмерной сети БЦ будет содержать большое количество активных ингредиентов, что приведет к огромному соотношению площади поверхности к объему. На доклинической стадии и стадии разработки сообщаемые препараты, которые были включены, включают либо небольшие молекулы (диклофенак, октенидин, лидокаин), либо макромолекулярные вещества, такие как полимерные препараты, пептиды или белки (альбумин, лакказа, липаза). Краткое изложение наиболее важных классов препаратов, изученных для загрузки БЦ, и потенциальных применений показано на рисунке 29. Наиболее часто упоминаемые применения для доставки лекарств на основе БЦ основаны на дермальном / трансдермальном, пероральном и стоматологическом введении с предпочтением противомикробных, противовоспалительных препаратов, белков (ферментов, факторов роста), анальгетиков и местных анестетиков (Pötzing et al., 2017).



Рисунок 29 – Обзор наиболее важных классов препаратов, входящих в состав бактериальной наноцеллюлозы, с потенциальными возможностями применения (Pötzing et al., 2017)

Выбор метода загрузки лекарственного средства для определенного применения должен основываться на физико-химических характеристиках лекарственного средства, включая молярную массу, растворимость, стабильность на каждой стадии процесса, терапевтическую дозу и предполагаемый профиль высвобождения лекарственного средства. Кроме того, на процедуру загрузки лекарственного вещества могут влиять тип БЦ – влажная, полусухая (например, прессованная или дренированная) или лиофилизированная. Также учитываются модификация БЦ и используемый штамм бактерий.

Несмотря на существенную структурную изменчивость загруженных лекарств в отношении размера, гидро- / липофильности и стабильности, опубликованные стратегии загрузки лекарственного средства для БЦ практически сопоставимы и до сих пор весьма ограничены. Как показано на рисунке 30 можно различить методы загрузки *in situ* (во время синтеза) и *ex situ*, т.е. после синтеза (Pötzing et al., 2017).



Рисунок 30 – Обзор общих стратегий загрузки лекарств, применяемых для бактериальной нанокристаллической целлюлозы (Pötzing et al., 2017)

Целлюлоза содержит значительное количество пор, проницаемых для веществ с молекулярной массой до 100 кДа (с диаметром (20 – 100 нм) × (10 – 100 нм)). Такая макропористость волокна делает его уникальным по своей сорбционной способности. В набухшем состоянии она имеет уникальную по величине суммарную внутреннюю поверхность до 100 м²/г, что вместе с гидрофильными свойствами основной массы волокна-целлюлозы делает его исключительно ценным по санитарно-гигиеническим свойствам.

Кроме того, сообщается, что молекулы хитозана могут проникать в БЦ, образуя трехмерную многослойную структуру каркаса, и что она демонстрирует лучшую биосовместимость, чем чистый целлюлозный полимер (Piasecka et al., 2018).

Периодатное окисление, как следует из литературных данных, приводит к возникновению дополнительного количества трещин и каналов, что также увеличивает до определенного значения, возможность поглощения дополнительного количества хитозана при иммобилизации.

Появился еще один эффективный метод улучшения пленок с желаемыми свойствами, а именно сшивка. Полимер с интегрированной сеткой может быть получен с помощью процесса сшивания, в котором полимерные цепи связаны между собой ковалентной или нековалентной связью. Как правило, биоматериалы на основе хитозана сшиваются с помощью проверенных подходов, таких как использование сшивающих агентов, процесс термического отверждения и ультрафиолетовое облучение (Liang et al., 2019).

Учеными из Таиланда были получены композиты на основе БЦ, альгината и желатина, с добавлением в качестве пластификатора глицерина. Внешний вид изготовленных композитов напоминал нативную пленку БЦ, но обладал улучшенной пластичностью, повышенной гибкостью, более высокой способностью поглощать воду и лучшей биосовместимостью. Было обнаружено, что такой композит противостоит разрыву при прочности на вытягивание шва в гидратированном состоянии. Тесты на цитотоксичность *in vitro* показали, что пленка была цитосовместимой. Исследование клеток с

использованием культуры кератиноцитов человека продемонстрировало улучшенную адгезию, распространение и пролиферацию клеток на данном композите. Таким образом, можно сказать, что полученный биокомпозит обладает значительным потенциалом для использования в биомедицинских целях, в частности при лечении кожных заболеваний, регенерации кожных тканей и заживлении ран (Chiaoprakobkij et al., 2019).

Также известно о получении нового композиционного материала в аэрогельной форме на основе БЦ, содержащего желатин и сшитого глутаровым альдегидом. Такие композиты имели правильную сотовую структуру с равномерным распределением пор и большой площадью поверхности. Также они имели очень высокую пористость от 94 % до 95 % и отличную способность к набуханию в диапазоне от 3000 % до 3150 %. В полученные композиты дополнительно вносили антибиотики для придания им антибактериальных свойств. Результаты показали, что полученные губки БЦ проявляют превосходную антибактериальную активность, благодаря чему они имеют большой потенциал в различных антибактериальных применениях, особенно при создании раневых покрытий (Ye et al., 2019).

Исследователями из Сантьяго были разработаны новые антимикробные 3D-печатные гидрогели альгината / бактериальной целлюлозы с синтезированными *in situ* медными наноструктурами, имеющими улучшенную пригодность для печати. Полученные гидрогели можно использовать при создании раневых покрытий (Palza et al., 2019), благодаря их уникальным свойствам.

1.4.2 Использование бактериальной целлюлозы для очистки воды

В последние десятилетия сорбенты разрабатывают из различных материалов. Однако не все сорбенты активно используются, так как являются дорогостоящими и имеют ряд недостатков, которые препятствуют их применению (Guven et al., 1999). В последнее время большой интерес вызывают

сорбционные материалы на основе природных полимеров, таких как целлюлоза, хитозан, альгинат и т.д. благодаря их уникальным свойствам (Astrini et al., 2015).

Очистка сточных вод с использованием адсорбентов на основе целлюлозы была разработана как альтернатива энергоемкой и дорогой технологии, основанной на коммерческой адсорбции на основе активированного угля. Немодифицированная целлюлоза обычно не обладает хорошими адсорбционными характеристиками, поэтому ее необходимо специально адаптировать для обеспечения селективного и улучшенного взаимодействия для положительного результата. Существенные и фундаментальные характеристики целлюлозы включают ее гидрофильность, способность к функционализации и легкость настройки различных свойств, таких как площадь поверхности, соотношение сторон, эффекты квантового размера, а также химическая доступность. Исходя из вышеизложенного, наноцеллюлоза была признана превосходным адсорбентом природного биоматериала (Shak et al., 2018).

Фтор – это основной загрязнитель окружающей среды, получаемый как из естественных, так и из антропогенных источников (Jiang et al., 2021). 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. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) установила строгий предел для питьевой воды в 1,5 мг/л, но, несмотря на растущую озабоченность по поводу этой формы загрязнения воды, разработка эффективных технологий обеззараживания фтором остается проблемой.

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 фтора (Mezzenga et al., 2019).

Различные адсорбенты для удаления фторида были получены из отходов процесса производства квасцов (Nigussie et al., 2007), необработанного гидратированного оксида алюминия (УНА) и термически обработанного гидратированного оксида алюминия (ТНА) (Shimelis et al., 2006), композитного материала оксид алюминия-оксид марганца (Alemu et al., 2014), активированный оксид алюминия (Kumar et al., 2020), модифицированный боксит (Alhassan et al., 2020), нетрадиционные адсорбенты (летучая зола, модифицированный порошок коры нима и биоуголь из рыбьей чешуи) (Khandare et al., 2021), наноманитно-модифицированный активированный уголь (Takmil et al., 2020), пористая гидроксипатитовая керамика (Nijhawan et al., 2020), магнезия адсорбент гидроксипатит (Mondal et al., 2015), наноразмерный гидроксид алюминия ($Al(OH)_3$) и природный цеолит (Gómez-Nortigüela et al., 2013).

Композиты на биологической основе были исследованы исследователями как перспективные адсорбенты. Был проведен ряд работ с использованием бамбукового угля в качестве адсорбента для удаления фторидов. Активированный бамбуковый уголь, пропитанный железом-алюминием, и зола кокосового волокна, пропитанная алюминием, также были исследованы в исследованиях по удалению фторидов. Однако из большого количества представленных сорбентов для удаления фторид-ионов из воды все они малоэффективны (Revin et al., 2021).

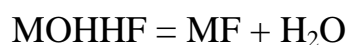
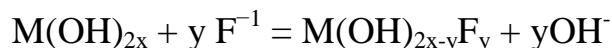
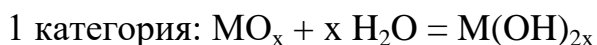
Фактически, адсорбция для удаления ионов фтора с использованием активированного оксида алюминия широко рассматривается Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) как наилучшая доступная технология. Несмотря на это, адсорбционная способность активированного оксида алюминия обычно ограничивает промышленное применение данного сорбента.

С 2010 года интенсивные исследования подтвердили, что гидроксильные группы на поверхности адсорбента могут служить доминирующими адсорбционными центрами, которые могут легко объединять фторид-ионы в растворах фторидов. Что касается механизма адсорбции, есть две схожие особенности:

- гидроксигруппы способствуют образованию водородных связей с ионами фтора на поверхности материала в водном растворе;

- легированные разновидности металлов (Al, Mg, Fe), как типичные твердые кислоты, обычно обладают сильным взаимодействием с твердым основным фторидом (F⁻) посредством гидроксиперехода (Huang et al., 2020).

Обычно задействованный механизм дефторирования можно кратко разделить на две категории, где М – это Zr, Mg, Fe, Al и т. д:



Подводя итог описанному выше механизму, можно сказать, что гидроксильные группы из разных источников, безусловно, играют значительную роль в адсорбции фторидов. Соответственно, усиление распределения гидроксильных групп на поверхности материала считается наиболее приемлемой стратегией для улучшения характеристик адсорбентов (Huang et al., 2020).

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Объектами исследования являются штаммы продуценты бактериальной целлюлозы *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) sucrofermentans* В-11267 и *Komagataeibacter hansenii* В-12950, выделенные из чайного гриба и «индийского риса», соответственно, путем многоступенчатого скрининга на кафедре биотехнологии и биохимии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» (Патент № 2523606; Патент № 2681281), *Komagataeibacter xylinus* В-12429 и *Komagataeibacter xylinus* В-12430, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов, а также бактериальная целлюлоза, полученная в условиях статического и динамического культивирования, и биокомпозиты, полученные на ее основе.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Условия культивирования продуцентов БЦ

Исходным посевным материалом являлась культура на скошенной 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 бактерии выращивали на среде NS 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 питательной среды. Культивирование осуществляли в шейкере-инкубаторе при 250 об/мин и температуре $28\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3-6 суток. Режим стерилизации: 121°C в течение 20 минут.

Культивирование бактерий и получение бактериальной целлюлозы производили на жидкой среде с мелассой в концентрации 50 г/л, бардой и среде NS в условиях статического (без перемешивания) и динамического (в шейкере-инкубаторе) культивирования.

2.2.2 Приготовление препаратов для микроскопии

Для изучения морфологических свойств бактерий готовили фиксированные микроскопические препараты, окрашенные по Граму и красителем метиленовым синим.

При окраске бактерий по Граму на предварительно обезжиренных и высушенных предметных стеклах делали мазки. Препараты подсушивали на воздухе, фиксировали над пламенем горелки и окрашивали в течение 1-2 мин кристаллическим фиолетовым, затем краситель сливали, не промывая мазок водой, обрабатывали его 1-2 мин раствором Люголя до почернения. Сливали раствор Люголя, препарат обесцвечивали 96% раствором этилового спирта, быстро промывали водой и дополнительно окрашивали 1-2 мин водным фуксином. Краситель смывали водой, препарат высушивали на воздухе.

При окраске бактерий метиленовым синим на предварительно обезжиренных и высушенных предметных стеклах делали мазки. Препараты сушили на воздухе, фиксировали над пламенем горелки и окрашивали красителем в течение 1-2 мин, затем краситель смывали водой и препараты сушили на воздухе.

Микроскопирование препаратов осуществляли с помощью биологического микроскопа для лабораторных исследований Primo Star (Carl

Zeiss, Германия) при увеличении в 1000 раз и с помощью светового микроскопа DM2500 M «Leica» (Швейцария).

2.2.3 Описание морфологии колоний

При описании морфологии колоний использовались стандартные признаки. Морфологию колоний изучали с помощью стереомикроскопа для лабораторных исследований Stemi DV4 «Carl Zeiss» (Германия).

2.2.4 Определение состава жирных кислот

Состав жирных кислот (ЖК) в липидах исследуемых штаммов определяли на газовом хроматографе GC-2010 Plus «Shimadzu» (Япония) с капиллярной колонкой HP-FFAP длиной 50 м, диаметром 0,32 мм, толщина пленки 0,5 μm производства фирмы «Agilent Technologies» (США). Использовался программный комплекс Shimadzu GCsolution.

2.2.5 Проведение молекулярно-генетических исследований

Выделение, очистку ДНК, определение Г+ Ц в составе ДНК проводили по стандартным методикам. Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК у штаммов проводили в ФГБУ «ГосНИИгенетика» по стандартным методикам.

2.2.6 Очистка и определение количества бактериальной целлюлозы

Полученную БЦ трехкратно обрабатывали 0,1 N раствором NaOH при 80 °C в течение 30 мин для удаления клеток и компонентов среды. От раствора щелочи целлюлозу отмывали 0,5 % раствором уксусной кислоты и дистиллированной водой до нейтральной реакции.

Количество полисахарида определяли весовым методом, путем высушивания до постоянной массы при температуре 60 °С на весах II класса точности (Lin et al., 2014; Wu et al., 2009).

2.2.7 Определение рН

Определение рН культуральных жидкостей проводили потенциометрическим способом (в основе которого лежит зависимость равновесного потенциала электрода от активности (концентрации) определяемого иона) на рН-метре S-220 Sevencompact (MettlerToledo, Швейцария).

2.2.8 Определение концентрации сахаров в среде

Содержание сахаров в среде определяли при помощи высокоэффективного жидкостного хроматографа LC-20A (Shimadzu, Япония) с УФ-детектированием (254 нм). Хроматографическая колонка 250x4.6 мм Supelcosil LC-NH₂, 5 мкм (США). Анализ проводили в градиентном режиме при расходе элюента 1 мл/мин и температуре термостата колонки 40 °С. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил в концентрации 75 %.

Для отделения целлюлозы проводили центрифугирование культуральной жидкости на высокоскоростной центрифуге Sorvall RC-6 Plus (ThermoFisher, США) при 10 000 об/мин в течение 15 мин. Полученные образцы разводили в 5 раз дистиллированной водой и полученный раствор повторно центрифугировали при тех же условиях. Супернатант смешивали с ацетонитрилом в соотношении 1:3 и центрифугировали на лабораторной центрифуге CM-50 (ELMI, Латвия) при 10000 об/мин в течение 5 минут (Miller, 1959).

2.2.9 ИК-спектроскопия

ИК-Фурье-спектры регистрировали на ИК-спектрометре IRPrestige-21 (Shimadzu, Япония) в средней инфракрасной области 4000-400 см⁻¹. В качестве образцов использовали очищенную и лиофильно высушенную на установке FreeZone (Labconco, США) целлюлозу.

Для приготовления образцов, целлюлозу растирали с KBr (2 мг БЦ на 100 мг KBr) и прессовали в таблетки. Спектр чистого KBr вычитали из полученных спектров.

Индекс кристалличности бактериальной целлюлозы рассчитывался согласно формуле 1 (Ciolacu et al., 2011):

$$ИК = \frac{A_{1430}}{A_{993}} \quad (1)$$

2.2.10 Рентгеноструктурный анализ

Степень кристалличности определяли методом рентгеноструктурного анализа на рентгеновском дифрактометре EMPYREAN (PANalytical, Netherlands) с детектором PIXcel3D на отражение в фильтрованном излучении медного анода. Лиофильно высушенные образцы, представляли собой квадратные пластины размером 30x30 мм.

Для исключения дополнительного рассеяния от подложки использовался стандартный держатель для прочных пленок. Таким образом, вклад в общее рассеяние определялся только рассеянием воздухом.

Измерения проводились с использованием двухкоординатного детектора PIXcel 3d, работающего в режиме линейного сканирования (255 пикселей на стрип) с разрешением 0,013 град/стрип. Общее время съемки 1 образца не превышало 100 минут.

Качественный фазовый анализ проводился с использованием программы HighScore Plus и базы данных PDF-2.

Степень кристалличности БЦ рассчитывали по формуле 2:

$$X = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \% \quad (2)$$

где I_{002} – суммарная интенсивность кристаллического пика 002;

$I_{002} - I_{am}$ – интенсивность кристаллического пика 002 за вычетом фонового сигнала.

2.2.11 Метод компьютерной микротомографии

Для морфологического анализа полученных биокomпозитов использовали микрорентгеновский томограф Skyscan 1172 («Bruker», Брюссель, Бельгия). Разрешающая способность: рентгеновского микротомографа от < 0,8 до 30 мкм; размер объекта: диаметр сканирования – 50 мм, длина объекта до 70 мм. Размер исследуемых образцов – 50×20×10 мм.

2.2.12 Сканирующая электронная микроскопия

Для установления и анализа структуры биокomпозиционных материалов использовали растровый электронный микроскоп Hitachi Tabletop SEM TM, 3000 (Hitachi High – Technology Corp., Токио, Япония) при увеличении 30х, 100х, 200х, 400х, 800х и 1500х. Для получения фотографий на сканирующем электронном микроскопе размеры исследуемых образцов составляли 20×20×10 мм.

2.2.13 Получение аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы и хитозана

Композиты на основе бактериальной целлюлозы и хитозана получали двумя методами: *ex situ* и *in situ*.

Согласно методу *ex situ*: полученную БЦ тщательно гомогенизировали до получения однородной суспензии (суспензию получали путем разведения целлюлозы водой в соотношении 1:3 по массе).

Гидрогели БЦ-хитозан получали путем смешения 2 % раствора хитозана в 1 % уксусной кислоте, суспензии БЦ и 25 % глутарового альдегида (2 % и 1 %, об./об.). Глутаровый альдегид использовали в качестве сшивающего агента. Полученную смесь нагревали при 80 °С в течение 1 ч. Полученный гидрогель несколько раз промывали деионизированной водой для удаления свободных полимеров. Полученные гидрогели имели стабильную и однородную консистенцию и желтовато-коричневый цвет. Гидрогели хранили при температуре 4 °С – 5 °С для дальнейшего исследования (Wahid et al., 2018).

Соотношение БЦ-хитозан может составлять 0/100; 20/80; 50/50; 80/20 соответственно).

Согласно методу *in situ*: композиты на основе БЦ получали путем культивирования продуцента на мелассной среде с хитозаном (0,1 %, 0,5 % и 1 % от объема среды) в динамических условиях в колбах, содержащих 100 мл среды. Инкубировали при температуре 28 °С в течение 5 суток.

С целью получения аэрогелей, полученные образцы замораживали в низкотемпературном холодильнике в течение суток, далее лиофильно высушивали (Патент № 2736061).

2.2.14 Определение влагосвязывающей способности

Образцы аэрогелей с фиксированной массой помещали в чашки Петри с 20 мл исследуемого раствора (дистиллированная вода, CaCl₂, NaCl). Затем через 1, 3, 5 и 24 ч определяли массу каждого образца.

Поглощение образцами влаги рассчитывали по формуле 3:

$$I_A = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100, \%, \quad (3)$$

где m_t – масса образца после выдержки, г;

m_0 – начальная масса образца, г.

2.2.15 Определение пористости

Для определения пористости готовили предварительно взвешенные образцы размером 10 мм × 10 мм. Далее образцы погружали в этиловый спирт с заранее известной плотностью на один час. Пористость вычисляли по формуле 4:

$$P = \frac{W_2 - W_1}{\rho \cdot V} \cdot 100\%, \quad (4)$$

где W_1 – масса образца до погружения в этиловый спирт, г;

W_2 – масса образца до погружения в этиловый спирт, г;

ρ – плотность этилового спирта, г/см³;

V – объем взятого на анализ образца, мл.

2.2.16 Гемокоагуляционный тест

Исследование проводили согласно действующим международным этическим нормам. Каждый донор-доброволец подписывал информированное добровольное согласие на медицинское вмешательство. В стерильных условиях

в утренние часы натощак у девушки-добровольца, не имеющей в анамнезе патологии системы гемостаза, забирали кровь из кубитальной вены. Для этого использовали вакуумные пробирки (Sarstedt AG&Co., Германия), содержащие 3,2 %-ный раствор цитрата натрия. Соотношение объемов крови и цитрата натрия – 9:1. Перемешивание крови с антикоагулянтом производили аккуратным переворачиванием вакутайнера 3 раза. В ходе гемокоагуляционного теста образец пленки инкубировали при температуре 37 °С в течение 5 минут. Затем наносили 50 мкл цитратной крови, следом за ней 5 мкл 0,05 н CaCl₂. Секундомером измеряли время образования сгустка, фиксировали время. Образовавшийся сгусток извлекали, оставшуюся кровь смывали дистиллированной водой, затем осуществляли измерение оптической плотности крови при 540 нм.

