

УДК 573.6.086.83:577.114.4

**БИОТЕХНОЛОГИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ЕЕ КОМПОЗИТОВ:  
ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ  
И БИОМЕДИЦИНЕ****Т.И. Громовых<sup>1</sup>, М.А. Алехина<sup>1</sup>, И.И. Гайдашева<sup>1</sup>, П.С. Громовых<sup>1</sup>, В.С. Садыкова<sup>2</sup>***ФГАОУ ВО Московский политехнический университет, Москва, Россия  
ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва, Россия*

Целлюлоза бактериального происхождения выгодно отличается от других полимеров рядом свойств. Она способна удерживать влагу в соотношении 309 г. воды на грамм сухого веса, выдерживает температуры до 150 °С, а подвергнутая химической обработке – до 275 °С, что позволяет высушивать ее без повреждения структуры. Несмотря на такие механические характеристики, бактериальная целлюлоза в то же время обладает хорошей упругостью, эластичностью, пластичностью. Для метаболизма человека она инертна, а чистота и отсутствие примесей в виде лигнина, пектина и гемицеллюлоз делают ее нетоксичной и потому подходящей для медицинских целей [1]. Физико-химические и механические свойства целлюлозы и ее поведение в различных средах определяются ее структурой, прежде всего степенью кристалличности, кристаллической модификацией и распределением кристаллитов по размеру. Для БЦ характерны малые размеры кристаллитов и высокая степень кристалличности [2]. Волокнистая структура бактериальной целлюлозы обладает высокой пористостью, что, наряду с сетчатым строением, определяет ее чрезвычайно большую водоудерживающую способность. В нативном состоянии бактериальная целлюлоза представляет собой гидрогель – содержание целлюлозы в исходных пленках не превышает 1 %. Пленки способны удерживать воду в течение длительного времени. Водоудерживающая способность бактериальной целлюлозы гораздо выше, чем у целлофана и фильтровальной бумаги (содержание воды в этих материалах не превышает 70 %) [3].

В настоящее время известно много представителей грамотрицательных бактерий, способных синтезировать целлюлозу, принадлежащих к родам: *Gluconacetobacter* (панее *Acetobacter*), *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* [27]. Целлюлоза также синтезируется штаммами грамположительных бактерий вида *Sarcina ventriculii*, сконструированных с помощью методов геной инженерии и штаммами видов *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Наиболее эффективными продуцентами для биосинтеза бактериальной целлюлозы являются продуценты видов: *Gluconacetobacter xylinum*, *Gluconacetobacter hansenii* и *Gluconacetobacter pasteurianus* [4].

Растущий интерес к данному полимеру приводит к необходимости синтезировать его в больших количествах и, как следствие, искать более продуктивные штаммы и разрабатывать способы удешевления и оптимизации питательных сред [2]. Существуют различные способы культивирования бактериальной целлюлозы вышеописанными продуцентами: в стационарных условиях и в условиях перемешивания на шейкер-инкубаторах или в биореакторах. Метод стационарного культивирования является относительно простым, поэтому наиболее часто используется при лабораторных исследованиях. А способ культивирования в условиях перемешивания чаще применяются при биосинтезе бактериальной целлюлозы в промышленных масштабах [4]. Следует отметить, что способ культивирования бактериальной целлюлозы влияет на форму продуцируемого полимера. Как было указано выше, в стационарных условиях образуются пленки бактериальной целлюлозы, а в условиях перемешивания бактериальная целлюлоза синтезируется в форме неправильных или сферических агрегатов [5]. Биополимер бактериальная целлюлоза уже широко используется в мире в различных направлениях: пищевой промышленности, медицине, энергетике, экологии, текстиле, бумажной промышленности.

Не смотря на то, что в России активно проводятся исследования по выделению продуцентов и разработке биотехнологии бактериальной целлюлозы, до сих пор нет промышленного производства этого полимера. Одной из причин такого положения является отсутствие разработок по использованию дешевых субстратов для промышленного производства. В связи с этим, целью настоящей работы было оценить возможность получения бактериальной целлюлозы на более дешевых субстратах. В качестве альтернативы представляло интерес оценить возможность использования продукта производства кормовой патоки «БиоАксель» как источника углерода и азота для биосинтеза бактериальной целлюлозы продуцентом *Gluconacetobacter hansenii*.

Выделенный нами в 2008 году и депонированный в качестве первого продуцента бактериальной целлюлозы в России штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547), был рекомендован как промышленный продуцент бактериальной целлюлозы. Штамм *Gluconacetobacter hansenii* – облигатный аэроб, имеет клетки цилиндрические, подвижные размерами 0,6–1,2×1–3 мкм, расположенные поодиночке, в парах, в коротких цепочках или в небольших кластерах. Как правило, при культивировании в стационарных условиях образует пленки, на которых клетки иммобилизуются в больших количествах.

