

**ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ
ИНДИВИДУАЛЬНЫМИ ШТАММАМИ KOMAGATAEIBACTER XYLINUS
НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ИЗ ЛЕГКОВОЗОБНОВЛЯЕМОГО
ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ**

Г.Ф. Миронова, Е.А. Скиба

Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН, Бийск, Россия

Идея получения высокоценной бактериальной наноцеллюлозы (БНЦ) из низкостоймостного легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья параллельно развивается в разных странах и достигнуты хорошие результаты. Такой подход нацелен на снижение затрат, так как известно, что около 65 % от себестоимости БНЦ приходится на питательную среду. Ключевыми моментами этого подхода являются: (1) выбор подходящего сырья, (2) технология трансформации сырья в раствор сахаров, (3) оптимизация условий биосинтеза и (4) выбор либо генетическое конструирование штамма [1, 2].

Ранее нами были выбраны в качестве сырьевых источников мискантус и плодовые оболочки овса (ПОО) и разработаны фундаментальные основы технологии трансформации сырья в глюкозные гидролизаты. Было показано, что для последующего получения БНЦ самой эффективной технологией является двухстадийная обработка сырья разбавленными растворами сначала азотной кислоты, а затем гидроксида натрия [3, 4]. Затем полученные субстраты подвергаются ферментативному гидролизу, и полученные среды стандартизируются по концентрации редуцирующих веществ (РВ) – 20 г./л. Подробно методика изложена в работе [4]. Биосинтез БНЦ проводился с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12.

В данной работе впервые биосинтез БНЦ был осуществлен с помощью индивидуальных штаммов *Komagataeibacter xylinus* коллекции ВКПМ. Были протестированы штаммы *Komagataeibacter xylinus* B-11240, *Komagataeibacter xylinus sucrofermentans* B-12428, *Komagataeibacter xylinus* B-12429, *Komagataeibacter xylinus* B-12431.

На первом этапе проводилась реактивация штаммов. Для этого использовалась среда Хестрина-Шремма [5]: глюкоза – 2 %, пептон – 0,5 %, дрожжевой экстракт – 0,5 %, Na_2HPO_4 – 0,27 %, лимонная кислота – 0,115 %, pH 6,0; для установления активной кислотности использовались HCl и NaOH. Для штаммов *Komagataeibacter xylinus* B-11240 и *Komagataeibacter xylinus sucrofermentans* B-12428 образование гель-пленки и помутнение среды не наблюдалось. При нескольких пересевах также образование гель-пленки и помутнение среды не наблюдалось. Можно сделать заключение, что штаммы были доставлены нежизнеспособными.

На втором этапе изучались трофические предпочтения штаммов B-12429 и B-12431. Для этого биосинтез БНЦ осуществлялся на трёх средах: среде Хестрина-Шремма, среде с мелом для уксуснокислых бактерий (глюкоза – 100,0 г/л; дрожжевой экстракт – 10,0 г/л; CaCO_3 – 20,0 г/л; pH 6,8) и глюкозной полусинтетической среде (глюкоза – 20 г./л; сухой чёрный чай – 10 г./л, после приготовления среда фильтровалась). Результаты показали, что среда с экстрактивными веществами чёрного чая оказалась непригодной для биосинтеза БНЦ штаммами B-12429 и B-12431, так как БНЦ на ней не синтезировалась. На среде Хестрина-Шремма выход БНЦ выше, чем на среде с мелом в 7,1 раза для штамма B-12429 и в 9,5 раза – для штамма B-12431. Можно сделать вывод, что предпочтительной оказалась среда Хестрина-Шремма. Именно она была использована в качестве контрольной среды в дальнейших экспериментах.

На третьем этапе изучался биосинтез БНЦ с помощью штаммов B-12429 и B-12431 на питательных средах из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья. Использовались три питательных среды: опытные среды, полученные из мискантуса и из ПОО согласно [4] и контрольная синтетическая среда Хестрина-Шремма. Оказалось, что на нативных гидролизных средах и на гидролизных средах с внесением экстрактивных веществ чёрного чая индивидуальные штаммы не способны продуцировать БНЦ. Поэтому было принято решение внести в гидролизные среды питательные вещества аналогично составу среды Хестрина-Шремма (кроме глюкозы). Кроме того, при биосинтезе БНЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12, питательные среды подвергались пастеризации при 100 °С без выдержки, что при использовании индивидуальных штаммов *Komagataeibacter xylinus* оказалось неприемлемым, и наблюдалась контаминация посторонней микрофлорой.