2.2.17 Получение сорбентов на основе бактериальной целлюлозы с нанослоем оксида алюминия

В качестве сорбента использовался БЦ, на который методом атомно-слоистого осаждения (ALD) наносились пленки Al₂O₃ различной толщины.

Осаждение тонких пленок методом ALD проводилось следующим образом: подложка в вакуумной камере при рабочей температуре поочередно подвергалась воздействию двух реагентов (прекурсоров) в парообразном состоянии. Прекурсоры, реагирующие только на поверхности подложки, образовывали монослой тонкопленочного соединения. Толщина нанесенных слоев определялась по ранее полученным калибровочным линиям. При нанесении пленки оксида алюминия (Al₂O₃) в качестве прекурсоров использовались триметилалюминий (Al(CH₃)₃ (ТМА)) и вода (H₂O); температура в реакторе составляла 100 °С. Этот процесс хорошо изучен: рост пленки происходит за счет самоограниченных реакций, а алюминий, содержащий предшественник, обладает высокой реакционной способностью.

Процесс можно условно разделить на 4 этапа:

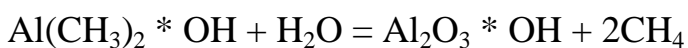
1. Введение паров триметилалюминия в камеру. На поверхности подложки триметилалюминий связывается с поверхностью, теряя одну из своих метильных групп, и две метильные группы, связанные с атомом алюминия, становятся активными поверхностными группами.

2. Продувка камеры газом-носителем для удаления остатков предшественника и продуктов реакции. После продувки связанный с поверхностью прекурсор остается на поверхности подложки.

3. Подача водяного пара в камеру. Молекулы воды мгновенно вступают в реакцию с поверхностным монослоем, образуя оксидную пленку и выделяя метан в качестве летучего продукта реакции. После этой стадии гидроксильные группы становятся активными поверхностными группами.

4. Продувка камеры газом-носителем для удаления остаточного водяного пара и продуктов реакции. При последующем введении первого прекурсора (в нашем случае триметилалюминия) он реагирует с поверхностными гидроксильными группами, начиная новый цикл процесса ALD, в результате чего образуется тонкая пленка с активными поверхностными группами, участвующими в следующем полупериоде.

В упрощенном виде процесс ALD можно записать следующим образом:



и т.д., где звездочками обозначены поверхностные группы подложки (Revin et al., 2021).

2.2.18 Изучение механизма адсорбции

Адсорбционные эксперименты проводились в стационарном режиме. Образцы пленки бактериальной целлюлозы, модифицированной оксидом алюминия, массой 0,01–0,02 г вводили в раствор фторид-ионов с концентрацией 5 мг/л и перемешивали в течение 1 ч со скоростью 200 об/мин.

По достижении равновесия массовую концентрацию фторид-ионов измеряли фотометрически на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 UV-visible.

Методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) определено содержание (мас. %) оксида алюминия, нанесенного на целлюлозу. Содержание составляло от 41,40 % до 66,94 % в зависимости от слоя сорбента. Каждый эксперимент проводился 3 раза в одних и тех же условиях, и стандартное отклонение измерений было в пределах ± 2 %. Методом ААС также были исследованы растворы после сорбции с целью изучения процесса выщелачивания ионов из сорбента в раствор.

Далее, расчет адсорбционной емкости был выполнен в отношении общей массы сорбента и отдельно для оксида алюминия согласно уравнению 5:

$$A = \frac{c_0 - c}{m} \cdot V, \quad (5)$$

где A – адсорбционная емкость сорбента, мг/г;

c_0 – начальная концентрация фторид-ионов в растворе, мг/л;

c – равновесная концентрация фторид-ионов в растворе после сорбции, мг/л;

m – общая масса сорбента и его масса, выраженная в Al_2O_3 , г;

V – объем раствора, в котором проводится сорбция, л.

Модельный раствор фторид-ионов определенной концентрации готовили разбавлением стандартного образца.

2.2.19 Статистическая обработка данных

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Excel.

Опыты проводили в 3–4 кратных повторностях. При статистической обработке данных использовался непараметрический t критерий Стьюдента. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0,05$. В таблицах цифры представляют средние величины из трех определений; разброс данных не превышал 10–15%.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Выделение нового штамма продуцента бактериальной целлюлозы

Различные штаммы уксуснокислых бактерий способны синтезировать БЦ с разным выходом (от 0,5–1,2 г/л до 10–15 г/л) из разных источников углерода (Wu and Liu, 2012; Pacheco et al., 2017; Volova et al., 2018). Чтобы увеличить масштабы производства БЦ и расширить спектр применения данного полимера, необходимо иметь бактериальные штаммы, способные синтезировать значительное количество этого ценного продукта. Поэтому большая часть недавних исследований была сосредоточена на поиске новых штаммов, продуцирующих целлюлозу, и совершенствовании методов ферментации.

Первостепенной задачей настоящего исследования являлось выделение нового штамма продуцента бактериальной целлюлозы. В качестве источника для выделения штамма был выбран индийский рис (морской рис, тибикос, тиби, тибетский гриб, японский рис, водяной кефир) (Ревин, 2020).

Индийский рис (рис. 31) – это ферментированный напиток, который получают путем добавления кефирных зерен и фруктов или фруктовых экстрактов в водный раствор сахарозы. Желеобразные зерна кефира неправильной формы содержат консорциум различных микроорганизмов, которые быстро метаболизируют сахар (Laureys and De Vuyst, 2014). Ферментированный желтоватый напиток содержит углекислый газ, этанол, уксусную кислоту, молочную кислоту и различные другие продукты ферментации, включая летучие ароматические соединения (Laureys and De Vuyst, 2014). Микробиота кефирного зерна содержит различные виды дрожжей и бактерий. Среди видов бактерий, помимо уксуснокислых бактерий и бифидобактерий, преобладают молочнокислые бактерии (Gulitz et al., 2011; Laureys & De Vuyst, 2014; Fels et al., 2018).



Рисунок 31 – Зерна индийского риса

В результате из индийского риса с последующей селекцией на основе естественного отбора на кафедре биотехнологии и биохимии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» нами был выделен бактериальный штамм С-110, идентифицированный и описанный как *Komagataeibacter hansenii* В-12950 (Патент № 2681281).

Штамм был идентифицирован на основании его морфологических, биохимических, молекулярно-генетических и ростовых параметров. Фенотипические свойства были изучены с использованием стандартных микробиологических методов.

Штамм демонстрирует типичные родовые признаки. Бактериальные клетки являются грамотрицательными, палочковидными, неподвижными, одиночными или парными, размером 0,6 x 2 мкм. Бактерии являются строго аэробными, нуждаются в факторах роста (дрожжевой экстракт). Оптимальные значения pH составляют 4,0–6,0; диапазон температур для максимального роста составляет 28 °С – 30 °С. Состав жирных кислот липидов мембран клеток штамма представлен в основном C16:0 (гексадекановая), C18:1 ω 7c (11-октадеценная) жирными кислотами, что соответствует литературным данным,

согласно которым эти жирные кислоты преобладают у типовых штаммов уксуснокислых бактерий (Iino et al., 2011).

В качестве источников углерода и энергии для исследуемого штамма использовали глюкозу, фруктозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, ксилозу, галактозу, арабинозу, лактат, ацетат, цитрат, маннит, глицерин, этанол. Бактерии окисляли этанол до уксусной кислоты, ацетат и лактат – до CO_2 и H_2O . Наилучшими источниками углерода в составе среды NS для роста штамма и образования целлюлозы служат глюкоза, фруктоза, глицерин и маннит. Организмы каталазоположительные, оксидазоотрицательные. Желатину не разжижают, крахмал не гидролизуют. Нитраты не восстанавливают; индол, сероводород – не образуют. Бактерии растут в присутствии повышенных концентраций глюкозы (30 %), в присутствии 3 % этанола, не нуждаются в уксусной кислоте для роста, но растут в ее присутствии. Образуют кислоты на различных сахарах и сахароспиртах, но не на сахарозе. Наибольшее снижение pH происходит на среде с глюкозой, вероятно из-за накопления глюконовой кислоты. Так же значительное снижение pH происходит на среде с этанолом.

Штамм бактерии был идентифицирован до вида с помощью анализа последовательности гена 16S рРНК. При секвенировании переменных участков гена 16S рРНК получена полная нуклеотидная последовательность для штамма бактерии. Последовательность была выровнена с соответствующими последовательностями ближайших видов бактерий, доступными из базы данных GenBank.

По данным анализа генов, кодирующих 16S рРНК, построено филогенетическое дерево *K. hansenii* В-12950 с гомологичными штаммами бактерий (рис. 32). По результатам проведенного анализа сиквенсов переменных участков генов, кодирующих 16S рРНК, штамм бактерии был наиболее близок к виду *K. hansenii*.

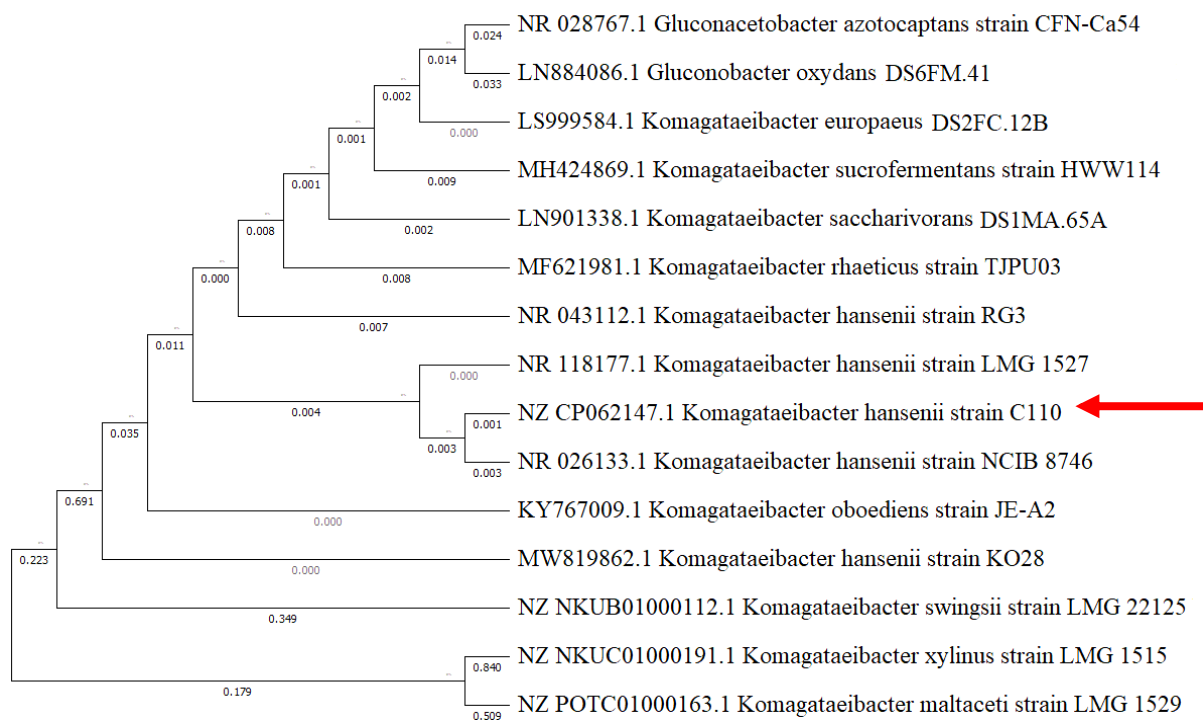


Рисунок 32 – Филогенетическое древо, показывающее положение штамма *K. hansenii* В-12950 (С 110) среди типовых штаммов рода *Komagataeibacter*

Штамм характеризуется стабильностью в отношении выхода целевого продукта и способностью использовать дешевые субстраты типа мелассы, барды. Образование БЦ штаммом было исследовано на стандартной среде (НС), средах с мелассой и бардой (табл. 4, рис. 33).

Таблица 4 – Количество БЦ, образуемое штаммом продуцентом *K. hansenii* В-12950 на различных средах в статических и динамических условиях культивирования на 5 и 3 сутки, соответственно

Условия культивирования	Количество БЦ, г/л					
	НС		Меласса		Барда	
	V	M±m	V	M±m	V	M±m
Динамические	1,43		2,25		4,20	
	1,50	1,48±0,04	2,30	2,28±0,08	4,16	4,19±0,04
	1,52		2,29		4,19	
Статические	1,03		1,45		1,98	
	0,87	0,77±0,08	1,62	1,53±0,06	2,03	1,96±0,07
	0,43		1,53		1,89	

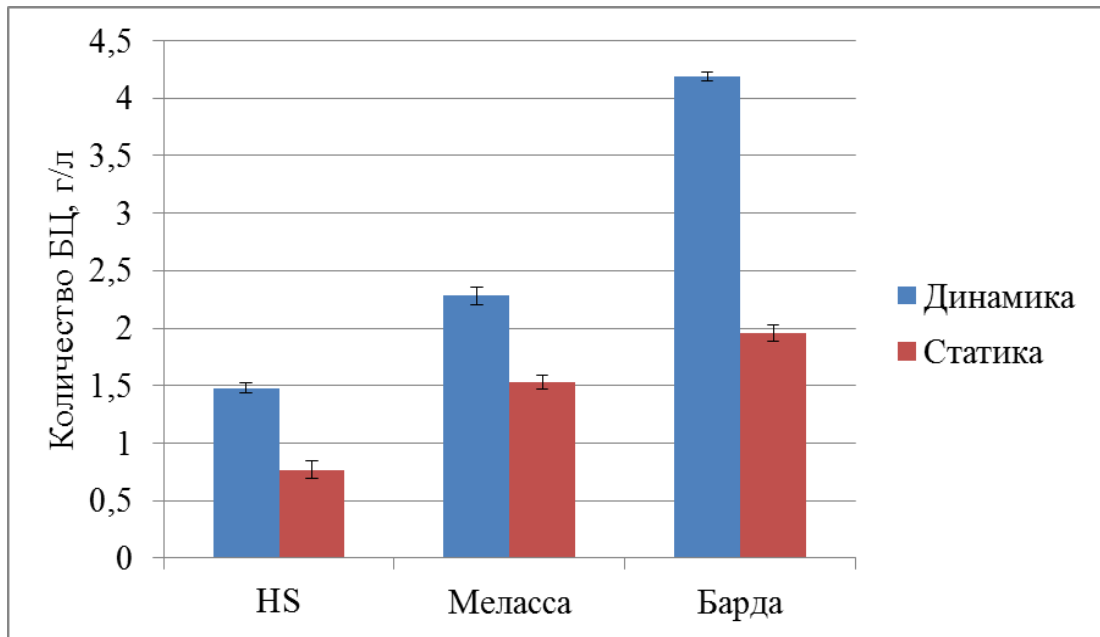


Рисунок 33 – Количество БЦ, образуемое штаммом продуцентом *K. hansenii* В-12950 на различных средах в статических и динамических условиях культивирования на 5 и 3 сутки, соответственно

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

Одним из важных параметров бактериальной целлюлозы является степень кристалличности, которая непосредственно влияет на свойства полимера.

Степень кристалличности изучали с помощью метода рентгеноструктурного анализа. В качестве исследуемых образцов брали образцы целлюлозы, образуемые штаммом продуцентом *K. hansenii* В-12950 на различных средах в статических и динамических условиях культивирования (табл. 5, рис. 34).

Таблица 5 – Степень кристалличности БЦ, образуемой штаммом продуцентом *K. hansenii* В-12950 на различных средах в статических и динамических условиях культивирования

Условия культивирования	Степень кристалличности, %		
	НС	Меласса	Барда
Динамические	57,90	72,40	62,45
Статические	77,06	83,30	68,27

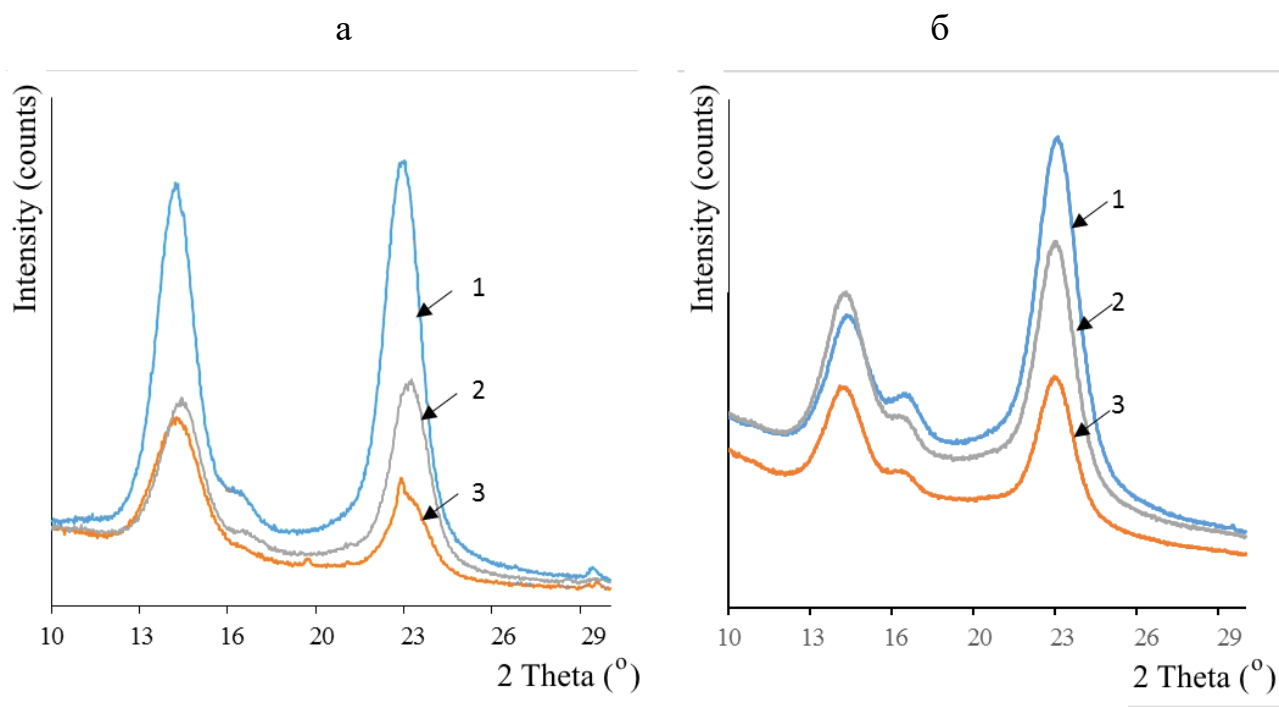


Рисунок 34 – Спектры рентгеновской дифракции (режим отражения) БЦ, синтезируемой штаммом продуцентом *K. hansenii* В-12950 на различных средах: 1 – меласса; 2 – среда НС, 3 – барда в динамических (а) и в статических (б) условиях на 3 сутки культивирования

На всех полученных спектрах можно выделить 3 основных пика около $14,4^\circ$, $16,7^\circ$ и $22,4^\circ$, которые могут соответствовать (100), (010) и (110) плоскости целлюлозы I α , или (011), (110) и (200) плоскости целлюлозы I β . Из-за близкого расположения пиков двух алломорфов их бывает довольно трудно дифференцировать. Тем не менее, интенсивность пика $14,5^\circ$ выше пика $16,7^\circ$, что указывает на уникальные свойства образцов БЦ, которые содержат в

основном целлюлозу Ia. Полученные результаты соответствуют литературным данным, касающимся кристалличности бактериальной целлюлозы.

Как видно из графиков, большая степень кристалличности БЦ наблюдается на среде с мелассой как в динамических условиях, так и в статических условиях культивирования – 72,40 % и 83,30 %, соответственно.

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

3.2 Сравнительная характеристика штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы

Как было сказано ранее, а также согласно литературным источникам на структуру БЦ и выход полимера могут влиять несколько факторов, включая штаммы 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. Например, *G. hansenii* NCIM 2529 образует наибольшее количество целлюлозы на среде с сахарозой, тогда как *G. xylinus* ATCC 53524 и PTCC 1734 показывают наибольший выход, когда в качестве источника углерода используется маннит. 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 различных штаммов бактерий, источников углерода и условий культивирования на выход и структуру бактериальной целлюлозы.

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 и *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.

3.2.1 Изучение морфологии продуцентов бактериальной целлюлозы

Клетки всех исследуемых штаммов продуцентов (рис. 35) имеют эллипсоидную или палочковидную форму, прямые или слегка изогнутые. Размер колеблется в пределах 0,6–2 мкм. Расположение, как правило, одиночное, в парах или цепочках. Эндоспор не образуют. По Граму окрашиваются отрицательно.