Исследуемый штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 растет на питательных средах, содержащих различные моно- и дисахариды в качестве источников углерода, более продуктивно синтезирует экзополимер бактериальную целлюлозу на среде, содержащей сахарозу, чем на среде, содержащей глюкозу. Однако штамм *G. hansenii* GH-1/2008 не растет на среде с добавлением больших концентраций этанола и в присутствии 4–8 % уксусной кислоты. Этанол является стимулятором синтеза целлюлозы при концентрации 0,3–1,5 %, но при более высоких концентрациях ингибирует процесс биосинтеза целлюлозы [6].

В 2013 году были проведены первые испытания использования полимера бактериальной целлюлозы, синтезируемой штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 на среде с сахарозой, в качестве пищевой добавки при изготовлении пищевого продукта вареной колбасы [7].

Известно, что моно- и дисахариды и пептон являются наиболее дорогостоящими компонентами питательных сред для культивирования продуцентов бактериальной целлюлозы, в связи с чем российской компанией «Партнер-М» было предложено использование кормовой патоки «БиоАксель» как основного компонента питательной среды для продуцента *G. hansenii* GH-1/2008. Продукт «БиоАксель» получают путем глубокой переработки сои, и он может служить в качестве альтернативного источника углеродного и азотного питания для культивирования различных продуцентов, в том числе и продуцентов бактериальной целлюлозы. Характеристика «БиоАкселя» представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика и состав кормовой патоки «БиоАксель» [8]

Показатель	«БиоАксель»
Внешний вид	Вязкая паста при содержании сухих веществ 50–55 %, коричневого цвета
Запах	Присутствие растительной ноты
Вкус	Сладковатой мелассы
Белок, % асв	12–15
Сахара, % асв, включая:	42–47
глюкоза	2–3
фруктоза	2–3
галактоза	2–3
сахароза	21–23
раффиноза	3–4
стахиоза	10–12
Полисахариды, % асв	12–15
Минеральные вещества, % асв	4–16

компонентами среды являлись «БиоАксель», глюкоза, дрожжевой экстракт, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, моногидрат лимонной кислоты и этиловый спирт. Варьируемым параметром была концентрация «БиоАкселя» в питательной среде, и в зависимости от ее величины, изменяли концентрации глюкозы и дрожжевого экстракта, так как «БиоАксель» содержит в своем составе 42–47 г./л сахаров и 12–15 г./л протеина. Концентрацию «БиоАкселя» в среде изучали на пяти уровнях с шагом 40 г./л. Эксперимент проводили в трех повторностях. План эксперимента представлен в таблице 2. Для удобства обозначения питательные среды с различными концентрациями (от нулевой контрольной не содержащей «БиоАкселя», до максимальной, без глюкозы) названы цифрами от I до V.

## Методы исследований

Культивирование штамма *G. hansenii* GH 1/2008 проводили на модифицированных средах, содержащих в качестве источников углерода глюкозу и «БиоАксель». Для изучения возможности замены глюкозы на «БиоАксель» в питательной среде для культивирования штамма-продуцента бактериальной целлюлозы был спланирован однофакторный эксперимент по методу Гаусса–Зайделя. В результате эксперимента оценивали продуктивность бактериальной целлюлозы штаммом *G. hansenii* GH 1/2008 на единицу объема питательной среды, содержащей «БиоАксель» и глюкозу (г/л). Исходными

Таблица 2 – План эксперимента для подбора состава питательных сред с «БиоАкселем» для биосинтеза бактериальной целлюлозы штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008

Компонент среды	Питательная среда				
	I	II	III	IV	V
«БиоАксель»	0	40 г./л	80 г./л	120 г./л	160 г./л
Глюкоза	20 г./л	15 г./л	10 г./л	5 г./л	0
Дрожжевой экстракт	8 г./л	6 г./л	4 г./л	2 г./л	0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,7 г./л	2,7 г./л	2,7 г./л	2,7 г./л	2,7 г./л
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 г./л	2 г./л	2 г./л	2 г./л	2 г./л
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 г./л	3 г./л	3 г./л	3 г./л	3 г./л
Моногидрат лимонной кислоты	1,15 г./л	1,15 г./л	1,15 г./л	1,15 г./л	1,15 г./л
Спирт этиловый	5 мл	5 мл	5 мл	10 мл	10 мл
Вода дистиллированная	1000 мл	1000 мл	1000 мл	1000 мл	1000 мл

Культивирование штамма *G. hansenii* GH 1/2008 на питательных средах с различными концентрациями «БиоАкселя» и глюкозы проводили стационарно при температуре 20 °С в течение 10 суток. Синтезированные пленки отделяли от питательной среды и отмывали в растворе буфера RIPA следующего состава: 25 мМ Трис-НCl, pH 7–8, 150 мМ NaCl, 0,5 % дезоксихолат натрия, 1 % Тритон X-100, 0,1 % SDS в течение суток. Затем пленки промывали дистиллированной водой в течение 5–7 суток, меняя воду каждые 24 ч.