Поэтому проводилось автоклавирование питательных сред при 0,5 атм 30 минут. После проверки стерильности в среды вносилось по 10 % инокулята, предварительно адаптированного на исследуемой среде, биосинтез проводился статически в течение 14 суток при температуре 28 °С. Емкости сверху накрывались стерильной бумагой. Работа выполнялась при использовании приборной базы Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (ИПХЭТ СО РАН, г. Бийск).

Кривые изменения РВ в процессе биосинтеза БНЦ представлены на рис. 1. Основная убыль РВ наблюдается в первые 7 суток биосинтеза, далее кривые выходят на плато. Для штамма В-12429 остаточная концентрация веществ составляет 7 г/л, для штамма В-12431 – 4–5 г/л.

Кривые изменения рН приведены на рис. 2. Особенностью штамма В-12429 является наблюдаемый минимум рН 3,5 на 4-е сутки биосинтеза, после чего рН постепенно повышается до 3,9–4,3. Для штамма В-12431 рН снижается до 3,6–3,9 на 3–5 сутки биосинтеза и остаётся на этом уровне до конца эксперимента.

Кривые изменения численности уксуснокислых бактерий приведены на рис. 3. Из графиков видно, что при культивировании не наблюдается длительной лаг-фазы, вероятно это связано с предварительной адаптацией продуцентов на используемой среде. Со 2-х по 14-е сутки наблюдается стационарная фаза. Количество бактерий при культивировании на гидролизатах на 7-е сутки выше в 3–4 раза, чем при культивировании на синтетической среде. Для штамма В-12431 на всех питательных средах численность бактерий несколько выше, чем для штамма В-12429. Известно, что численность уксуснокислых бактерий служит маркером синтеза БНЦ: чем выше концентрация бактерий, тем выше выход БНЦ [6, 7]. Поэтому самый высокий выход БНЦ можно ожидать для штамма В-12431 на среде ферментативного гидролизата ПОО.

На рис. 4 представлены кривые изменения выхода БНЦ в зависимости от вида питательной среды и используемого штамма. Наибольший выход БНЦ был получен на среде ферментативного гидролизата ПОО: 3,5 % для штамма В-12429, 4,1 % – для В-12429. Интересно, что в опыте со штаммом В-12429 выход БНЦ на среде из мискантуса был близок к выходу на среде из ПОО, а в опыте со штаммом В-12431 наблюдается большой разрыв между кривыми выхода. По-разному прошёл биосинтез БНЦ и на средах Хестрина-Шремма: если в опыте со штаммом В-12429 выход продолжал увеличиваться спустя 14 суток, то в опыте со штаммом В-12431 – начал снижаться уже спустя 7 суток.

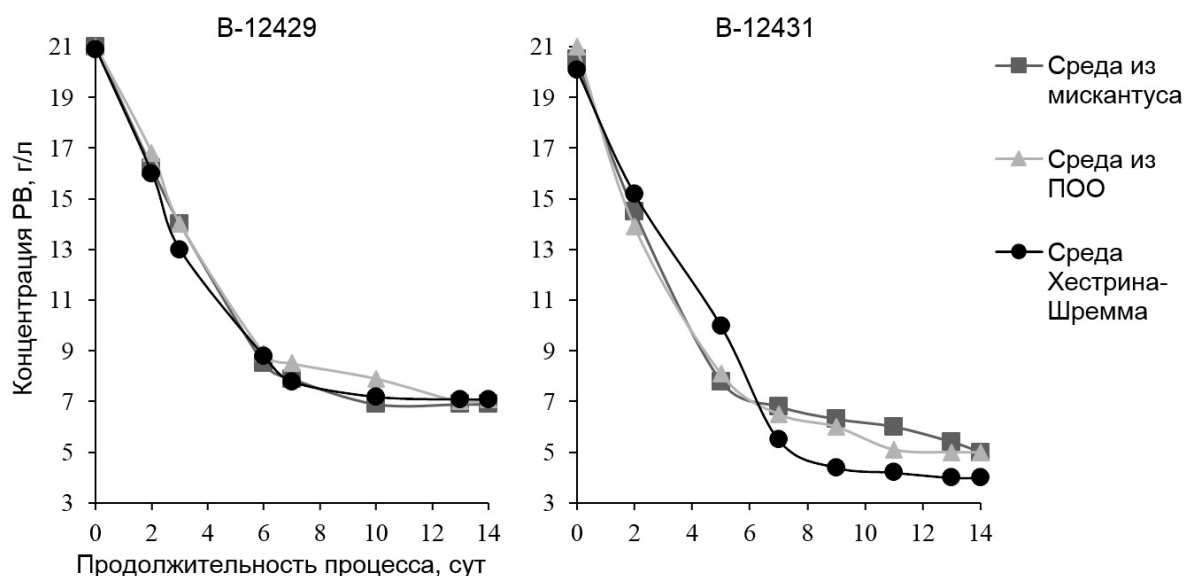


Рисунок 1 – Изменение концентрации РВ в процессе биосинтеза БНЦ штаммами *Komagataeibacter xylinus* В-12429 и В-12431