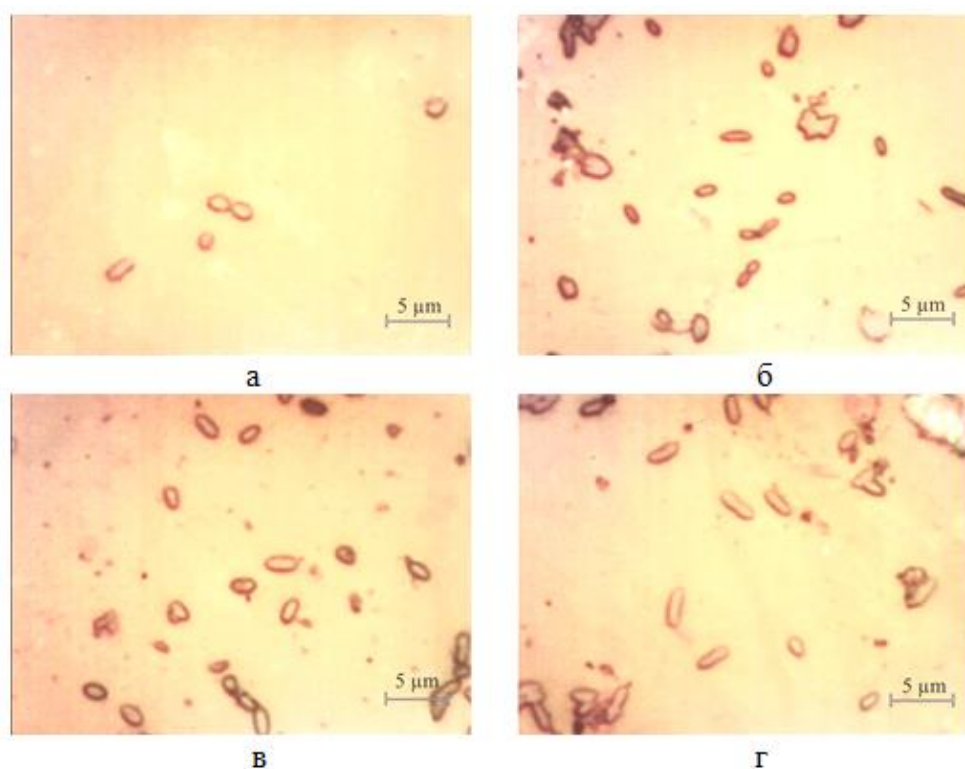


Рисунок 35 – Клетки бактерий: а – *K. xylinus* В-12429, б – *K. xylinus* В-12430, в – *K. sucrofermentans* В-11267, г – *K. hansenii* В-12950

3.2.2 Культуральные свойства штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы

На агаризованных питательных средах исследуемые штаммы продуценты БЦ формировали гладкие, выпуклые, круглые, слабо-бежевые или непигментированные колонии (рис. 36). Диаметр колоний 1-2 мм. На агаризованной среде с мелом колонии окружены прозрачным ореолом, образующимся вероятно под действием уксусной кислоты.

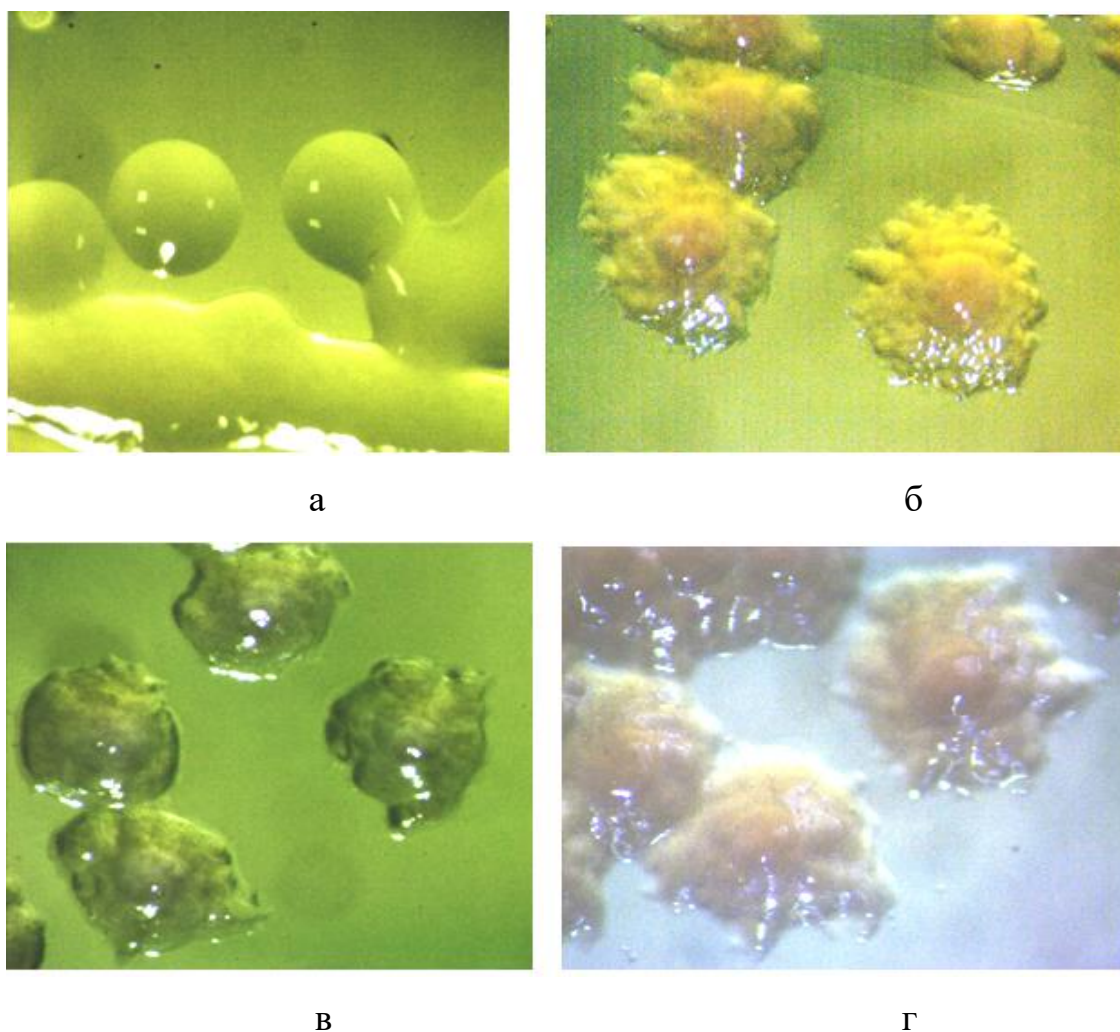


Рисунок 36 – Колонии: а – *K. xylinus* В-12429, б – *K. xylinus* В-12430, в – *K. sucrofermentans* В-11267, г – *K. hansenii* В-12950

Согласно полученным изображениям, можно сделать вывод, что 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.

Согласно проведенным ранее исследованиям можно предположить, что форма колоний влияет на выход полимера. Наибольшее количество целлюлозы образуют те штаммы, колонии которых имеют вид «яичницы».

3.2.3 Определение содержания жирных кислот

Состав жирных кислот (ЖК) клеточной стенки является важным таксономическим признаком, используемым при описании прокариот. Образующие ЖК строго зависят от генотипа и являются характерными для определённого штамма. Однако на жирнокислотный состав бактерий могут также влиять факторы окружающей среды: среда, температура, время инкубации, условия культивирования и так далее.

В связи с этим нами был изучен жирнокислотный состав исследуемых штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы (табл. 6).

Таблица 6 – Жирнокислотный состав исследуемых штаммов продуцентов БЦ

Жирная кислота	Символ	Содержание, % от суммы всех ЖК			
		Штаммы продуценты БЦ			
		<i>K. sucrofermentans</i> В-11267	<i>K. xylinus</i> В-12429	<i>K. xylinus</i> В-12430	<i>K. hansenii</i> В-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-Гексадеценная	C16:1 ω7c	4,85	3,25	4,05	2,26
Октадекановая	C18:0	1,67	8,35	2,52	1,43
11-Октадеценная	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-октадеценная жирные кислоты, что подтверждает принадлежность данных микроорганизмов к группе целлюлозосинтезирующих уксуснокислых микроорганизмов (Iino et al., 2011; Revin et al., 2020).

3.2.4 Физиологические свойства штаммов продуцентов бактериальной целлюлозы

Оптимальное значение pH среды культивирования зависит в первую очередь 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. 37).

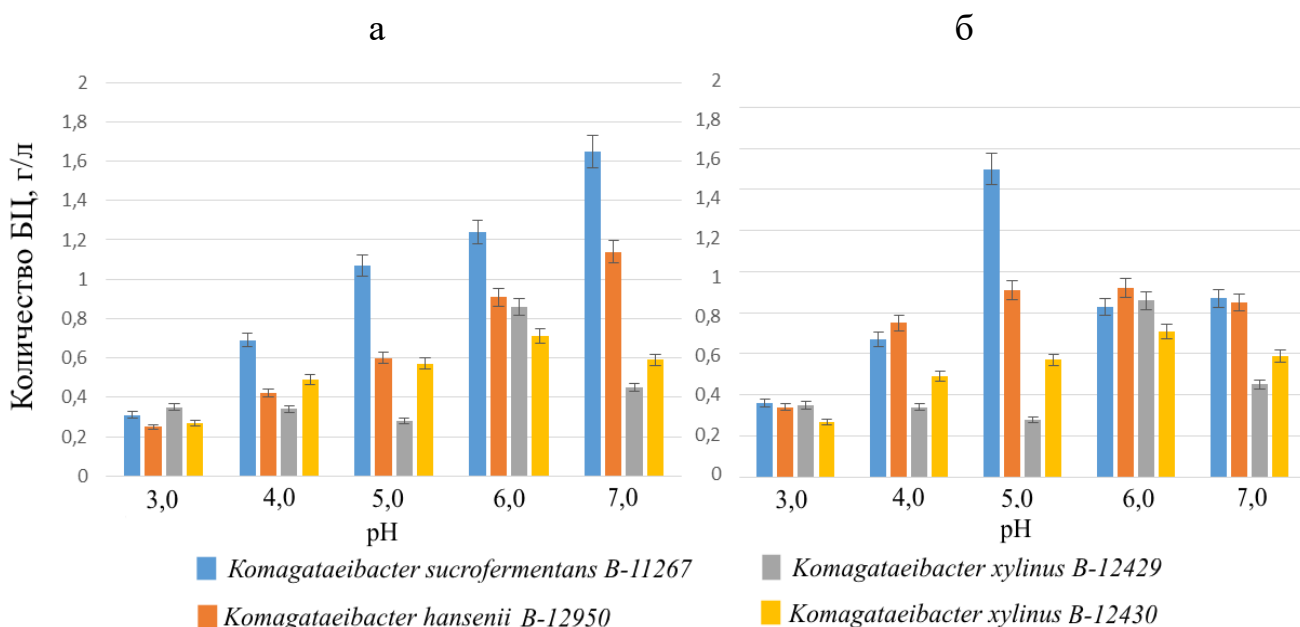


Рисунок 37 – Динамика образования бактериальной целлюлозы различными штаммами на стандартной среде в динамических (а) и статических (б) условиях культивирования на 3 сутки при различных начальных значениях pH

Согласно полученным данным наибольшее количество БЦ штаммами *K. sacrofermentans* В-11267 и *K. hansenii* В-12950 образуется в динамических условиях при начальном значении рН 7,0; а в статических условиях – при рН 5,0. Выход целлюлозы при этом составил 1,65 г/л; 1,5 г/л; 1,14 г/л и 0,92 г/л, соответственно. Для штаммов *K. xylinus* В-12429 и *K. xylinus* В-12430 при культивировании как в статических, так и в динамических условиях оптимальным начальным значением рН является – 6,0.

Также изучали влияние источников азота на образование и выход БЦ различными штаммами продуцентами в динамических условиях (рис. 38).

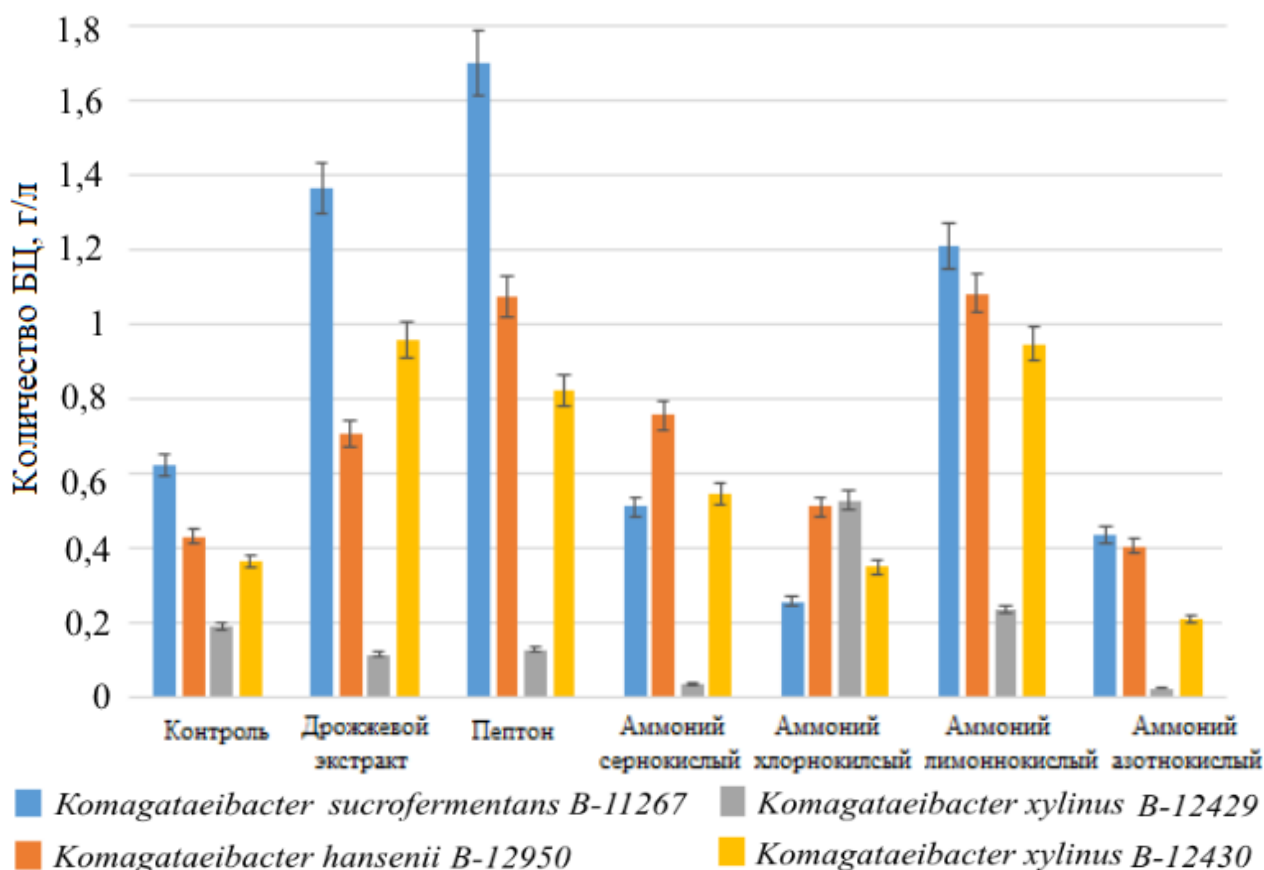


Рисунок 38 – Динамика образования бактериальной целлюлозы различными штаммами продуцентами на стандартной среде NS в динамических условиях культивирования на 3 сут с различными источниками азота

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

Однако для штамма *K. sucrofermentans* В-11267 наилучшим источником азота был аммоний лимоннокислый, для *K. xylinus* В-12429 – аммоний хлорнокислый и для *K. xylinus* В-12430 – дрожжевой экстракт. Выход бактериальной целлюлозы составил 1,08 г/л; 0,53 г/л и 0,96 г/л, соответственно.

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. 39).

Меласса – побочный продукт заключительной стадии кристаллизации процесса производства сахара, которая является многообещающим «кандидатом» на роль недорогого источника углерода в микробной промышленности (Çakar et al., 2014).

Барда является отходом спиртовой промышленности и представляет собой быстрозакисающую суспензию, содержащую практически все питательные вещества, присущие исходному сырью: протеины, жиры, клетчатку, безазотистые экстрактивные вещества, включая несброженные сахара и крахмал (Wu et al., 2012).

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

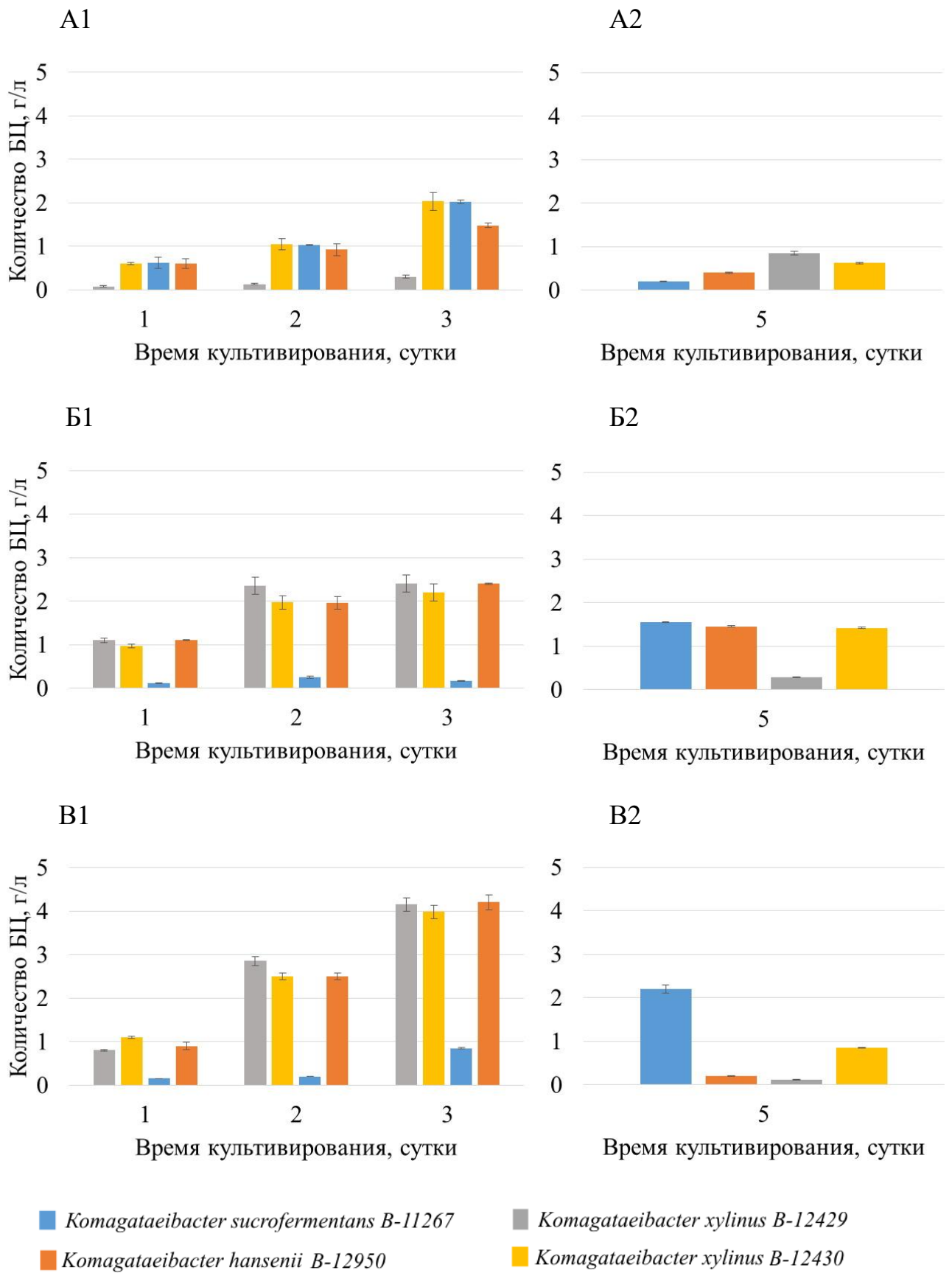


Рисунок 39 – Динамика образования БЦ при культивировании штаммов продуцентов в динамических (1) и статических (2) условиях культивирования на среде HS (А), среде с мелассой (Б) и среде с бардой (В)

Изучали динамику потребления сахаров в ходе культивирования бактерий *K. xylinus* В-12429, *K. xylinus* В-12430, *K. sucrofermentans* В-11267 и *K. hansenii* В-12950 на среде с мелассой и среде HS (табл. 7, 8).