Высушивание пленок бактериальной целлюлозы производили двумя способами: на воздухе до абсолютного сухого веса с контролем остаточной влажности с использованием влагомера (AND, Япония); на лиофильной установке (КС30, Чехословакия).

После высушивания и измерения веса сухих пленок проводили оценку их влагоудерживающей способности. Выход бактериальной целлюлозы выражали в виде абсолютно сухой массы (а.с.м.) на единицу объема культуральной среды. Продуктивность штамма на средах рассчитывали по формуле (1).

$$P = m/V \times 1000, \quad (1)$$

где  $m$  – средняя масса полученных абсолютно сухих пленок, г;  $V$  – объем среды в одной повторности, мл.

Получение нанокompозита на основе бактериальной целлюлозы и антимикробного пептида и оценка х антибиотической активности

Бактериальная целлюлоза – полимер, не обладающий антимикробной активностью, поэтому при рекомендации использования пленок необходимо насыщение её антимикробными препаратами. Одним из наиболее эффективных и широко используемых пептидных антибиотиков местного применения является Грамицидин С. Композиты бактериальной целлюлозы и антибиотиков пептидной природы были получены методом импрегнации. Из пленок бактериальной целлюлозы, высушенных на воздухе, вырезали диски диаметром 6 мм, на одни диски наносили по 100 мкл раствора Грамицидина С с концентрацией 100 мкг/мл. В качестве контрольного образца использовали диски бактериальной целлюлозы без нанесения антибиотика. Оценка антимикробных свойств композитов проводили методом дисков на тест-культурах штаммов патогенных мицелиальных и дрожжевых микроскопических грибов *Aspergillus niger* INA 00760, *Candida albicans* ATCC 2091, тест-культурах грамположительных штаммов бактерий – *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* NCTC 8340 и штаммов грамотрицательных бактерий – *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### Результаты и обсуждение

Исследования показали, что продуцент *G. hansenii* GH 1/2008 одинаково хорошо растет на средах с различными концентрациями «БиоАкселя» и образует пленки, которые хорошо отбеливаются при вымывании детергентами. Оценка продуктивности бактериальной целлюлозы штаммом *G. hansenii* GH 1/2008 на средах с различными концентрациями «БиоАкселя» показала, что выход бактериальной целлюлозы на питательной среде, содержащей в качестве источника углерода «БиоАксель» в различных концентрациях, достоверно не отличается в сравнении с выходом полимера на среде с глюкозой (таблица 3).

Таблица 3 – Масса синтезируемой бактериальной целлюлозы на 10 сутки культивирования штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на средах с различными концентрациями «БиоАкселя», г/л

Выход бактериальной целлюлозы (а. с. в., г/л) на средах с различными концентрациями «БиоАкселя»				
(0:20)	(5:15)	(10:10)	(15:5)	(20:0)
3,09±0,04	3,02±0,05	3,09±0,021	3,09±0,13	3,08±0,04

При оценке наноструктуры пленок бактериальной целлюлозы было показано, что плотность фибрилл бактериальной целлюлозы в пленках, синтезированных на питательных средах с высокими концентрациями «БиоАкселя», достоверно не отличается на среде с глюкозой (Рисунок 1).

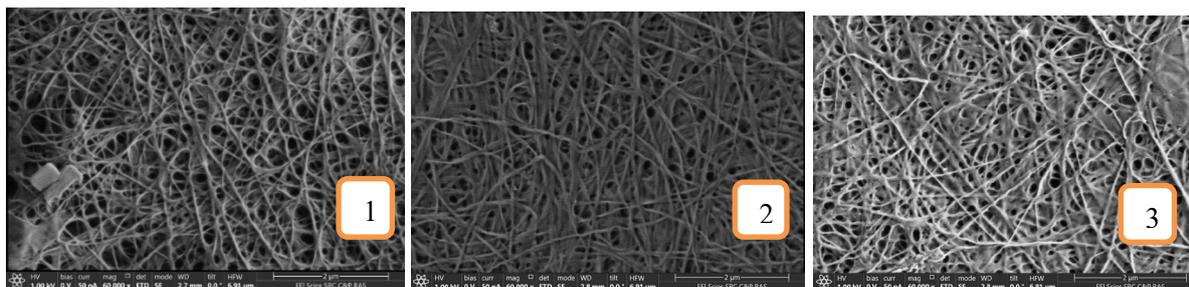


Рисунок 1. Наноструктура пленок бактериальной целлюлозы, синтезированных на среде с глюкозой и на средах с различной концентрацией «БиоАкселя» (сканерная микроскопия): 1 – 20 г./л глюкозы; 2 – 80 г./л «БиоАкселя»; 3 – 120 г./л «БиоАкселя»