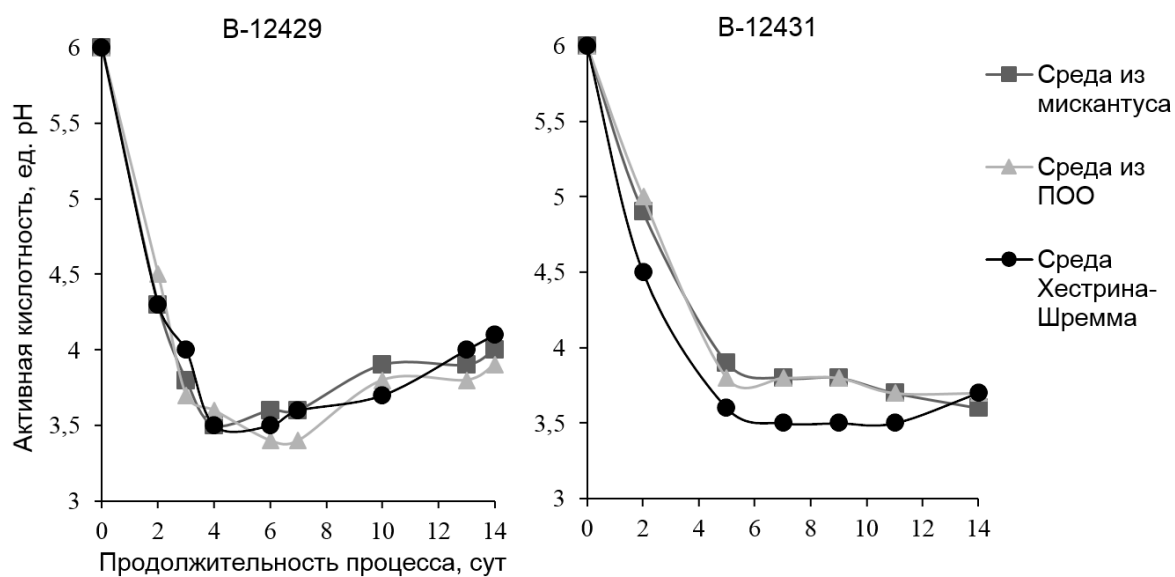


Рисунок 2 – Изменение активной кислотности в процессе биосинтеза БНЦ штаммами *Komagataeibacter xylinus* B-12429 и B-12431

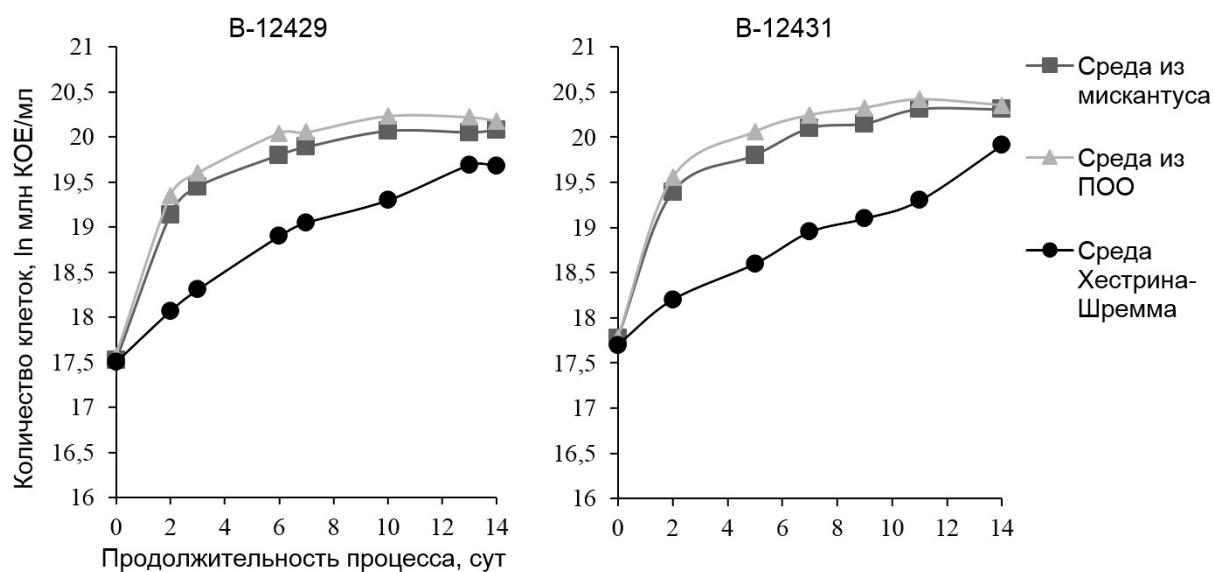


Рисунок 3 – Изменение количества клеток *Komagataeibacter xylinus* B-12429 и B-12431 в процессе биосинтеза БНЦ