Таблица 7 – Динамика изменения количества сахаров в среде с мелассой

Время культивирования, сутки	Концентрация сахаров в среде, г/л			
	Сахароза	Глюкоза	Фруктоза	Общее количество сахаров
<i>K. sucrofermentans</i> В-11267				
0	15,08	5,86	8,17	29,11
1	13,12	2,35	5,82	21,29
2	13,01	1,99	4,49	19,49
3	12,98	1,65	3,26	17,89
<i>K. hansenii</i> В-12950				
0	15,08	5,86	8,17	29,11
1	14,68	2,55	6,12	23,35
2	14,09	2,29	5,09	21,47
3	14,07	2,05	4,19	20,31
<i>K. xylinus</i> В-12429				
0	15,08	5,86	8,17	29,11
1	14,70	2,65	6,25	23,60
2	14,25	2,38	5,22	21,85
3	14,23	2,14	4,32	20,69
<i>K. xylinus</i> В-12430				
0	15,08	5,86	8,17	29,11
1	13,20	2,57	6,01	21,78
2	12,54	2,21	4,98	19,73
3	12,50	1,97	3,75	18,22

Таблица 8 – Динамика изменения количества глюкозы в среде NS

Время культивирования, сутки	Концентрация глюкозы в среде, г/л
<i>K. sacrofermentans</i> B-11267	
0	20,21
1	14,35
2	2,66
3	2,14
<i>K. hansenii</i> B-12950	
0	20,21
1	15,18
2	4,16
3	3,75
<i>K. xylinus</i> B-12429	
0	20,21
1	15,40
2	5,37
3	5,12
<i>K. xylinus</i> B-12430	
0	20,21
1	14,77
2	3,57
3	3,14

Из полученных данных можно увидеть, что при начальном значении рН 4,5 в меласной среде присутствует большее количество сахарозы, которая частично гидролизуется на глюкозу и фруктозу. В процессе культивирования всеми штаммами практически не происходит потребление сахарозы. Ее количество уменьшается незначительно в течение 3 суток культивирования. Однако происходит активное потребление глюкозы и фруктозы.

В среде HS единственным источником углерода является глюкоза. Концентрация сахара в среде составляет 20 г/л. Стоит отметить, что наибольшее потребление глюкозы наблюдается на 2 сутки культивирования.

С помощью метода ИК-спектроскопии исследовали структуру БЦ, поскольку состав среды влияет не только на выход полимера, но и на его структуру. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Индекс кристалличности БЦ, образуемой исследуемыми штаммами на различных средах при динамическом и статическом культивировании

Штамм продуцент	Статическое культивирование	Динамическое культивирование
	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

Согласно данным, представленным в таблице 9, индекс кристалличности образцов БЦ, полученных в статических условиях выше, чем кристалличность образцов, полученных в динамике. Возможно, это связано с тем, что перемешивание снижает процесс формирования центров кристаллизации.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что наибольшим выходом БЦ обладает штамм *K. sacrofermentans* В-11267. Кроме того, образуемый данным штаммом полимер обладает наилучшими характеристиками для его дальнейшего использования в качестве материала для создания биокompозитов функционального назначения.

3.3 Получение биокompозитов на основе бактериальной целлюлозы и изучение их свойств

3.3.1 Получение аэрогелей медицинского назначения на основе бактериальной целлюлозы и хитозана

Бактериальная целлюлоза – это уникальный материал, который нашел широкое применение в качестве материала медицинского назначения.

Благодаря своим свойствам: отсутствие токсичности, канцерогенности, а также биосовместимости, способности удерживать влагу и поглощать экссудаты из поврежденной ткани, БЦ является идеальным каркасом для создания разного рода раневых покрытий, позволяющих осуществлять защиту поврежденных тканей, особенно это является актуальным для ожоговых ран, регенерации тканей и при использовании таких повязок в качестве временных заменителей кожи (Portela et al., 2019).

Обладая рядом уникальных свойств, БЦ, однако, 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.

Как уже говорилось ранее, композит – это материал, который сочетает в себе, по крайней мере, два разных материала, с четкой границей между ними, приобретая дополнительные свойства своих компонентов. Как правило, целью производства композитных материалов является обеспечение базового

материала свойствами, которыми он сам не обладал и которые необходимы для конкретного применения. В большинстве случаев эти свойства не могут быть достигнуты с изолированным базовым компонентом. Фаза усиления, которая может состоять из волокон, частиц, листов (слоев), взаимопроникающих сетей или клеток, рассредоточенных в так называемой матрице или в непрерывной фазе (обычно той, которая представляет более высокий процент). Свойства композитов зависят как от природы используемых материалов, так и от степени связи между ними через поверхность раздела. Все виды материалов могут быть использованы для производства композитов от полимеров до керамики или металлов (Portela et al., 2019).

Наибольший интерес в качестве дополнительно вносимого материала представляют полимеры, в частности, микробного происхождения, что связано с такими их свойствами как высокая чистота, биосовместимость, биоразлагаемость и нетоксичность. Одним из таких полисахаридов является хитозан, свойства которого вызывают интерес для использования в биомедицинских областях, включая средства доставки лекарств, генов, создания искусственных органов, ортопедических, а также перевязочных материалов.

Поскольку химическая структура каркаса хитозана очень похожа на структуру целлюлозы, единственное отличие заключается в наличии первичной аминогруппы на С-2 в хитозане, тогда как БЦ имеет гидроксильную группу на С-2, ожидалось, что хитозан может смешиваться с целлюлозой, и полученная смесь (композит) может приобрести полезные свойства как в отношении бактериальной целлюлозы, так и хитозана (Jia et al., 2017).

Согласно вышеизложенному целесообразным являлось получить композит на основе бактериальной целлюлозы и хитозана в форме аэрогелей и провести анализ физико-химических и физико-механических свойств, полученных композитов.

3.3.1.1 Способы получения биокompозитов на основе бактериальной целлюлозы и хитозана

Как уже упоминалось ранее в литературном обзоре, существует несколько способов создания биокompозитов на основе бактериальной целлюлозы, которые сгруппированы между собой в зависимости от типа техники: *in situ* и *ex situ* (Cacicedo et al., 2016).

Исходя из проанализированных данных, было решено получить композиты на основе БЦ и хитозана двумя методами: *in situ* и *ex situ*.

В ходе работы методом *in situ* были получены композиты на основе БЦ путем культивирования продуцента на меласной среде с хитозаном (0,1 %, 0,5 % и 1 % от объема среды) в динамических условиях при температуре 28 °С в колбах, содержащих 100 мл среды в течение 5 суток (рис. 40).



Рисунок 40 – Культивирование штамма продуцента бактериальной целлюлозы на меласной среде с хитозаном в различных концентрациях в динамических условиях на 5 сутки

Поскольку при добавлении в среду хитозана в количестве 1 % от массы среды, выход полимера был совсем незначительным, было решено использовать варианты с добавлением 0,1 % и 0,5 % хитозана. Уменьшение выхода полисахарида возможно связано с повышением вязкости культуральной среды и излишним пенообразованием.

Полученный в виде композита полимер промывали и высушивали для получения аэрогелей. Высушивание композитов осуществляли путем лиофилизации после замораживания.

Использование лиофилизации позволило избежать воздействия высоких температур на бактериальную целлюлозу, а также сохранить структурную целостность в результате отсутствия схлопывания фибрилл (рис. 41).

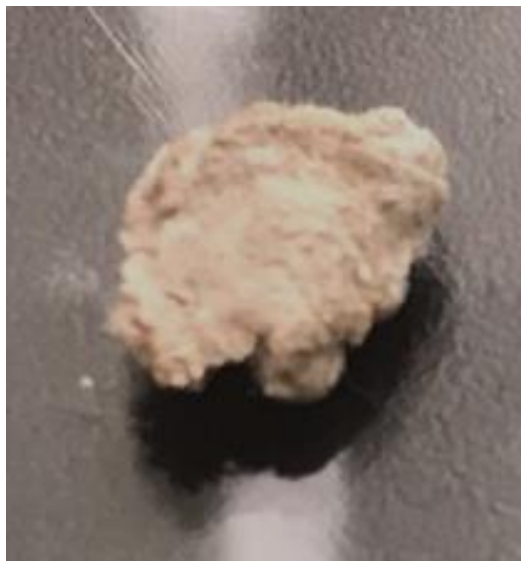


Рисунок 41 – Композит, полученный на основе бактериальной целлюлозы и хитозана методом *in situ*

Также нами были получены композиты на основе бактериальной целлюлозы и хитозана методом *ex situ*. Для этого изначально получали бактериальную целлюлозу в статических и динамических условиях, далее готовили раствор хитозана и смешивали полученные компоненты. Для получения полноценного композита сшивку компонентов осуществляли с помощью глутарового альдегида. Схематически данный процесс изображен на рисунке 42.

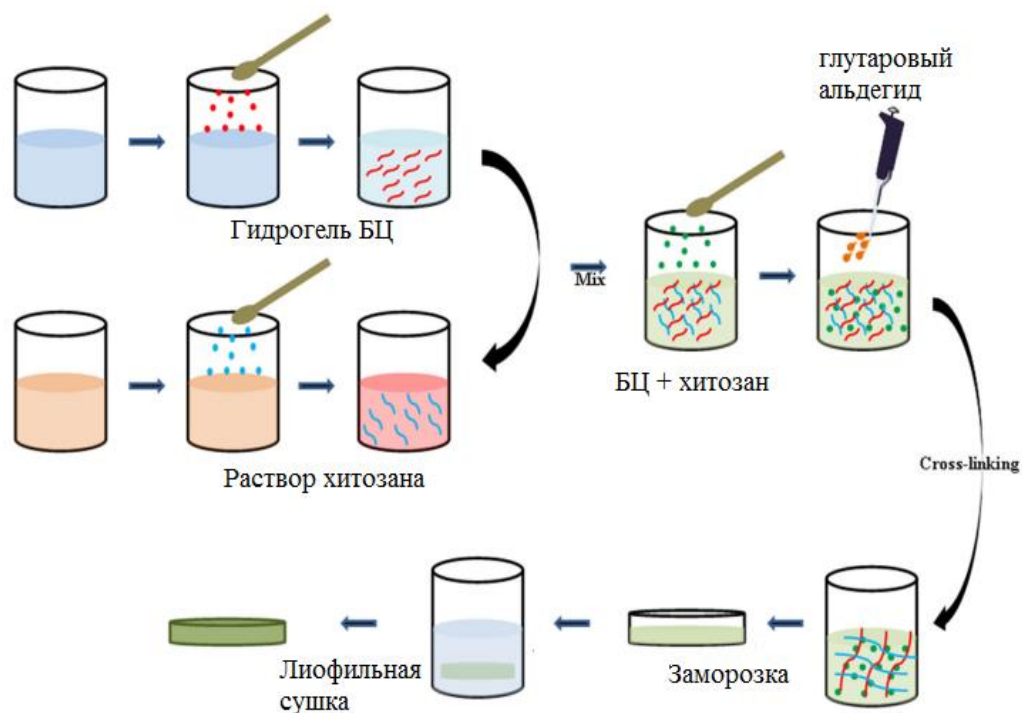


Рисунок 42 – Схематическое изображение получения композита бактериальная целлюлоза/хитозан методом *ex situ*

Метод получения бактериальной целлюлозы зависит от ряда факторов: длительности процесса, применения конечного продукта, экономической целесообразности. При статическом способе культивирования на границе раздела фаз воздух-жидкость образуется гель-пленка целлюлозы, которая со временем увеличивается в толщину. В динамических условиях целлюлоза продуцируется в виде агломератов различной формы и размеров (Atwa et al., 2015).

Мнения по поводу того, какой из способов культивирования более эффективный расходятся. В ряде работ показано, что в стационарных условиях культивирования образование целлюлозы происходит более эффективно (Krystynowicz et al., 2002). Другие исследователи утверждают, что динамические условия способствуют большему образованию БЦ, что может быть связано с увеличением площади поверхности ферментации и усилением аэрации клеток (Ра'е, 2009). Однако сообщалось о мутации бактерий, продуцирующих целлюлозу, особенно при динамических условиях (Reiniati et al., 2016).

Традиционно статическое культивирование является основным методом производства. Оно довольно простое и не требует больших энергозатрат на перемешивание в процессе производства. Тем не менее, в настоящее время производительность этого способа не удовлетворяет потребностям промышленности. Статический метод считается не пригодным для крупномасштабного производства, так как это требует длительного времени и больших помещений для культивирования бактерий (Czaja et al., 2004).

Динамический способ культивирования подходит для промышленного производства бактериальной целлюлозы и способствует коммерческому применению БЦ в различных областях промышленности. Несмотря на то, что динамический способ получения целлюлозы способствует повышению выхода полимера, важно учитывать влияние условий культивирования на структуру и физические свойства БЦ (Reiniati et al., 2016). Рядом авторов показано, что при динамическом культивировании полимер имеет более низкую степень кристалличности, полимеризации и механическую прочность по сравнению с пленками (Torgbo and Sukuai, 2018).

Для получения композита использовали хитозан в различных концентрациях и смешивали с бактериальной целлюлозой в различных соотношениях. Нами были приготовлены 2 %, 3 %, 4 % и 5 % растворы хитозана в 1 % уксусной кислоте. Приготовленные растворы смешивали с гидрогелем бактериальной целлюлозы, полученной в статических и динамических условиях, в соотношениях 50:50 и 80:20 (рис. 43).

В качестве сшивающего агента нами использовался глутаровый альдегид в количестве 2 % к массе композита. Взаимодействие аминогрупп хитозана с глутаровым альдегидом происходит в результате реакции конденсации с образованием оснований Шиффа. С ростом молекулярной массы и концентрации раствора хитозана увеличивается вероятность межмолекулярной сшивки, которая приводит к образованию пространственно-структурированного геля.

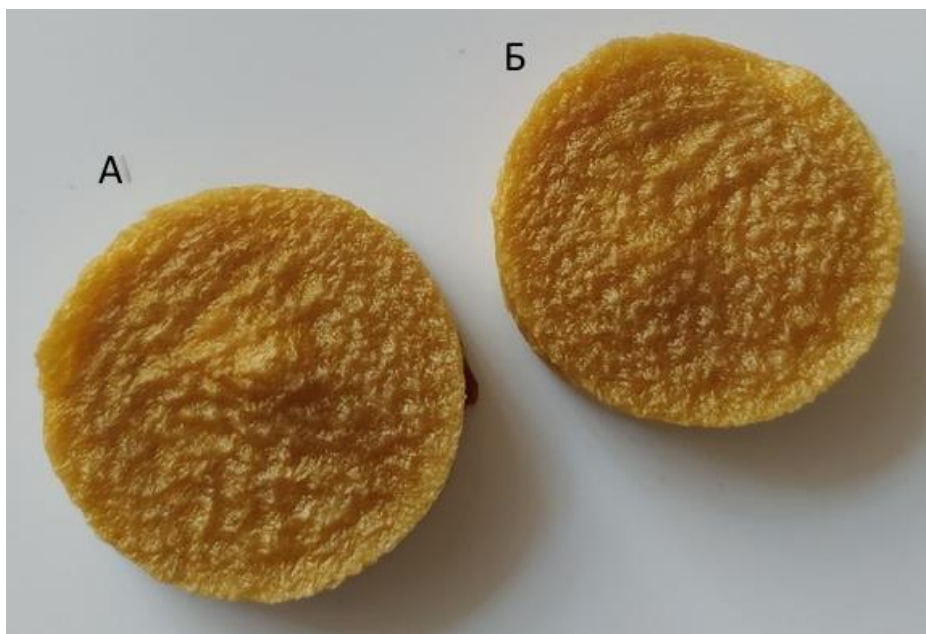


Рисунок 43 – Композиты, полученные на основе бактериальной целлюлозы, выращенной в статических (А) и динамических (Б) условиях, и хитозана методом *ex situ*

Процесс гелеобразования в растворе хитозана в присутствии глутарового альдегида протекает в несколько стадий:

I – модификация аминогрупп хитозана;

II – образование в результате межмолекулярных сшивок кластеров из макромолекул хитозана;

III – взаимодействие модифицированных и немодифицированных функциональных групп макромолекул хитозана в соседних кластерах, приводящее к образованию пространственного-структурированного геля.

Сшивка хитозана, как и любая реакция, сопровождающаяся увеличением молекулярной массы, приводит к увеличению вязкости системы. Если в результате реакции образуется гель, то система перестает течь, приобретая свойства вязкоупругого геля (Перминов и др., 2006).

Также нами было обнаружено, что суспензия БЦ не может быть сшита глутаровым альдегидом. Это может быть связано с нерастворимостью БЦ в воде.

Также, основываясь на литературных данных, можно утверждать, что сшивание происходило в цепях хитозана, в то время как БЦ была связана с

сетью хитозана водородной связью, что в дальнейшем было подтверждено анализом ИК-спектроскопии. Предложенный механизм образования композита показан на рисунке 44.

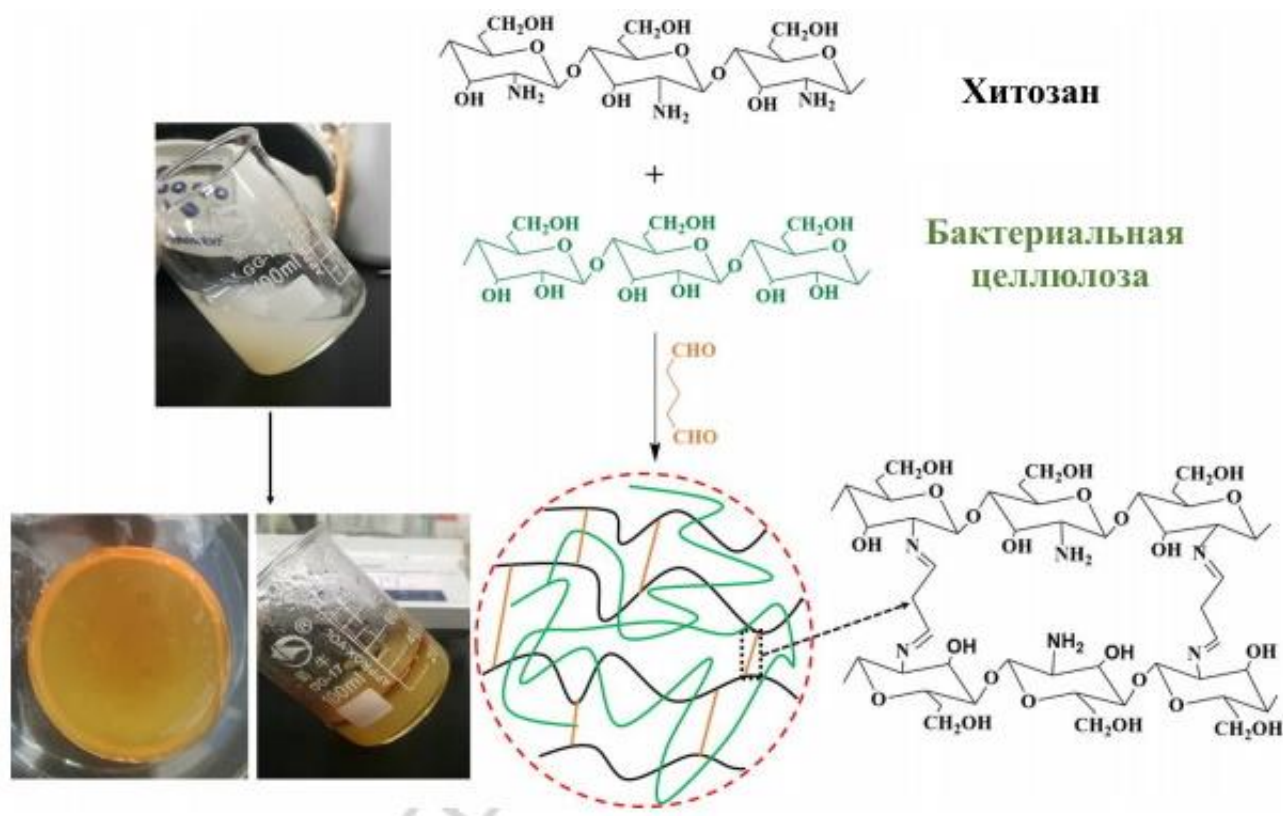


Рисунок 44 – Схематическое изображение образования композита БЦ / хитозан (Wahid et al., 2018)

Соотношения бактериальной целлюлозы и хитозана подбирались на основании литературных данных и в зависимости от дальнейших характеристик, полученных композитов.

Таким образом, на первом этапе работы, нами были получены композиты на основе бактериальной целлюлозы и хитозана двумя основными способами получения композитов: *in situ* и *ex situ*. Для выбора наиболее оптимального варианта, необходимо провести сравнительный анализ их физико-химических и физико-механических характеристик.

3.3.1.2 Изучение физико-химических и физико-механических свойств, полученных композитов на основе бактериальной целлюлозы и хитозана

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.

Исследователи, занимающиеся созданием композитов на основе бактериальной целлюлозы, пригодных для использования в качестве раневых покрытий, готовили их в различных формах (марли, мембраны, гидрогели, нановолкона, полученные методом электроспиннинга). Однако пористость и адсорбционные свойства целлюлозных материалов в таких формах недостаточны. Наиболее целесообразным считается получение пористых губок на основе целлюлозы, которые обладают высокой влагопоглощающей способностью.

Очень важно защитить открытую рану от скопления экссудата, потому что слишком много жидкости может вызвать мацерацию кожи, тем самым продлевая процесс заживления или вызывая осложнения. Хорошая абсорбирующая способность жидкости для перевязки помогает поддерживать сухость среды и способствует процессам заживления (Gustaitea et al., 2014).

В связи с вышеизложенным необходимо было проанализировать влагосвязывающую способность, полученных ранее композитов.

Определение влагосвязывающей способности проводилось в трех разных жидкостях: дистиллированной воде, физиологическом растворе (0,9 % раствор NaCl), растворе хлорида кальция (0,9 % раствор CaCl₂).