Из синтезированных продуцентом пленок после измельчения в гомогенизаторе были получены гели, которые после высушивания можно использовать в качестве материала для получения порошка микрокристаллической целлюлозы.

По результатам исследований антибиотической активности полученных композитов установлено, что бактериальная целлюлоза без внесения грамицидина С не обладает антимикробной активностью, а с внесением Грамицидина С проявляет биоцидное действие против *B. subtilis*, *C. albicans*, *S. aureus*, *M. luteus* и *P. aeruginosa*. Таким образом, метод создания композитных материалов на основе бактериальной целлюлозы с Грамицидином С эффективный для придания новых функциональных возможностей материалам на основе бактериальной целлюлозы, который имеет большой потенциал в области биотехнологии и биомедицины. Результаты оценки антибиотической активности представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Оценка антибиотической активности композитов бактериальной целлюлозы и Грамицидина С

Вариант синтезированной плёнки на среде	Образец	Зона, мм						
		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC	<i>A. niger</i> INA 00760	<i>C. albicans</i> ATCC	<i>S. aureus</i> 209P	<i>M. luteus</i> NCTC	<i>P. aeruginosa</i> ATCC
0:20 Глюкоза	Целлюлоза+грамицидин С	11	0	0	8	11	10	11
	Контроль: целлюлоза	0	0	0	0	0	0	0
10:10 БиоАксель: Глюкоза	Целлюлоза+грамицидин С	8	0	0	8	17	0	0
	Контроль: Глюкоза	0	0	0	0	0	0	0
20:0 БиоАксель	Целлюлоза+грамицидин С	11	0	0	9	0	10	10
	Контроль: целлюлоза	0	0	0	0	0	0	0
-	Контроль: р-р Грамицидина С	-	-	-	-	25	16	15

Примечание: «-» исследования не проводили

Все проведенные исследования показали, что «БиоАксель» целесообразно рекомендовать как компонента питательной среды для биосинтеза бактериальной целлюлозы штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008.

### Литература

1. Andriani D., Apriyana A.Y. and Karina M. The optimization of bacterial cellulose production and its applications: a review // *Cellulose*. – 2020. – № 27. – P. 6747–6766. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03273-9>
2. Sulaeva, I. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. / I. Sulaeva, U. Henniges., T. Rosenau, et al. // *Biotechnology Advances*. – 2015. – № 33 (8). – P. 1547–1571.
3. Скворцова, З.Н. Физико-химическая механика бактериальной целлюлозы / З.Н. Скворцова, Т.И. Громовых, В.С. Грачев [и др.] – *Коллоидный журнал*. – 2019. – Т.81, № 4. – С. 441–452.
4. Lahiri D. Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent / D. Lahiri, M. Nag, B. Dutta et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – № 20 (21). – P. 1–18.
5. Gromovykh, T.I., Pigaleva, M.A., Gallyamov, M.O., Ivanenko, I.P., Ozerova, K.E., Kharitonova, E.P., Bahman, M., Feldman, N.B., Lutsenko, S.V., & Kiselyova, O.I. Structural organization of bacterial cellulose: The origin of anisotropy and layered structures // *Carbohydrate Polymers*. – 2020. – 237. – 116140. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116140>
6. Патент РФ 2464307С1. Штамм бактерии *Glucanacetobacter hansenii* GH-1/2008 – продуцент бактериальной целлюлозы / Громовых Т.И., Фан М.Х. – Оpubл. 20.10.2012.
7. Громовых Т.И. Перспективы применения бактериальной целлюлозы в мясопродуктах / Т.И. Громовых, Фан Ми Хань, Е.Г. Бирюков, Т.Н. Данильчук, Г.Г. Абдрашитова // *Мясная Индустрия*, 2013, № 4. – с. 32 -35.
8. Кормовая патока БиоАксель [Электронный ресурс]: Партнер-М URL: <https://partnermk.ru/product/bioaksel/> (дата обращения: 29.07.2023).