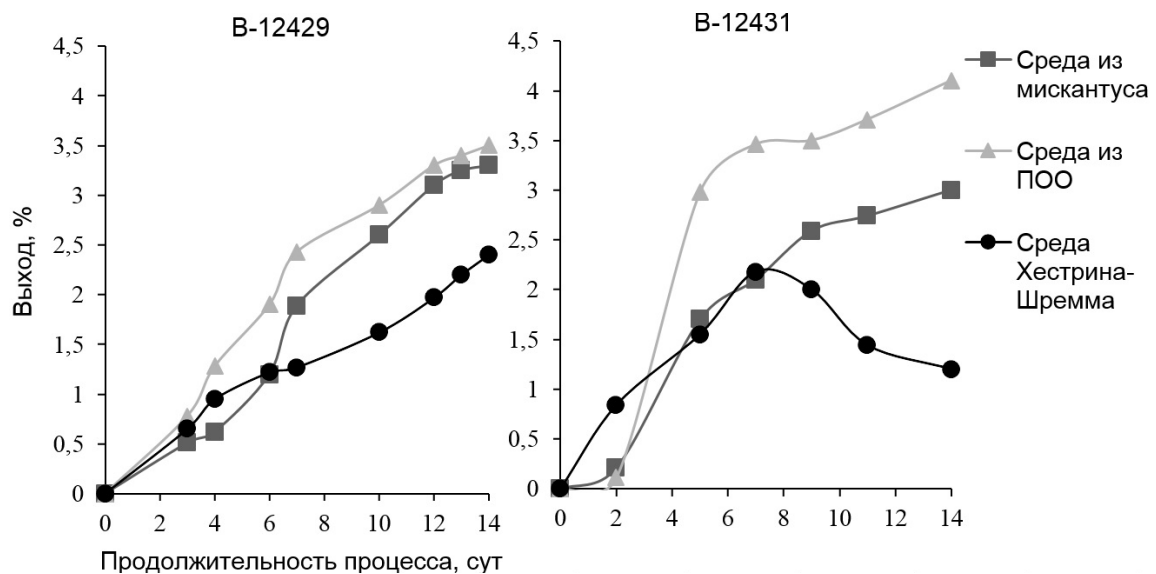


Рисунок 4 – Изменение выхода БНЦ в процессе биосинтеза штаммами *Komagataeibacter xylinus* B-12429 и B-12431

Показано, что на средах ферментативных гидролизатов синтезируется БНЦ с большим выходом, чем на средах Хестрина-Шремма. Повышение выхода БНЦ на средах из легковозобновляемого целлюлозосодержащего сырья по сравнению с синтетическими средами неоднократно описано в литературе [1, 2]. Это может быть связано с присутствием в гидролизатах растворимых целлоолигосахаридов, которые могут утилизироваться штаммами, имеющими эндо – 1,4-β-глюканазу [8].

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054)

Литература

1. Velásquez-Riaño M., Bojacá V. Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates // *Cellulose*. 2017. Vol. 24(7). P. 2677–2698. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1309-7>.
2. Urbina L., Corcuera M.Á. et al. A review of bacterial cellulose: sustainable production from agricultural waste and applications in various fields // *Cellulose*. 2021. P. 1–25. <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04020-4>.
3. Skiba E.A., Budaeva V.V. et al. A technology for pilot production of bacterial cellulose from oat hulls // *Chem Eng J*. 2021. № 383. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123128>.
4. Skiba E.A., Gladysheva E.K. et al. Self-standardization of quality of bacterial cellulose produced by *Medusomyces gisevii* in nutrient media derived from *Miscanthus* biomass // *Carbohydr Polym*. 2021. № 252. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117178>.
5. Hestrin S., Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose // *Biochem J*. 1954. Vol. 58 (2). P. 345–352.
6. Stepanov N., Efremenko E. «Deceived» concentrated immobilized cells as biocatalyst for intensive bacterial cellulose production from various sources // *Catalysts*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 33. <https://doi.org/10.3390/catal8010033>.
7. Römling U., Galperin M.Y. Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions // *Trends in Microbiology*. 2015. Vol. 23. P. 545–557. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005>.
8. Hong F., Guo X. et al. Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: Enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment // *Bioresour Technol*. 2012. Vol. 104, P. 503–508. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.028>.