В качестве контрольного раствора использовалась дистиллированная вода. Использование данных растворов обусловлено тем, что они входят в состав плазмы крови и межклеточных жидкостей, отвечают за осмотическое давление крови и способствуют повышению гемостаза и вследствие этого

ускорению образования сгустка. Была определена масса аэрогелей до и после выдержки (через 1, 3, 5 и 24 ч) в растворах.

Изначально изучали влагосвязывающую способность композитов на основе БЦ и хитозана в форме аэрогелей, полученных методом *in situ*. Полученные результаты представлены на рисунке 45 и в таблице приложения А.

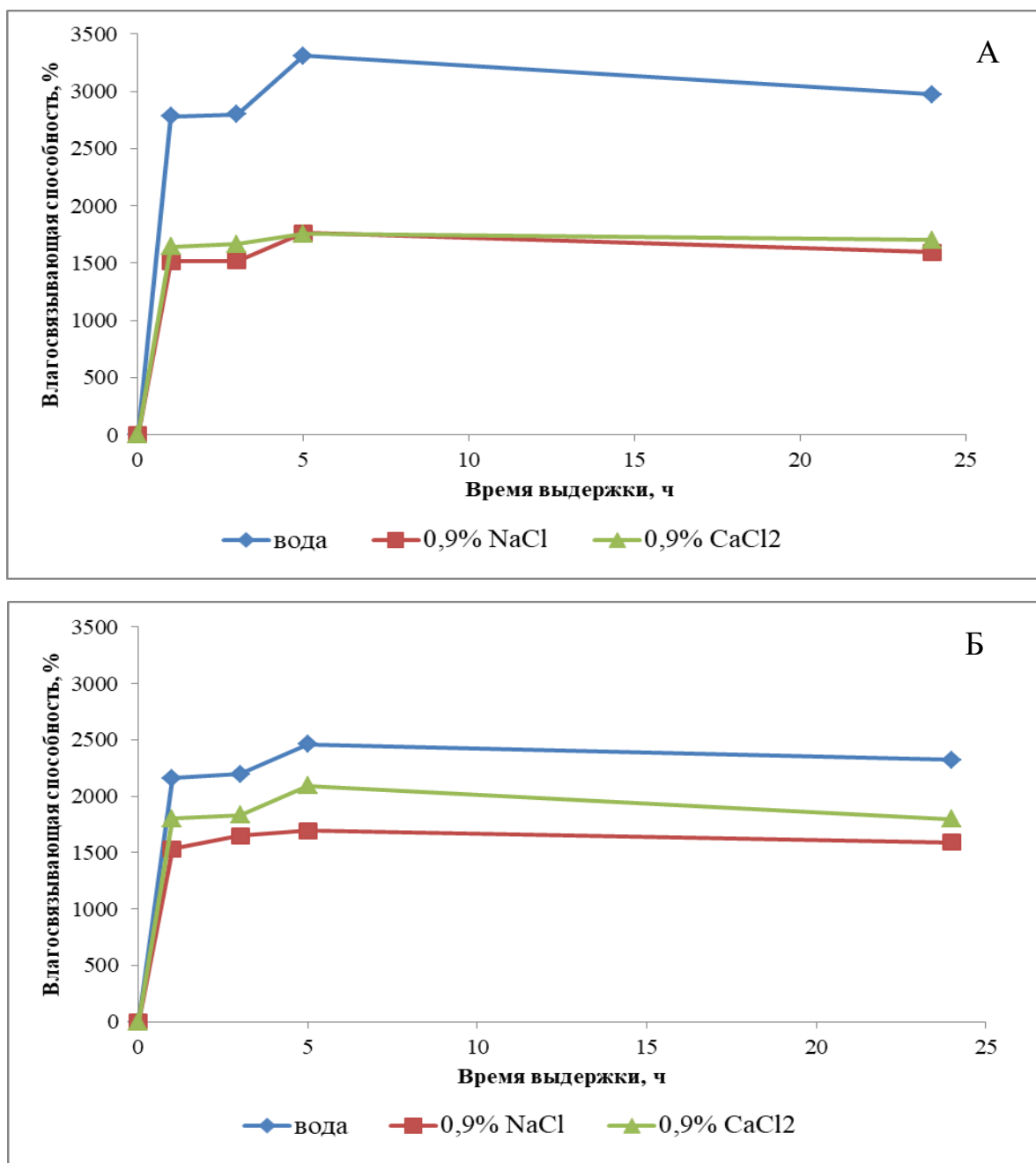


Рисунок 45 – Влагосвязывающая способность композитов, полученных на основе БЦ и хитозана методом *in situ* на среде, содержащей 0,1 % (А) и 0,5% (Б) хитозана

Исходя из представленных данных можно отметить, что образцы, полученных композитов, во всех исследуемых жидкостях проявляют хорошую влагосвязывающую способность. Максимальное значение достигается на пятый час выдержки. По истечению 24 ч показатель снижается. Вероятно, это связано с полным насыщением композиционного материала и дальнейшим его высыханием.

Далее мы проводили изучение влагосвязывающей способности композитов на основе БЦ, выращенной в динамических условиях, и хитозана в форме аэрогелей, полученных методом *ex situ* (рис. 46, приложение Б).

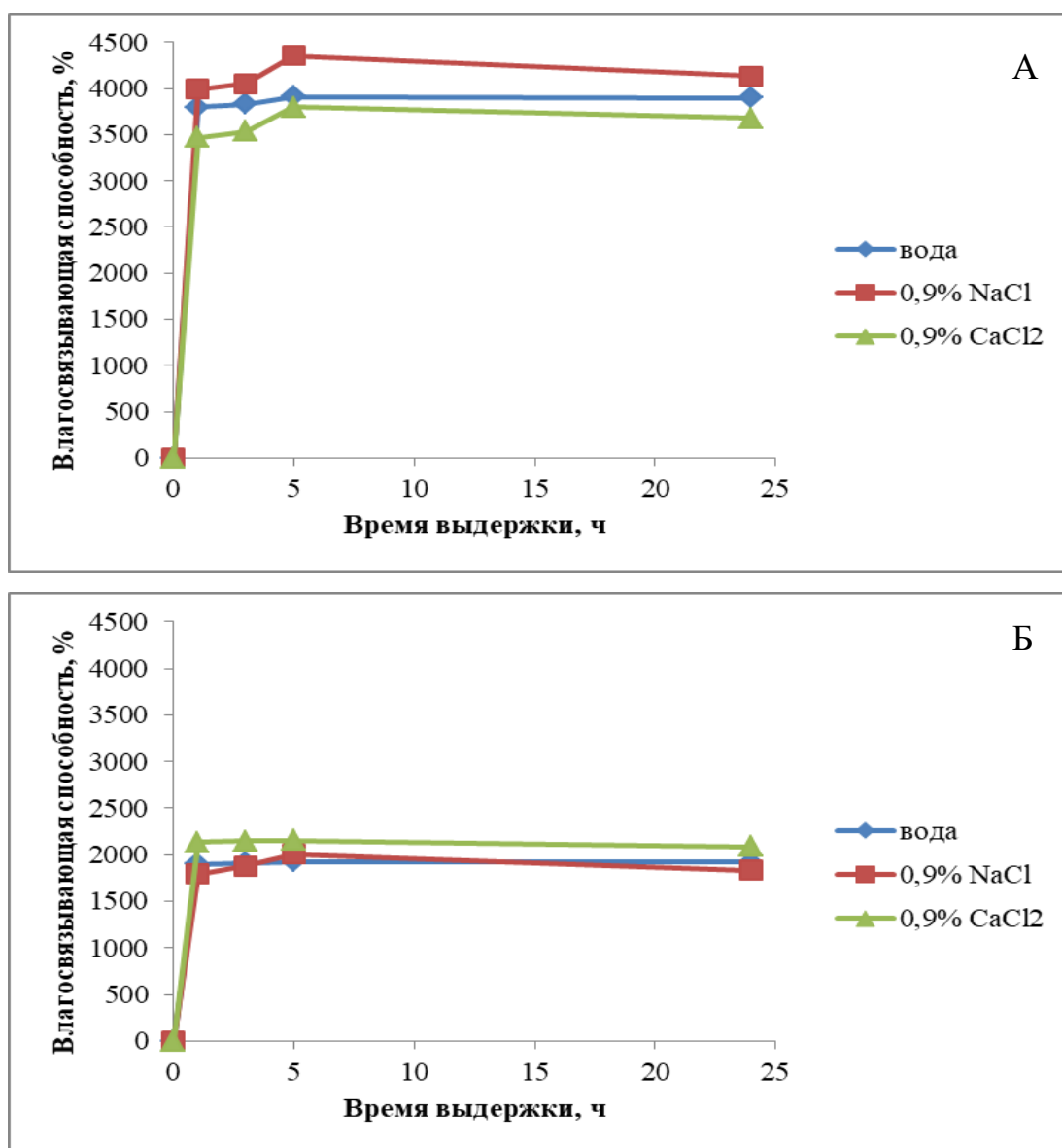


Рисунок 46 – Влагосвязывающая способность композитов, полученных на основе БЦ с 2 % (А) и 4 % (Б) раствором хитозана в соотношении 50:50 методом *ex situ*

Согласно полученным результатам исследования анализируемые образцы также показали хорошую влагосвязывающую способность. Наибольший показатель поглощающей способности образцы достигли в течение первого часа, а далее изменялись незначительно, продолжая увеличиваться до пятого часа. Аналогично с предыдущими образцами по истечению 24 ч показатель начинал снижаться, однако также незначительно.

Также проводили изучение влагосвязывающей способности композитов на основе БЦ, выращенной в статических условиях, и хитозана в форме аэрогелей, полученных методом *ex situ* (рис. 47, приложение В).

У исследуемых образцов, полученных на основе БЦ, выращенной в статических условиях, и хитозана также отмечена хорошая влагосвязывающая способность. Стоит отметить, что при увеличении количества бактериальной целлюлозы влагосвязывающая способность также увеличивается.

Как общий вывод, можно сказать, что согласно полученным 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 ч – снижается.

Также из представленных данных видно, что увеличение концентрации раствора хитозана при получении композитов методом *ex situ* незначительно влияет на увеличение сорбционной способности. Однако, влияет на прочность композитов, поскольку при погружении в раствор некоторые из них распадались.

С аналогично проблемой мы столкнулись при погружении в раствор композитов, полученных методом *in situ*, путем добавления хитозана непосредственно в среду для культивирования. Данные композиты, как уже было сказано ранее, также проявляли хорошие сорбционные свойства, но при длительной выдержке в жидкости распадались.

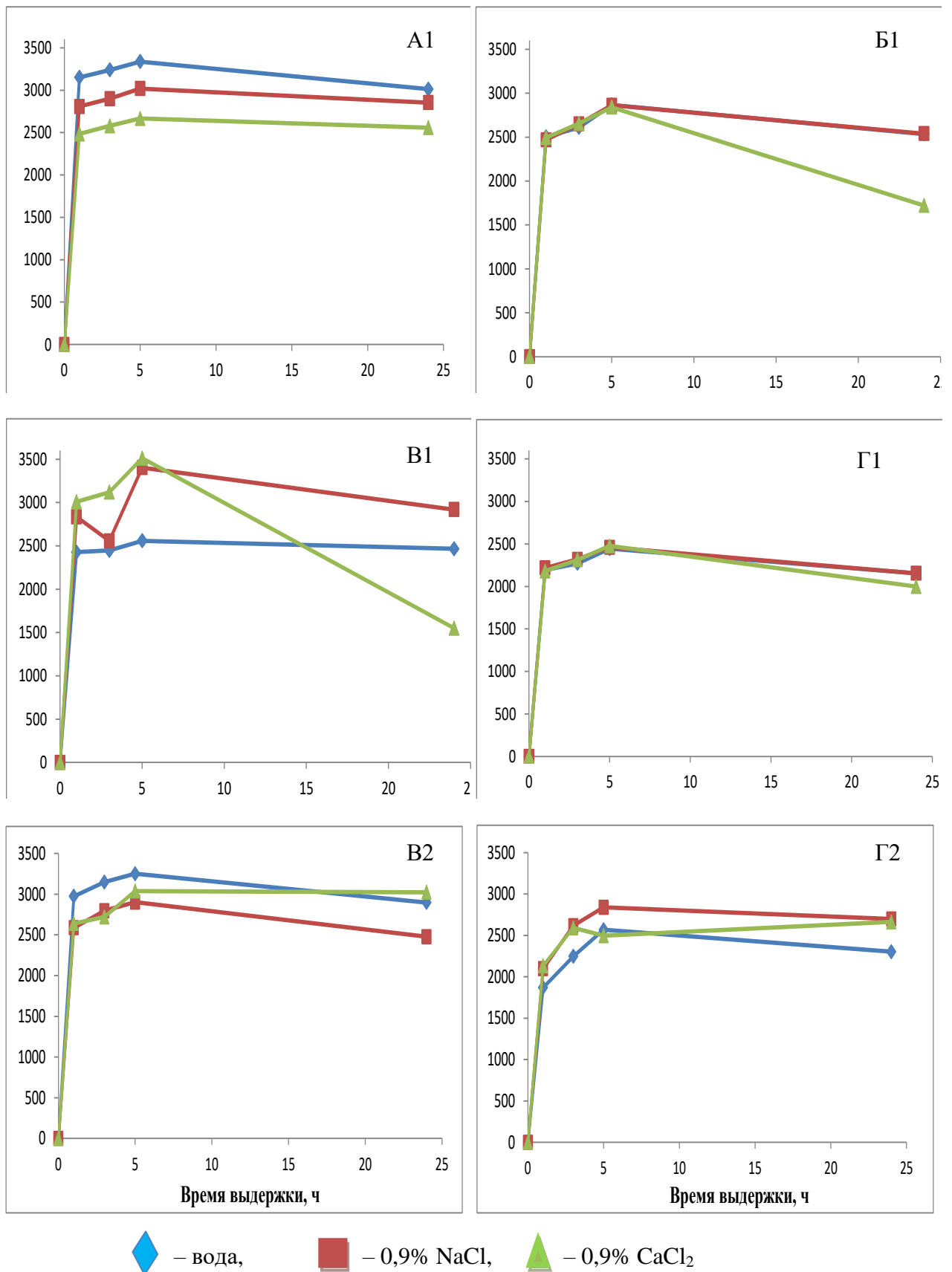


Рисунок 47 – Влагосвязывающая способность композитов, полученных на основе БЦ с 2 % (А), 3 % (Б), 4 % (В) и 5 % (Г) раствором хитозана в соотношениях 50:50 (1) и 80:20 (2) методом *ex situ*, ось У – влагосвязывающая способность, %

Исходя из вышеизложенного нами было выбрано несколько наиболее оптимальных вариантов для дальнейшего исследования:

– композит на основе бактериальной целлюлозы, полученной в динамических условиях, смешанной с 2 % раствором хитозана в соотношении 50:50 (образец № 1);

– композит на основе бактериальной целлюлозы, полученной в статических условиях, смешанной с 2 % раствором хитозана в соотношении 50:50 (образец № 2);

– композит на основе бактериальной целлюлозы, полученной в статических условиях, смешанной с 2 % раствором хитозана в соотношении 80:20 (образец № 3).

Для подтверждения факта формирования композита нами был проведен анализ ИК-Фурье спектроскопии, указанных образцов. Полученные данные представлены на рисунке 48.

Основываясь на литературных данных и полученных результатах можно сказать, что, если рассматривать спектр чистого хитозана, пик при 3420 см^{-1} представляет валентные колебания ОН и NH групп. Чистый композит хитозана показывает сходные характерные пики с хитозаном, но при получении композита формируется новый пик при 1705 см^{-1} , который принадлежит C = O альдегидной группы глутаральдегида.

Другой пик при 1558 см^{-1} можно отнести к C = N реакции глутаральдегида с аминогруппой хитозана с образованием имидной связи. БЦ показывает свои типичные пики, такие как $\sim 3370\text{ см}^{-1}$ для растяжения ОН, $\sim 2896\text{ см}^{-1}$ для растяжения СН, 1647 см^{-1} для изгиба НОН поглощенной воды, деформация СН₂ при 1429 см^{-1} , СН₃ деформация при 1373 см^{-1} , деформация ОН при 1338 см^{-1} и деформация C – O при $1300\text{--}1030\text{ см}^{-1}$. ИК-спектры БЦ и хитозана довольно схожи из-за структурного сходства обоих полимеров.

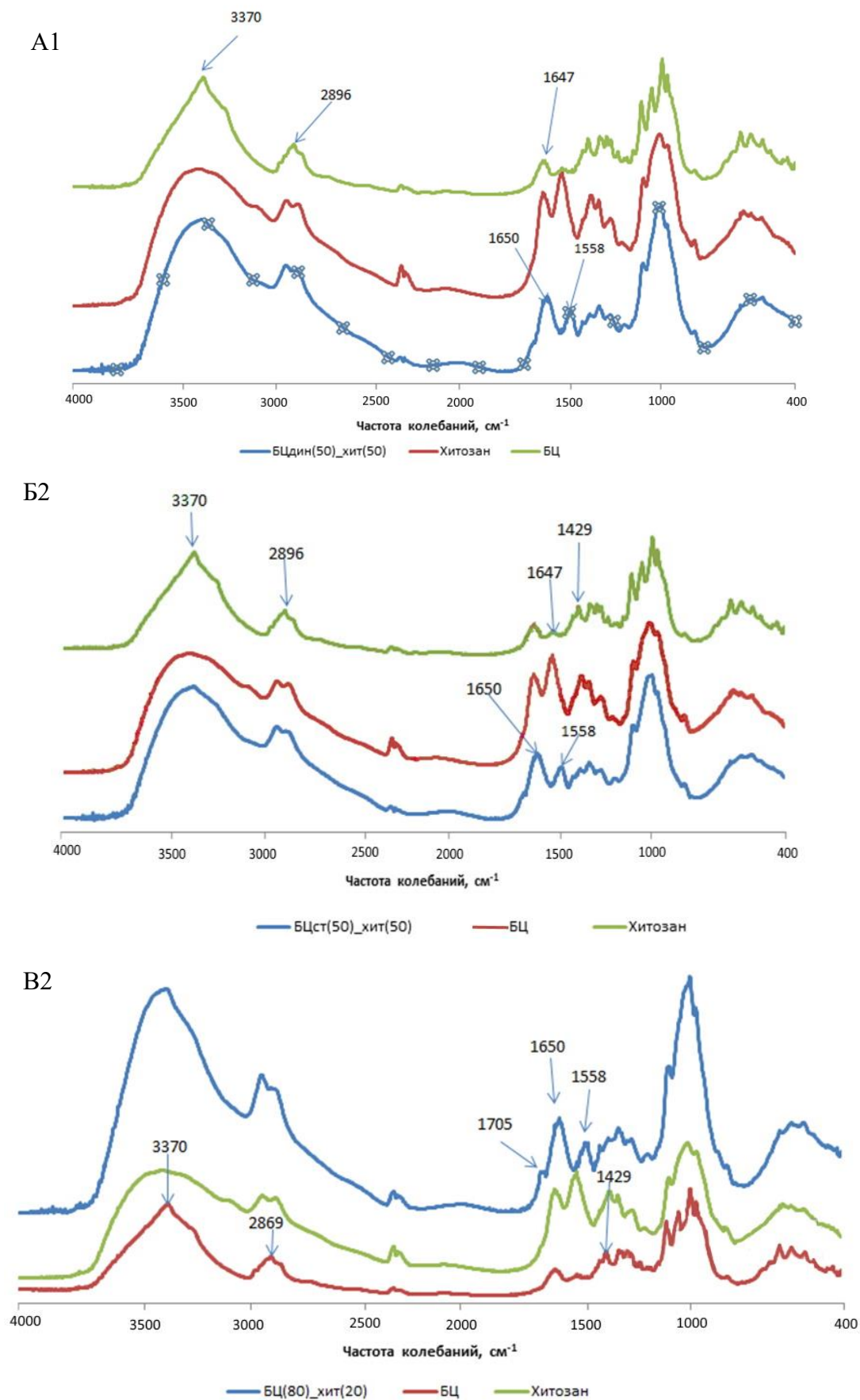


Рисунок 48 – ИК-спектры БЦ, хитозана и композитов, полученных на основе БЦ, выращенной в динамических (1) и статических условиях (2), с 2 % раствором хитозана в соотношениях 50:50 (А, Б) и 80:20 (В)

Спектр полученных композитов БЦ / хитозан показал характеристические пики как для хитозана, так и для БЦ. Однако смещение пиков для ОН, NH₂ (аэрогель хитозана), Н-О-Н (БЦ) в более низкое волновое число может быть связано с образованием водородных связей в аэрогелях БЦ / хитозана. Никаких других очевидных изменений или новых пиков не наблюдалось, что указывает на то, что БЦ была физически присоединена к гидрогелю хитозана.

Также нами была определена пористость указанных ранее трех образцов композитов. Определение пористости материала также является важной характеристикой, определяющей его использование в качестве материала медицинского назначения. Полученные композиты проявили довольно высокую пористость. Образец № 1 имел пористость порядка 88 %, образец № 2 – 92 % и образец № 3 – 96,5 %. Для сравнения определяли также пористость аэрогелей на основе чистой бактериальной целлюлозы и чистого хитозана, сшитого глутаровым альдегидом. Их показатели составили 99 % и 80 %, соответственно. Пористость материала увеличивалась с увеличением количества бактериальной целлюлозы. Возможно, это связано с особенностью строения данного полисахарида.

Морфологию поперечного сечения аэрогелей изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии.

В качестве опытных образцов нами использовались аэрогели на основе чистой бактериальной целлюлозы и хитозана, а также указанных ранее композитов. Как показано на рисунке 49, все 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. 49А). Это может быть связано с более упорядоченной структурой полимера. При добавлении в композит хитозана размер пор увеличивается (рис. 49Б, 49В, 49Г). Наличие пор играет важную роль в таких свойствах аэрогелей, как сжимаемость, набухание, адгезия клеток и диффузия питательных веществ.

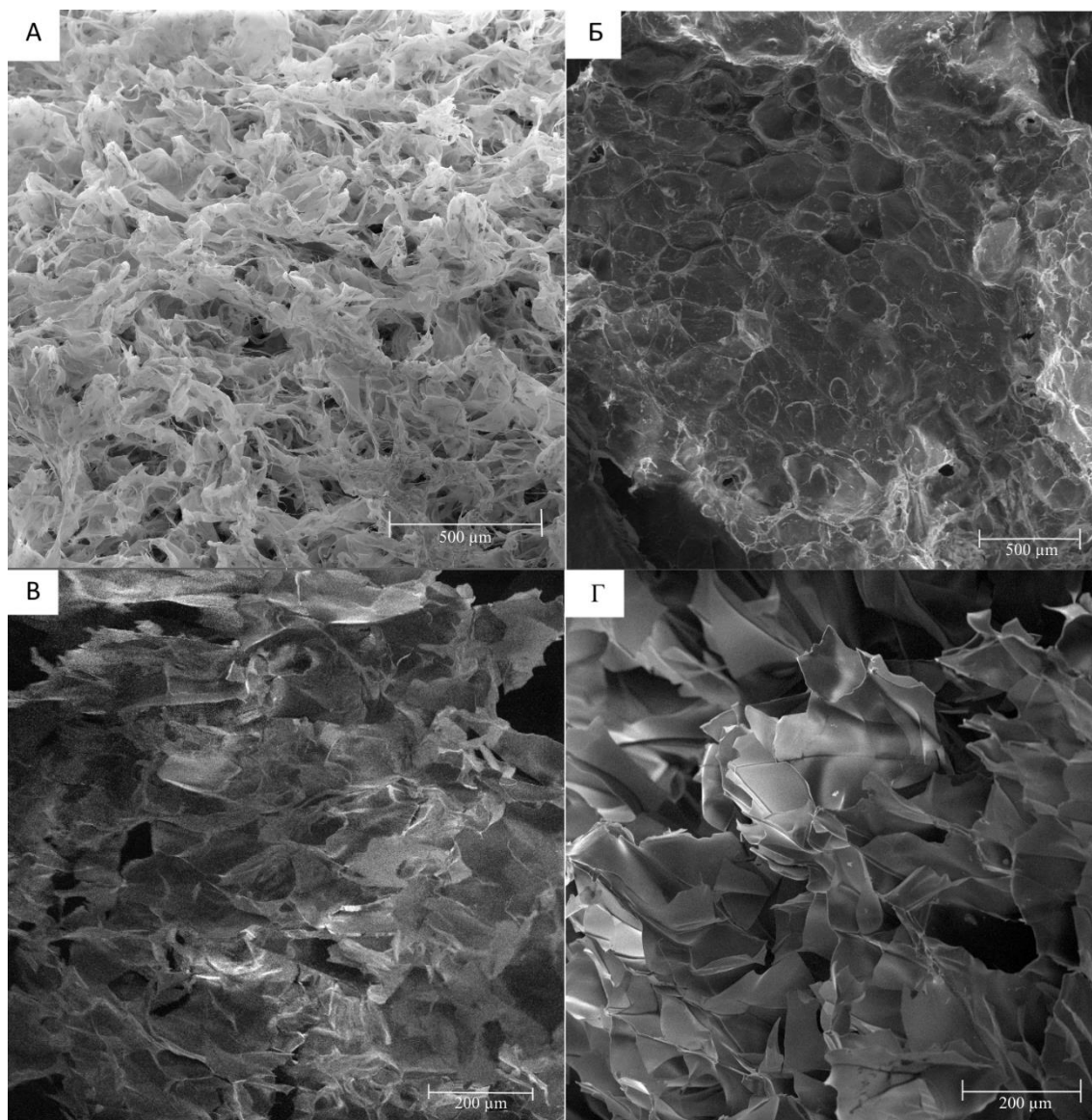
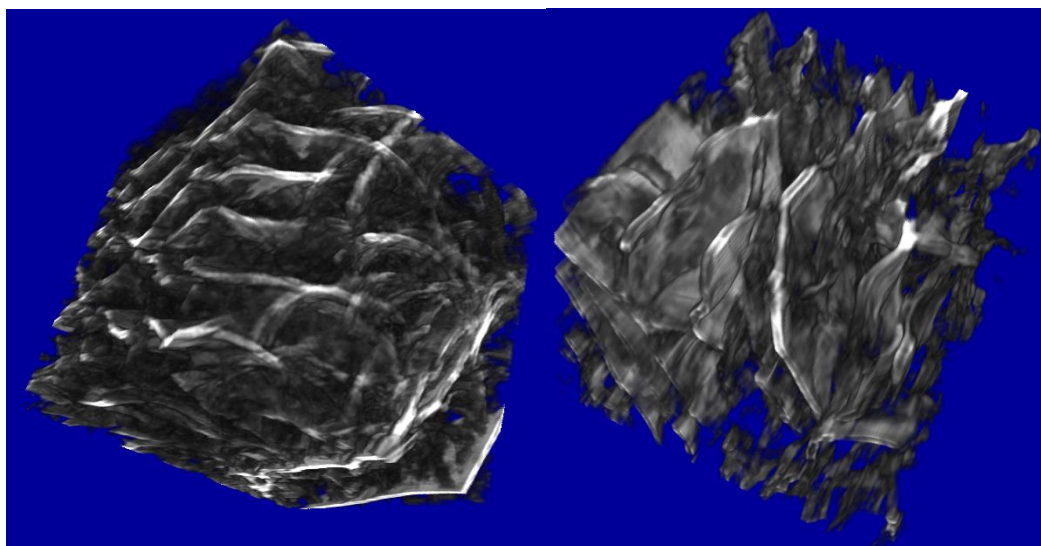


Рисунок 49 – Структура аэрогеля БЦ (а), биокompозита БЦ : хитозан в соотношении 50:50 (б), биокompозита БЦ : хитозан в соотношении 80:20 (в), хитозана (г)

Для дополнительного изучения структуры полученных композиционных материалов использовали метод компьютерной микротомографии. Результаты представлены на рисунке 50.

При сканировании этих образцов установлено, что поры присутствуют по всей толщине материала аэрогеля. Структура аэрогелей при этом является ассиметричной и состоит из наружного верхнего слоя и губчатого пористого слоя. Плотный внешний слой помогает предотвратить бактериальную инвазию, тогда как пористый слой обеспечивает дренаж раневого экссудата и механическую прочность.



а

б

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

Дополнительно проводили гемокоагуляционный тест полученных образцов аэрогелей. При исследовании процесса гемокоагуляции осуществляли измерение времени свертывания крови (табл. 10).

Таблица 10 – Исследование гемокоагулирующих свойств аэрогелей

Материал	Время образования сгустка, сек	Оптическая плотность, 540 нм
Контрольная коагуляция крови	360±15	0,291±0,015
Аэрогель из БЦ	320±12	0,172±0,013
Аэрогель БЦ : хитозан (50:50)	189±11	0,061±0,01
Аэрогель БЦ : хитозан (80:20)	160±7	0,197±0,014
Аэрогель из хитозана	240±11	0,171±0,012

Качество сгустка крови определяли при измерении оптической плотности при 540 нм с помощью спектрофотометра. На стекле время свертывания составило 6 минут, оптическая плотность 0,291. Контролем является образец

крови в дистиллированной воде, оптическая плотность которого составляет 0,409.

Стоит отметить, что бактериальная целлюлоза в форме аэрогеля приводила к ускорению формирования сгустка с 360 секунд до 320 секунд. При этом наиболее выраженное гемокоагулирующее действие видно у образцов с соотношением бактериальная целлюлоза-хитозан равным 80:20. Образцы с соотношением бактериальная целлюлоза-хитозан равным 50:50, как правило менее эффективны в плане продолжительности образования сгустка, но при этом они образуют более плотные сгустки.

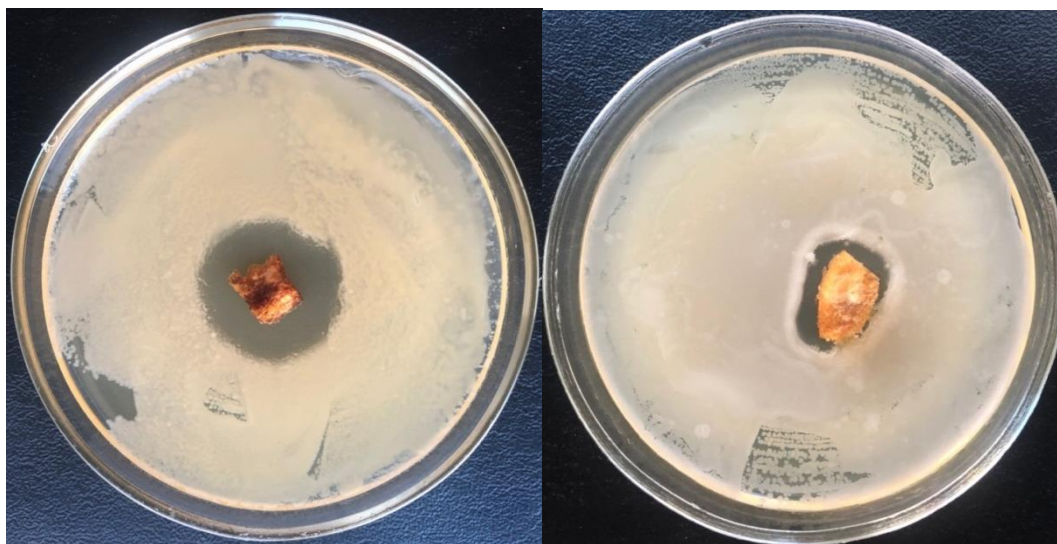
Анализируя полученные данные оптической плотности, мы можем утверждать, что происходит уменьшение оптической плотности при добавлении исследуемых образцов. Меньшая величина поглощения указывает на более сильный гемостатический потенциал образцов.

Проанализировав, полученные результаты мы пришли к выводу, что наиболее оптимальным по способу получения и физико-механическим характеристикам является образец № 3 – композит на основе бактериальной целлюлозы, полученной в статических условиях, смешанной с 2 %-ным раствором хитозана в соотношении 80:20. Данный образец был подвергнут дальнейшим исследованиям.

3.3.1.3 Получение композитов в форме аэрогелей на основе бактериальной целлюлозы и хитозана с фузидовой кислотой

Для придания композиту антибактериальных свойств в его состав была внесена фузидовая кислота.

Проводили определение антибактериальных свойств полученных биокомпозитов. В качестве тест-микроорганизмов использовали бактерии *Staphylococcus aureus* 209 P, *Bacillus licheniformis*. Результаты представлены на рисунке 51.



а

б

Рисунок 51 – 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*

Согласно полученным данным зоны отсутствия роста тест-культур при использовании биокомпозитов в форме аэрогелей, полученных на основе бактериальной целлюлозы, хитозана и фузидовой кислоты в концентрации 200 мкг на 1 г композитасоставляют $26,7 \pm 2,0$ мм, $18 \pm 1,7$ мм соответственно.

Для антимикробного материала важна степень высвобождения антимикробного агента для его практического применения. Предпочтение отдается антимикробному агенту, демонстрирующему оптимально стабильное и пролонгированное высвобождение.

Для изучения характеристик высвобождения фузидовой кислоты из аэрогеля, образцы помещали в фосфатный буферный раствор с рН 7,4 для наблюдения. Как показано на рисунке 52, количество высвобождения изменяется с увеличением времени. Было обнаружено, что количество препарата, высвобождаемого из аэрогеля, достигло 75 % за 24 ч.

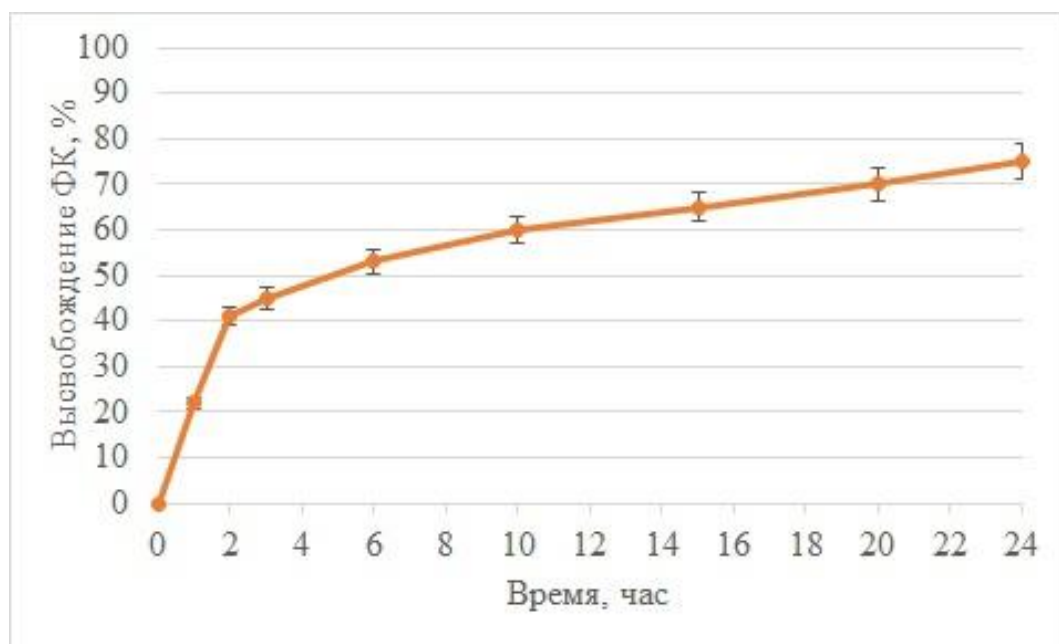


Рисунок 52 – Высвобождение фузидовой кислоты из композита

Результаты по высвобождению лекарственного средства показали, что аэрогели целлюлозы обладают контролируемым высвобождением препарата.

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.

3.3.2 Получение сорбентов ионов фтора на основе бактериальной целлюлозы

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 et al., 2019).

Природные материалы на основе растительной (древесной) целлюлозы долгое время использовались для этих целей, благодаря своей широкой доступности, возобновляемости и биоразлагаемости. В настоящее время наибольший интерес исследователей представляет бактериальная целлюлоза (Torres et al., 2019).

Нами был получен сорбент, который представляет собой следующее: на целлюлозу с помощью ALD-технологии наносили пленку Al_2O_3 различной толщины.

3.3.2.1 Влияние толщины слоя пленки Al_2O_3 на сорбцию фторид-ионов

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. 53). Оптимум исследуемых значений составлял от 50 до 200 нм.

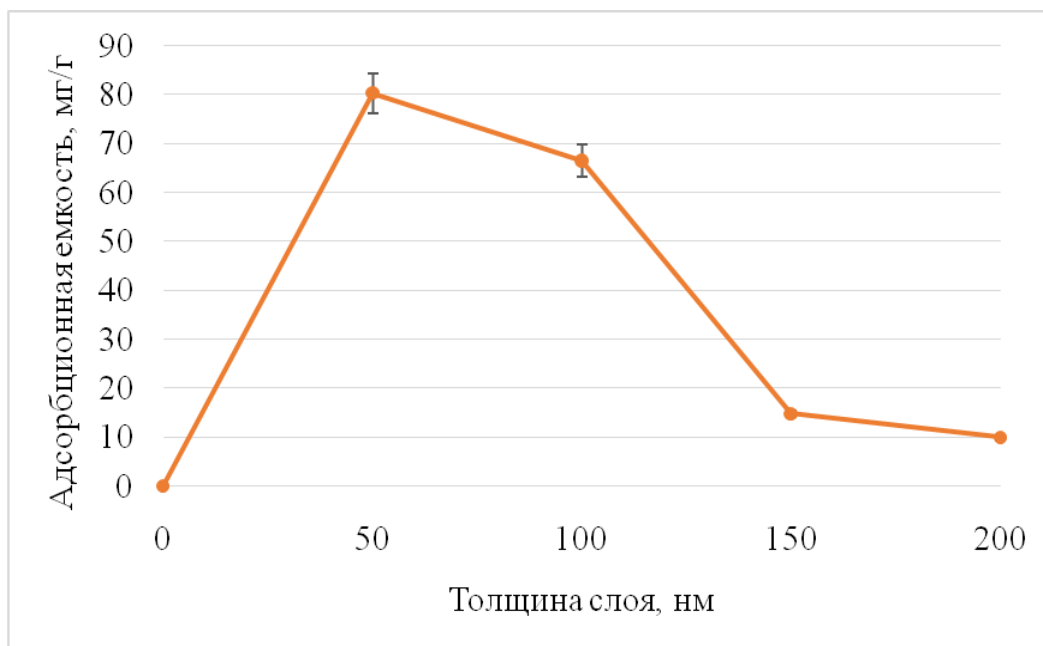


Рисунок 53 – Зависимость значений адсорбционной ёмкости от толщины слоя оксида алюминия на биополимере

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). 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.

3.3.2.2 Влияние pH раствора на адсорбцию фтора

Далее необходимым было исследование влияния pH раствора на процесс адсорбции. Как видно из графика (рис. 54) при увеличении pH до 7 адсорбционная способность увеличивалась, а затем резко снижалась при pH 8. Логично предположить, что повышение основности раствора приводит к возникновению конкуренции между ионами фтора и гидроксид-ионами. В

сильнокислых растворах большая часть фторид-ионов находится в недиссоциированной форме, что снижает их связывание с вакантными центрами сорбента.

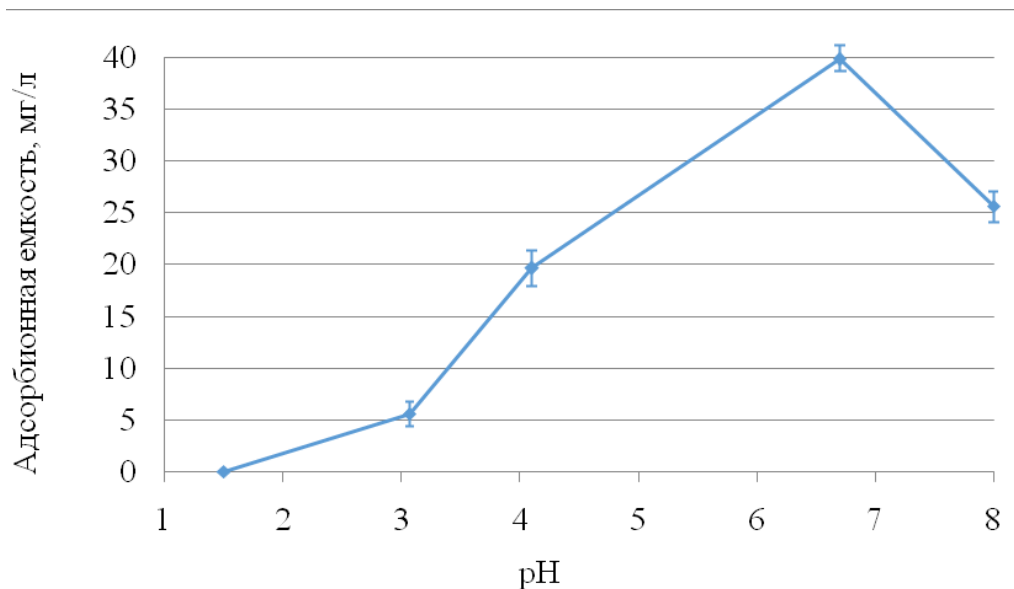


Рисунок 54 – Зависимость значений адсорбционной ёмкости от pH

3.3.2.3 Кинетика процесса сорбции

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. 55). Согласно полученным данным первые 60 мин адсорбционная емкость значительно увеличивается, а после 1 ч происходит ее незначительное изменение. 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.

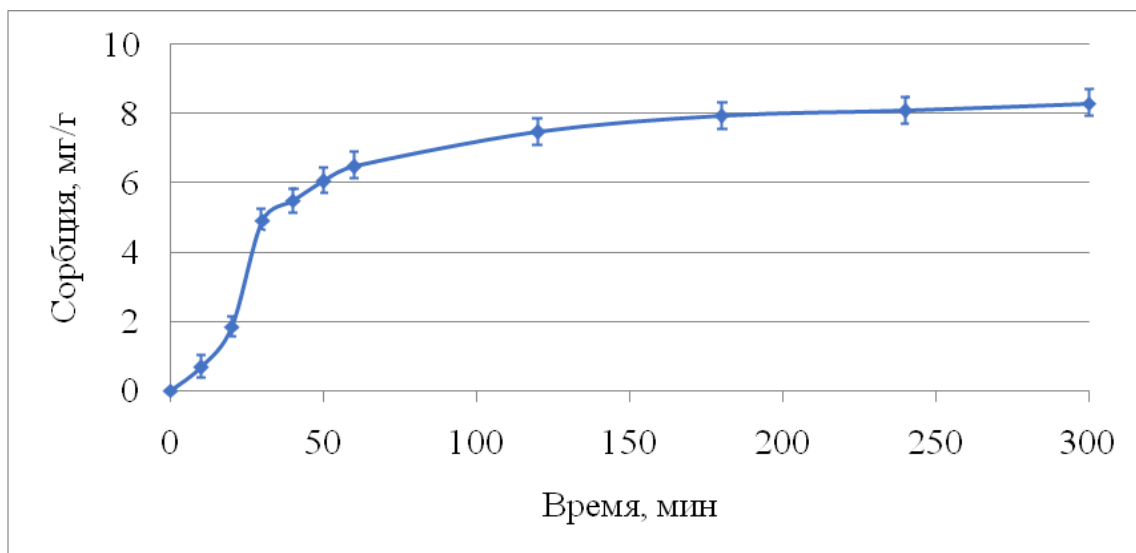


Рисунок 55 – Сорбция фторид-ионов из водного раствора в зависимости от времени

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. Критерием определения стадии, лимитирующей скорость сорбции ионов, является соблюдение линейной зависимости $\ln(1 - F)$ от t – для внешнедиффузионных и Γ_t от $t^{1/2}$ – для внутридиффузионных.

Для внешнедиффузионных процессов, когда стадия, которая контролирует скорость всего процесса, является диффузия в неподвижной пленке раствора вокруг зерна сорбента, кинетическая кривая описывается уравнением 6:

$$\ln(1-F) = -y \cdot t, \quad (6)$$

где t – время, мин;

y – некоторая постоянная для данных условий величина;

F – степень достижения равновесия, рассчитываемая как $F = a_t/a_p$, где a_t – количество сорбированного вещества в момент времени t , ммоль/г;

a_p – количество сорбированного вещества в состоянии равновесия, ммоль/г.

Для процесса, в котором лимитирующей стадией является внутренняя диффузия, служит соблюдение прямолинейной зависимости в координатах Γ_t от $t^{1/2}$, кинетическая кривая описывается уравнением 7:

$$\Gamma_t = K_d \cdot t^{1/2} + A, \quad (7)$$

где Γ_t – количество меди (II) на единицу массы сорбента, ммоль/г;

K_d – константа скорости внутренней диффузии, ммоль · г⁻¹ · мин^{-0,5};

t – время, мин;

A – величина, пропорциональная толщине пленки, окружающей зерно сорбента (отрезок, отсекаемый продолжением прямой зависимости $\Gamma_t = f(t)$ на оси ординат).

Для определения лимитирующей стадии изучаемых процессов были использованы обе модели (рис. 56).

В случае образца имеющего 100 нм слой Al₂O₃ (рис. 56, 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.

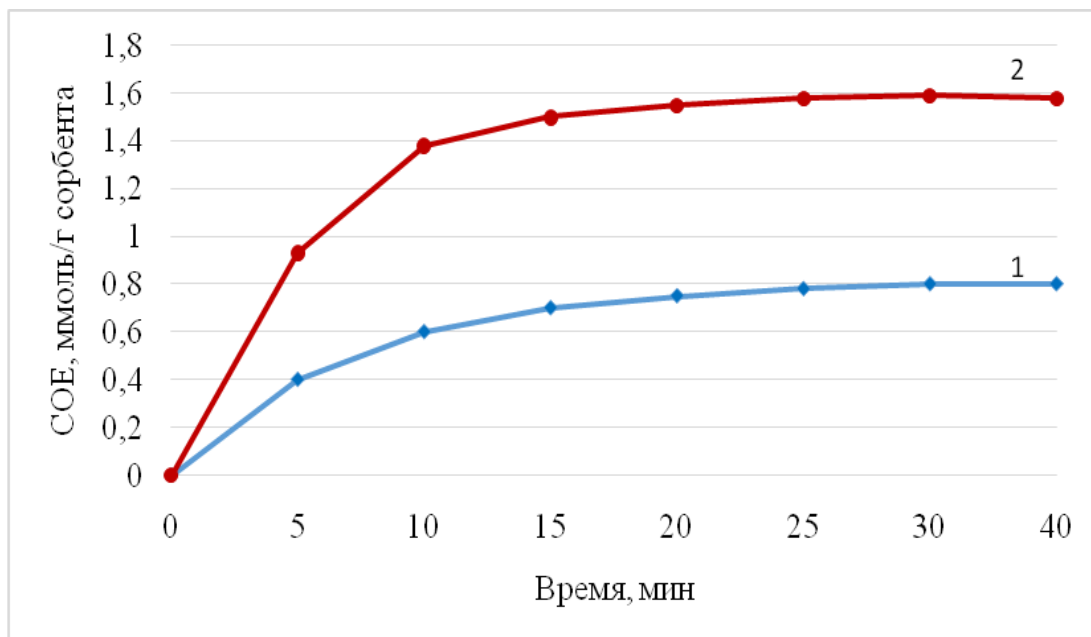


Рисунок 56 – Изотермы сорбции фторид-ионов образцами 1 (100 нм) и 2 (50 нм)

В дальнейшем прямолинейность кинетической кривой нарушается, что свидетельствует о смене механизма сорбции на внутридиффузионный 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 рисунке 56 (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 адсорбата, 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 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. sucrofermentans* 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. sucrofermentans* 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 ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Алешина Л.А., Глазкова С.В. Современные представления о строении целлюлоз // Химия растительного сырья. – 2001. – № 1. – С. 5–36.
- 2 Баклагина Ю.Г., Лукашева Н.В., Хрипунов А.К. Взаимодействие между наноразмерными кристаллическими компонентами композита на основе целлюлозы *Acetobacter xylinum* и фосфатов кальция // Химия высокомолекулярных соединений. – 2010. – № 4. – С. 15–27.
- 3 Богатырева А.О. Оптимизация условий биосинтеза бактериальной целлюлозы и получение на ее основе биокомпозиционных материалов с антибактериальными свойствами: специальность 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»: диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Богатырева Алена Олеговна; ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва». – Москва, 2021. – 220 с.
- 4 Воронова М.И., Лебедева Т.Н., Суворов О.В. Свойства пленок нанокристаллической целлюлозы с различным содержанием сульфатных групп // Химия растительного сырья. – 2013. – № 2. – С. 49–57.
- 5 Гусев И.В. Разработка высокоструктурированных гидрогелевых депо-материалов для направленной доставки лекарственных препаратов: специальность 05.17.06 «Технология и переработка полимеров и композитов»: диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук / Гусев Игорь Вячеславович; Московский гос. университет дизайна и технологии. – Москва, 2015. – 182 с.
- 6 Девятаева А.А., Пестов Н.А. Аэрогели как новый класс перспективных материалов // Материалы научной конференции XLVII Огарёвские чтения. – Саранск, 2019. – С. 10–15.
- 7 Журавлев А.Л., Горожанкина О.В. Аэрогели: свойства, технологии изготовления и перспективы применения // Химия, новые материалы, химические технологии: межвузовский сборник научных трудов. – Воронеж, 2018. – С. 128–132.

- 8 Кривохижая М.В., Наврулин В.О., Калиниченко С.В., Воробьева Л.И. Мутагенез бактерий вида *Staphylococcus aureus* под влиянием ультрафиолетового облучения // Зб. наук. праць: Фактори експериментальної еволюції організмів. Т.8. – Київ: Логос, 2010. – С. 170–174.
- 9 Лияськина Е.В., Ревин В.В., Грошев В.М., Лияськин Ю.К. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов: учебное пособие / Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2010. – 120 с.
- 10 Матуа Д. Бактериальная целлюлоза // The Chemical Journal. – 2018. – №. 1. – С. 22–29.
- 11 Перминов П.А., Кильдеева Н.Р., Вихорева Г.А., Владимиров Л.В. Изучение взаимодействия хитозана с глутаровым альдегидом // Московский государственный текстильный университет. – 2006. – С. 119–122.
- 12 Ревин В.В., Лияськина Е.В. Штамм *Glucanacetobacter sucrofermentans* – продуцент бактериальной целлюлозы / Патент № 2523606 Российская Федерация (20.07.2014). – 6 с.
- 13 Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назарова Н.Б., Саликов А.В., Федоров И.Г. Способ получения биокompозита на основе аэрогеля бактериальной целлюлозы, обладающего кровоостанавливающими свойствами / Патент № 2736061 Российская Федерация (11.11.2020). – 8 с.
- 14 Ревин В.В., Лияськина Е.В., Пестов Н.А. Получение бактериальной целлюлозы и нанокompозиционных материалов: монография / Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2014. – 128 с.
- 15 Ревин В.В., Лияськина Е.В., Сапунова Н.Б. Штамм *Komagataeibacter hansenii* – продуцент бактериальной целлюлозы / Патент № 2681281 Российская Федерация (05.03.2019). – 7 с.
- 16 Ревина Н.В., Лияськина Е.В., Костин С.В. Раневые покрытия на основе бактериальной целлюлозы для регенерационных процессов // Гены и клетки. – 2017. – Т.12, № 3. – 147–148.

- 17 Титок В.В., Леонтьев В.Н., Федоренко И.В. Биосинтез целлюлозы: современный взгляд и концепции // Труды Белорусского государственного университета. – 2007. – Т. 2, Т. 1. – С. 54–56.
- 18 Хань Ф.М., Громовых Т.И. Изучение нового продуцента бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 // «Живые системы и биологическая безопасность населения»: Материалы VIII Международной научной конференции студентов и молодых ученых – Москва, 2010. – С. 146–148.
- 19 Ahmed E.M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: A review // Journal of Advanced Research. – 2015. – Vol. 6. – P. 105–121.
- 20 Ahmed J., Gultekinoglu M., Edirisinghe M. Bacterial cellulose micro-nano fibres for wound healing applications // Biotechnology Advances. – 2020. – Vol. 41. – P. 1–14.
- 21 Ahsan S.M., Ashan M., Reddy K.K., Sooraparaju S.G. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – Vol. 110. – P. 97–109.
- 22 Alemu S., Mulugeta E., Zewge F., Chandravanshi B.S. Water defluoridation by aluminium oxide-manganese oxide composite material // Environ.Technol. – 2014. – Vol. 35. – P. 1893–1903.
- 23 Alhassan S.I., He Y., Huang L., Wu B., Yan L., Deng H., Wang H. A review on fluoride adsorption using modified bauxite: Surface modification and sorption mechanisms perspectives // J. Environ. Chem. Eng. – 2020. – Vol. 8. – P. 16–36.
- 24 Astrini N., Anah L., Haryadi H.R. Adsorption of heavy metal ion from aqueous solution by using cellulose based hydrogel composite // Macromolecular Symposia. – 2015. – Vol. 353. – I. 1. – P. 191–197.
- 25 Atwa N.A., Nagwa A.A., El-Diwany A.L., El-Saied H., Basta A.H. Improvement in bacterial cellulose production using *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245 and characterization of the cellulose pellicles produced // Egyptian Pharmaceutical journal. – 2015. – Vol. 1. – I. 2. P. 123–129.

- 26 Auta R., Adamus G., Kwiecien M., Radecka I., Hooley P. Production and characterization of bacterial cellulose before and after enzymatic hydrolysis // *African Journal of Biotechnology*. – 2017. – Vol. 16, I. 10. – P. 470–482.
- 27 Aydin Y.A., Askoy N.D. Isolation and characterization of an efficient bacterial cellulose producer strain in agitated culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2014. – Vol. 98. – I. 3. – P. 1065–1075.
- 28 Aydogdu M.O., Altun E., Crabbe-Mann M., Brako F. Cellular interactions with bacterial cellulose: Polycaprolactone nanofibrous scaffolds produced by a portable electrohydrodynamic gun for point-of-need wound dressing // *Wiley*. – 2018. – Vol. 121. – P. 1–9.
- 29 Azredo H.M.C., Barud H., Farinas C.S., Vasconcellos V.M. Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications // *Frontiers in Sustainable Food Systems*. – 2019. – Vol. 3. – P. 45–57.
- 30 Bae S., Sugano Y., Shoda M. Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor // *Journal of Bioscience and bioengineering*. – 2004. – Vol. 97, № 1. – P. 33–38.
- 31 Bae S.O. Sugano Y., Ohi K., Shoda M. Features of bacterial cellulose synthesis in a mutant generated by disruption of the diguanylate cyclase 1 gene of *Acetobacter xylinum* BPR 2001 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 64. – P. 315–322.
- 32 Basta A.H., Atwa D.E. Production and characterization of economical bacterial cellulose // *BioResources*. – 2008. – V. 3. – P. 1196–1217.
- 33 Bayazidi P., Almasi H., Asl A.K. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: characteristics, antimicrobial activity and morphological properties // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 107. – P. 2544–2551.
- 34 Blanco A., Monte M.C., Compano C. Nanocellulose for industrial use // *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications*. – 2018. – Vol. 5. – P. 74–126.

- 35 Blanco Parte F.G., Santoso S.P., Chou C.C., Verma V., Wang H.T., Ismadji S., Cheng K.C. Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2020. – P. 1–18.
- 36 Borg A., Holm M., Shiroyama I., Hauryliuk V., Pavlov M., Sanyal S., Ehrenberg M. Fusidic acid targets elongation factor G in several stages of translocation on the bacterial ribosome // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290. – P. 3440–3454.
- 37 Brinchi L., Cotana F., Fortunati E., Kenny J. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: technology and applications // *Carbohydrate Polymers*. – 2013. – Vol. 94. – P. 154–169.
- 38 Brown E. Bacterial cellulose/thermoplastic polymer nanocomposites // Washington state university. – 2007. – 109 p.
- 39 Brown E.E., Hu D., Abu Lail N., Zhang X. Potential of nanocrystalline cellulose–fibrin nanocomposites for artificial vascular graft applications // *Biomacromolecules*. – 2013. – Vol. 14. – P. 1063–1071.
- 40 Brown Jr.R.M., Saxena I.M. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers // *Plant physiol biochem.* – 2000. – Vol. 38. – P. 57–67.
- 41 Cacicedo M.L., Castro M.C., Servetas I., Bosnea L., Boura K., Tsafrakidou P., Castro G.R. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications // *Bioresource Technology*. – 2016. – Vol. 213. – P. 172–180.
- 42 Campano C., Balea A., Blanco A., Negro C. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review // *Cellulose*. – 2015. – Vol. 23. – I. 1. – P. 57–91.
- 43 Castro C., Zuluaga R., Álvarez C., Putaux J.L. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter genus* // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – Vol. 89. – I. 4. – P. 1033–1037.

- 44 Castroa C., Zuluagab R., Caroa G. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swigsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes // Carbohydrate Polymers. – 2011. – V. 84. – P. 96–102.
- 45 Cavka A., Guo X., Tang S.J., Winstrand S., Jönsson L.J., Hong F. Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge // Biotechnol. Biofuels. – 2013. – Vol. 6. – 25. Doi:10.1186/1754-6834-6-25
- 46 Chang W.S., Chen H.H. Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings // Food Hydrocolloids. – 2016. – Vol. 53. – P. 75–83.
- 47 Chao Y., Ishida T., Sugano Y., Shoda M. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor // Biotechnol. Bioeng. – 2005. – V. 68, № 3. – P. 345–352.
- 48 Chen Y., Koripella R.K., Sanyal M. *Staphylococcus aureus* elongation factor G-structure and analysis of a target for fusidic acid // FEBS Journal. – 2010. – Vol. 277. – P. 3789–3803.
- 49 Chenite A., Chaput C., Wang D., Combes C., Buschmann M.D., Hoemann C.D., Leroux J.C., Atkinson B.L., Binette F., Selmani A. Novel inject able neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ // Biomaterials. – 2000. – V. 21. – P. 2155–2161.
- 50 Chenite A., Buschmann M., Wang D., Chaput C., Kandani N. Rheological characterization of thermo gelling chitosan/glycerol –phosphate solutions // Carbohydrate Polymers. – 2001. – V. 46. – P. 39–47.
- 51 Chiaoprakobkij N., Seetabhawang S., Sanchavanakit N., Phisalaphong M. Fabrication and characterization of novel bacterial cellulose/alginate/gelatin biocomposite film // Journal of Biomaterials Science Polymer Edition. – 2019. – Vol. 30. – I. 11. – P. 961–982.
- 52 Choi C., Nam J.P., Nah J.W. Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. – 2016. – Vol. 33. – P. 1–10.
- 53 Ciolacu D., Ciolacu F., Popa V.I. Amorphous cellulose – structure and

characterization // Cellulose chemistry and technology. – 2011. – Vol. 45. – I.1. – P. 13- 21.

54 Czaja W., Romanovicz D., Brown R. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture // Cellulose. – 2004. – Vol. 11. – P. 403–411.

55 de Amorim J.D.P., de Souza K.C., Duarte C.R. Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review // Environ. Chem. Lett. – 2020. – Vol. 18. – P. 851–869.

56 Deng Y., Nagachar N., Xiao C., Tien M. Identification and characterization of non-cellulose-producing mutants of *Gluconacetobacter hansenii* generated by Tn5 transposon mutagenesis // Journal of Bacteriology. – 2013. – Vol. 195. – I. 22. – P. 5072–5083.

57 Du R., Zhao F., Peng Q., Zhou Z. Production and characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* isolated from Chinese persimmon vinegar // Carbohydrate Polymers. – 2018. – Vol. 194. – P. 200–207.

58 Esa F., Tasirin S.M., Rahman N.A. Overview of bacterial cellulose production and application // Agriculture and Agricultural Science Procedia. – 2014. – Vol. 2. – P. 113–119.

59 Eslahi N., Mahmoodi A., Mahmoudi N., Zandi N. Processing and Properties of nanofibrous bacterial cellulose-containing polymer composites: a review of recent advances for biomedical applications // Polymer Reviews. – 2020. – Vol. 60. – I. 1. – P. 144–170.

60 Farrell D.J., Castanheira M., Chopra I. Characterization of global patterns and the genetics of fusidic acid resistance // Clinical Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 52. – P. 487–492.

61 Fels L., Jakob F., Vogel R.F., Wefers D. Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir // Carbohydrate Polymers. – 2018. – Vol. 189. – P. 296–303.

- 62 Fennell E., Huyghe J.M. Chemically responsive hydrogel deformation mechanics: a review // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – P. 1–22.
- 63 Fernández J., Morena A.G., Valenzuela S.V. Microbial cellulose from a *Komagataeibacter intermedius* strain isolated from commercial wine vinegar // *Journal Polym. Environ.* – 2019. – Vol. 27. – P. 956–967.
- 64 Fijałkowski K., Peitler D., Rakoczy R., Zywicka A. Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution // *LWT Food Sci. Technol.* – 2016. – Vol. 68. – P. 322–328.
- 65 Fontana J.D., Fontana J.D., Koop H.S., Tiboni M. New insights on bacterial cellulose // *Food Biosynthesis*. – 2017. – Vol. 7. – P. 213–249.
- 66 Gómez-Hortigüela L., Pérez-Pariente J., García R., Chebude Y., Díaz I. Natural zeolites from Ethiopia for elimination of fluoride from drinking water // *Sep. Purif. Technol.* – 2013. – Vol. 120. – P. 224–229.
- 67 Guilherme Fadel P., Pirich C.L., Sierakowski M.R., Woehl M.A. Bacterial cellulose in biomedical applications: a review // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – Vol. 104. – P. 97–106.
- 68 Gulitz A., Stadie J., Wenning M., Ehrmann M.A., Vogel R.F. The microbial diversity of water kefir // *Int. J. Food Microbiol.* – 2011. – Vol. 151. – P. 284–288.
- 69 Gustaite S., Kazlauske J., Bobokalonov J., Perni S., Dutschk V., Liesiene J., Prokopovich P. Characterization of cellulose based sponges for wound dressings // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2015. – Vol. 480. – P. 336–342.
- 70 Gustaitea S., Kazlauskea J., Bobokalonova J., Perni S. Characterization of cellulose based sponges for wound dressings // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2014. – Vol. 7. – P. 1–7.
- 71 Guven O., Sen M., Karadag E., Saraydin D. A review on the radiation synthesis of copolymeric hydrogels for adsorption and separation purposes // *Radiat. Phys. Chem.* – 1999. – Vol. 56 – Iss. 4. – P. 381–386.

- 72 Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2008. – Vol. 60. – P. 1638–1649.
- 73 Huang Y., Zhu C.L., Yang J.Z., Nie Y., Chen C.T. Recent advances in bacterial cellulose // *Cellulose*. – 2014. – Vol. 21. – P. 1–30.
- 74 Huang L., Yang Z., He Y., Chai L., Yang W., Deng H., Crittenden J. Adsorption mechanism for removing different species of fluoride by designing of core-shell boehmite // *Journal of Hazardous Materials*. – 2020. – Vol. 394. – P. 1–10.
- 75 Hungund B.S., Gupta S.G. Strain improvement of *Gluconacetobacter xylinus* NCIM 2526 for bacterial cellulose production // *African Journal of Biotechnology*. – 2010. – Vol. 9. – I. 32. – P. 15–35.
- 76 Iino T., Suzuki R., Tanaka N., Kosako Y., Ohkuma M., Komagata K., Uchimura T. *Gluconacetobacter kakiaceti* sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from a traditional Japanese fruit vinegar // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2011. – Vol. 62. – P. 1465–1469.
- 77 Imai T., Sun S.J., Horikawa Y. Functional reconstitution of cellulose synthase in *Escherichia coli* // *Biomacromolecules*. – 2014. – Vol. 15. – P. 4206–4213.
- 78 Ishida T., Sugano Y., Nakai T., Shoda M. Effects of acetan on production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2002. – Vol. 66. – I. 8. – P. 1677–1681.
- 79 Jahan F., Kumar V., Rawat G., Saxena R. Production of microbial cellulose by a bacterium isolated from fruit // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 167. – I. 5. – P. 1157–1171.
- 80 Jia Y., Wang X., Huo M., Zhai X., Li F. Preparation and characterization of a novel bacterial cellulose/chitosan bio-hydrogel // *Nanomaterials and Nanotechnology*. – 2017. – Vol. 7. – P. 1–15.
- 81 Jiang G., Jin L., Pan Q., Peng N., Meng Y., Huang L., Wang H. Structural modification of aluminum oxides for removing fluoride in water: crystal forms and metal ion doping // *Environmental Technology*. – 2021. – P. 1–14.

82 Jozala A.F., de Lencastre-Novaes L.C., Lopes A.M. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – Vol. 100, № 5. – P. 2063–2072.

83 Jyoti K., Malik G., Chaudhary M., Sharma M., Goswami M., Katare O.P., Singh S.B., Madan J. Chitosan and phospholipid assisted topical fusidic acid drug delivery in burn wound: strategies to conquer pharmaceutical and clinical challenges, opportunities and future panorama // *Int J Biol Macromol*. – 2020. – Vol. 161. – P. 325-335

84 Karimian A., Parsian H., Majidinia M. Nanocrystalline cellulose: preparation, physicochemical properties, and applications in drug delivery systems // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – Vol. 125. – P. 125–138.

85 Kawano S., Yasutake Y., Tajima K., Satoh Y. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the cellulose biosynthesis-related protein CMCax from *Acetobacter xylinum* // *Acta Crystallographica Section F. Structural Biology and Crystallization Communications*. – 2005. – Vol. 61. – I. 2. – P. 252–254.

86 Khandare D., Tembhurkar A., Mukherjee S. Adsorptive removal of fluoride from water using non-conventional adsorbent // *Lect. Notes Civ. Eng.* – 2021. – Vol. 87. – P. 447–455.

87 Kim S.S., Lee S.Y., Park K.J., Park S.M. *Gluconacetobacter* sp. gel_SEA623-2, bacterial cellulose producing bacterium isolated from citrus fruit juice // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2017. – Vol. 24. – I. 2. – P. 314–319.

88 Kim S.Y., Kim J.N., Wee Y.J. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 isolated from persimmon vinegar // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2006. – Vol. 121. – P. 705–715.

89 Klemm D., Fink H.B., Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material // *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* – 2005. – Vol. 44. – P. 3358–3393.

90 Kondo T. Hydrogen bonds in regioselectively substituted cellulose derivatives // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. – 1994. – Vol.

32. – P. 1229–1236.

91 Krystynowicz A., Czaja W., Wiktorowska-Jeziarska A. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2002. – Vol. 29, I. 4. – P. 189–195.

92 Krystynowicz A., Koziółkiewicz M., Wiktorowska-Jeziarska A. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum* // *Institute of Technical Biochemistry* – 2005. – Vol. 52(3). – P. 691–698.

93 Kumar R., Sharma P., Aman A.K., Singh R.K. Equilibrium sorption of fluoride on the activated alumina in aqueous solution // *Desalin. Water Treat.* – 2020. – Vol. 197. – P. 224–236.

94 Laureys D., De Vuyst L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – Vol. 80. – P. 2564–2572.

95 Lee K.Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites // *Macromolecular bioscience*. – 2014. – Vol. 14. – P. 10–32.

96 Liang J., Wang R., Chen R. The impact of cross-linking mode on the physical and antimicrobial properties of a chitosan/bacterial cellulose composite // *Polymers (Basel)*. – 2019 – Vol. 11. – I. 3. – 491. doi: 10.3390/polym11030491

97 Lin S.P., Huang Y.H., Hsu K.D., Lai Y.J. Isolation and identification of cellulose-producing strain *Komagataeibacter intermedius* from fermented fruit juice // *Carbohydrate Polymers*. – 2016. – Vol. 151. – P. 827–833.

98 Lin D., Liu Z., Shen R., Chen S., Yang X. Bacterial cellulose in food industry: current research and future prospects // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 158. – P. 1007–1019.

99 Lin D., Lopez-Sanchez P., Li R., Li Z. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source // *Bioresource Technology*. – 2014. – Vol. 151. – P. 113–119.

- 100 Liu M., Liu L., Jia S., Li S. Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – P. 62–66.
- 101 López-Cervantes J., Sánchez-Machado D.I., Sánchez-Duarte R.G. Study of a fixed-bed column in the adsorption of an azo dye from an aqueous medium using a chitosan–glutaraldehyde biosorbent // Adsorption Science & Technology. – 2017. – Vol. 36. – P. 215–232.
- 102 Machado R.T.A., Gutierrez J., Tercjak A. *Komagataeibacter rhaeticus* as an alternative bacteria for cellulose production // Carbohydrate Polymers. – 2016. – Vol. 152. – P. 841–849.
- 103 Malheiros P.S., Jozala A.F., Pessoa A.J. Immobilization of antimicrobial peptides from *Lactobacillus sakei subsp. sakei* 2a in bacterial cellulose: structural and functional stabilization // Food Pack. Shelf Life. – 2018. – Vol. 17. – P. 25–29.
- 104 McNamara J.T., Morgan J.L., Zimmer J. A molecular description of cellulose biosynthesis // Annu Rev. Biochem. – 2015. – Vol. 84. – P. 895–921.
- 105 Mezzenga R., Zhang Q., Bolisetty S., Cao Y., Handschin S., Adamcik J., Peng Q. Selective and efficient removal of fluoride from water by *in situ* engineered amyloid fibrils-ZrO₂ hybrid membranes // Angewandte Chemie International Edition. – 2019. – Vol. 58. – P. 6012–6016.
- 106 Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar // Anal. Chem. – 1959. – Vol. 31, I. 31. – P. 426–428.
- 107 Mohamed M.G.A., Roya P.A., Yang S.A. Microfluidics-based fabrication of cell-laden microgels // Biomicrofluidics. – 2020. – Vol. 14. – P. 1–16.
- 108 Molinaro G., Leroux J.C., Damas J., Adam A. Biocompatibility of thermo sensitive chitosan – based hydrogels an *in vivo* experimental approach to inject able biomaterials // Biomaterials. – 2002. – Vol. 23. – P. 2717–2722.
- 109 Mondal N.K., Bhaumik R., Datta J.K. Removal of fluoride by aluminum impregnated coconut fiber from synthetic fluoride solution and natural water // Alexandria Eng. J. – 2015. – Vol. 54. – P. 1273–1284.

110 Montes S., Maleki H. Aerogels and their applications // Colloidal Metal Oxide Nanoparticles. – 2020. – P. 337–399.

111 MuhdJulkapli N., Bagheri S. Nanocellulose as a green and sustainable emerging material in energy applications: a review // Polymers for Advanced Technologies. – 2017. – Vol. 28. – P. 1583–1594.

112 Muxika A., Etxabide A., Uranga J., Guerrero P. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications // International Journal of Biological Macromolecules. – 2017. – Vol. 105. – P. 1358–1368.

113 Nainggnon H., Beil J. Mechanical and thermal properties of bacterial-cellulose- fibre-reinforced Mater Bi bionanocomposite // Nanotechnology. – 2013. – Vol. 4. – P. 325–329.

114 Nigussie W., Zewge F., Chandravanshi B.S. Removal of excess fluoride from water using waste residue from alum manufacturing process // J. Hazard. Mat. – 2007. – Vol. 147. – P. 954–963.

115 Nijhawan A., Butler E.C., Sabatini D.A. Fluoride adsorption on porous hydroxyapatite ceramic filters: a study of kinetics // Environ. Eng. Sci. – 2020. – Vol. 37. – P. 409–416.

116 Nizam P.A., Gopakumar D.A., Pottathara Y.B. Nanocellulose-based composites. Nanocellulose based composites for electronics // Composites. – 2021. – Vol. 164. – P. 15–29.

117 Nobles D.R, Brown R.M. Transgenic expression of *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53582 cellulose synthase genes in the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis* strain UTCC 100 // Cellulose. – 2008. – Vol.15. – P. 691–702.

118 Otoni C.G., Avena-Bustillos R.J. Recent advances on edible films based on fruits and vegetables – a review // Compreh. Rev. Food Sci. Food Safety. – 2017. – Vol. 16. – P. 1151–1169.

119 Pa'e N. Rotary discs reactor for enhanced production of microbial cellulose: monography // Universiti Teknologi Malaysia, Faculty of Chemical and Natural Resource Engineering, 2009. – 97 p.

120 Pacheco G., Nogueira C.R., Meneguín A.B., Trovatti E., Silva C.C., Machado T.A., Ribeiro J.L., da Silva Filho E.C., Barud S.H. Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source // *Industrial Crops & Products*. – 2017. – Vol. 107. – P. 13–19.

121 Palza H., Gutierrez E., Burdiles P.A., Quero F., Palma P. 3D Printing of antimicrobial alginate/bacterial-cellulose composite hydrogels by incorporating copper nanostructures // *ACS Biomaterials Science & Engineering*. – 2019. – Vol. 11. – P. 6290–6299.

122 Peppas N.A., Huang Y., Torres-Lugo M. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* – 2000. – Vol. 2. – P. 9–29.

123 Philibert T., Lee B.H., Fabien N. Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 181. – P. 1314–1337.

124 Piasecka Z., Szulc J., Wietecha J., Ciechańska D. An *in vivo* biocompatibility study of surgical meshes made from bacterial cellulose modified with chitosan // *International Journal of Biological Macromolecules* – 2018 – Vol. 116. – P. 1119–1127.

125 Portela R., Leal C.R., Almeida P.L. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications // *Microbial Biotechnology*. – 2019. – Vol. 612. – P. 1–25.

126 Pöttinger Y., Kralisch D., Fischer D. Bacterial nanocellulose: the future of controlled drug delivery? // *Therapeutic Delivery*. – 2017. – Vol. 8. – P. 753–761.

127 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. 36 – P. 1–12.

128 Retegi A., Gabilondo N. Bacterial cellulose films with controlled microstructure–mechanical property relationships // *Cellulose*. – 2010. – № 17. – P. 661–669.

129 Revin V.V., Liyas'kina E.V., Sapunova N.B., Bogatyreva A.O. Isolation and characterization of the strains producing bacterial cellulose // *Microbiology*. – 2020. – Vol. 89. – I. 1. – P. 86–95.

130 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 sucrofermentans* H-110 on molasses medium and obtaining a biocomposite based on it for the adsorption of fluoride // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13. – P. 1–16.

131 Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications // *Progress in Polymer Science*. – 2006. – Vol. 31. – I. 7. – P. 603–632.

132 Ryngajłło M., Kubiak K., Jędrzejczak-Krzepkowska M., Jacek P., Bielecki S. Comparative genomics of the *Komagataeibacter* strains – Efficient bionanocellulose producers // *Microbiologyopen* – 2018. – Vol. 46. – P. 1–12.

133 Sanyang M.L., Saba N., Jawaid M., Mohammad F. Bacterial nanocellulose applications for tissue engineering. Nanocellulose and nanohydrogel matrices // *Composites*. – 2017. – Vol. 168. – P. 47–66.

134 Semjonovs P., Ruklisha M., Paegle L., Saka M. Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – Vol. 101. – I. 3. – P. 1003–1012.

135 Shak K.P.Y., Pang Y.L., Mah S.K. Nanocellulose: recent advances and its prospects in environmental remediation // *Beilstein Journal of Nanotechnology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2479–2498.

136 Sheu F., Wang C.L., Shyu Y.T. Fermentation of *Monascus purpureus* on bacterial cellulose-nata and the color stability of Monascus-nata complex // *J. Food Sci.* – 2000. – Vol. 65. – P. 342–345.

137 Shi Z., Zhang Y., Phillips G.O., Yang G. Utilization of bacterial cellulose in food // *Food Hydrocoll.* – 2014. – Vol. 35. – P. 539–545.

138 Shigematsu T., Takamine T., Kitazato M., Morita T. Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (gdh)-deficient mutant

of *Gluconacetobacter xylinus* and its use for bioconversion of sweet potato pulp // Journal Biosci. Bioeng. – 2005. – Vol. 99. – P. 415–422.

139 Shimelis B., Zewge F., Chandravanshi B.S. Removal of excess fluoride from water by aluminum hydroxide // Bull. Chem. Soc. Ethiop. – 2006. – Vol. 20. – P. 17–34.

140 Singh O., Panesar P.S., Chopra H.K. Isolation and characterization of cellulose producing bacterial isolate from rotten grapes // Bioscience Biotechnology Research Asia. – 2017. – Vol. 14. – I. 1. – P. 373-380.

141 Sionkowska A., Mężykowska O., Piątek J. Bacterial nanocellulose in biomedical applications: a review // Polymer International. – 2020. – Vol. 68. – I. 11. – P. 1841–1847.

142 Siripong P. Enhanced cellulose production by ultraviolet (UV) irradiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) mutagenesis of an *Acetobacter species* isolate // African Journal of Biotechnology. – 2012. – Vol. 11. – I. 6. – P. 1433–1442.

143 Takmil F., Esmaeili H., Mousavi S.M., Hashemi S.A. Nano-magnetically modified activated carbon prepared by oak shell for treatment of wastewater containing fluoride ion // Adv. Powder Technol. – 2020. – Vol. 31. – P. 3236–3245.

144 Thompson D.N., Hamilton M.A. Production of bacterial cellulose from alternate feedstocks // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2001. – Vol. 93, № 5. – P. 13–18.

145 Tomlinson J.H., Kalverda A.P., Calabrese A.N. Fusidic acid resistance through changes in the dynamics of the drug target // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – Vol. 117. – P. 25523–25531.

146 Torgbo S., Sukyai P. Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering // Applied materials today. – 2018. – Vol. 11. – P. 34–49.

147 Torres F.G., Arroyo J.J., Troncoso O.P. Bacterial cellulose nanocomposites: An all-nano type of material // Materials Science and Engineering: C. – 2019. – Vol. 98. – P. 1277–1293.

148 Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D. Bacterial cellulose production

from industrial waste and by-product streams // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Vol. 16. – I. 7. – P. 14832–14849.

149 Ullah M.W., Ul-Islam M., Khan S. Innovative production of bio-cellulose using a cell-free system derived from a single cell line // *Carbohydr Polym.* – 2015. – Vol. 132. – P. 286–294.

150 Verlee A., Mincke S., Stevens C.V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives // *Carbohydr. Polym.* – 2017. – Vol. 164. – P. 268–283.

151 Volova T.G., Prudnikova S.V., Sukovatyi A.G., Shishatskay E.I. Production and properties of bacterial cellulose by the strain *Komagataeibacter xylinus* B-12068 // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2018. – Vol. 102, I. 17. – P. 7417–7428.

152 Wahid F., Hu X.H., Chu L.Q., Jia S.R., Xie Y.Y., Zhong C. Development of bacterial cellulose/chitosan based semi-interpenetrating hydrogels with improved mechanical and antibacterial properties // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2019. – Vol. 122. – P. 380–387.

153 Wan Y., Li J., Yang Z. Simultaneously depositing polyaniline onto bacterial cellulose nanofibers and graphenenanosheets toward electrically conductive nanocomposites // *Curr. Appl. Phys.* – 2018. – Vol. 18. – P. 933–940.

154 Wang J., Tavakoli J., Tang Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review // *Carbohydrate Polymers.* – 2019. – Vol. 219. – P. 63–76.

155 Williamson D.A., Carter G.P., Howden B.P. Current and emerging topical antibacterials and antiseptics: agents, action, and resistance patterns // *Clin Microbiol Rev.* – 2017. – Vol. 30, I. 3. – P. 827–860.

156 Wu J.M., Liu R.H. Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* // *Carbohydrate polymers.* – 2012. – Vol. 90, I. 1. – P. 116–121.

157 Wu R.Q., Li Z.X., Yang J.P., Xing X.H., Shao D.Y., Xing, K.L. Mutagenesis induced by high hydrostatic pressure treatment: a useful method to

improve the bacterial cellulose yield of a *Gluconacetobacter xylinus* strain // Cellulose. – 2009. – Vol. 17. – P. 399–405.

158 Xie Y., Zheng Y., Fan J. Novel electronic-ionic hybrid conductive composites for multifunctional flexible bioelectrode based on in situ synthesis of poly(dopamine) on bacterial cellulose // Appl. Mater. Interfaces. – 2018. – Vol. 10. – P. 22692–22702.

159 Ye S., Jiang L., Su C., Zhu Z., Wen Y. Development of gelatin/bacterial cellulose composite sponges as potential natural wound dressings // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 133. – P. 148–155.

160 Younes I., Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications // Marine Drugs. – 2015. – Vol. 13, №. 3. – P. 1133–1174.

161 Yu S., Zhang X., Tan G., Tian L., Liu D. A novel pH-induced thermosensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan and poloxamer cross-linked by glutaraldehyde for ophthalmic drug delivery // Carbohydrate Polymers. – 2017. – Vol. 155. – P. 208–217.

162 Zhao S., Malfait W.J., Guerrero-Alburquerque N. Biopolymer aerogels and foams: chemistry, properties, and applications // Angewandte Chemie International Edition. – 2018. – Vol. 57. – P. 7580–7608.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица – Изучение влагосвязывающей способности композитов на основе БЦ и хитозана в форме аэрогелей, полученных методом *in situ*, при различном времени выдержки

Время выдержки, ч	Влагосвязывающая способность исследуемых образцов, %		
	Вода	0,9% NaCl	0,9% CaCl ₂
Композит, полученный на среде, содержащей 0,1% хитозана			
1	2782,2	1513,5	1643,6
3	2800	1519,2	1663,6
5	3311,1	1765,4	1754,5
24	2973,3	1596,2	1701,8
Композит, полученный на среде, содержащей 0,5% хитозана			
1	2162	1532,7	1802
3	2198	1650	1834
5	2460	1694,2	2092
24	2322	1592,3	1800

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица – Изучение влагосвязывающей способности композитов, полученных на основе БЦ, выращенной в динамических условиях, и хитозана в форме аэрогелей, полученных методом *ex situ*, при различном времени выдержки

Время выдержки, ч	Влагосвязывающая способность исследуемых образцов, %		
	Вода	0,9% NaCl	0,9% CaCl ₂
Композит на основе БЦ и 2% раствора хитозана в соотношении 50:50			
1	2	3	4
1	3800	3993,3	3469,8
3	3834	4055,6	3535,8
5	3910	4353,3	3796,2
24	3900	4135,6	3677,4
Композит на основе БЦ и 4% раствора хитозана в соотношении 50:50			
1	1896,4	1794,1	2132,1
3	1912,7	1882,4	2144,6
5	1929,1	2007,3	2151,8
24	1918,2	1833,3	2083,9

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица – Изучение влагосвязывающей способности композитов на основе БЦ, выращенной в статических условиях, и хитозана в форме аэрогелей, полученных методом *ex situ*, при различном времени выдержки

Время выдержки, ч	Влагосвязывающая способность исследуемых образцов, %		
	Вода	0,9% NaCl	0,9% CaCl ₂
Композит на основе БЦ и 2%-го раствора хитозана в соотношении 50:50			
1	3151,8	2807,5	2483,3
3	3238,9	2900	2579,2
5	3337	3018,9	2666,7
24	3012,9	2852,9	2558,3
Композит на основе БЦ и 3%-го раствора хитозана в соотношении 50:50			
1	2428,3	2835,3	3010
3	2447,2	2556,9	3120
5	2558,5	3403,9	3512
24	2466	2919,6	1550
Композит на основе БЦ и 4%-го раствора хитозана в соотношении 50:50			
1	2501,9	2468	2494,6
3	2609,6	2650	2653,6
5	2867,3	2862	2839,3
24	2534,6	2540	1721,4
Композит на основе БЦ и 5%-го раствора хитозана в соотношении 50:50			
1	2192,7	2217,7	2180,4
3	2270,9	2318,2	2311,8
5	2443,6	2459,2	2476,5
24	2154,5	2154,5	1998
Композит на основе БЦ и 4%-го раствора хитозана в соотношении 80:20			
1	2973,8	2586,8	2640
3	3147,6	2796,2	2720
5	3250	2901,9	3038
24	2897,6	2477,4	3024
Композит на основе БЦ и 5%-го раствора хитозана в соотношении 80:20			
1	1869,4	2096,3	2133,3
3	2246,9	2616,7	2590,7
5	2567,3	2838,9	2496,3
24	2302	2698,2	2662,9