

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ *MISCANTHUS X GIGANTEUS* СОРТА КАМИС РОССИЙСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

А.А. Зенкова^{1,2}

¹ Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения РАН, г. Бийск, Россия

² Бийский технологический институт (филиал) Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, г. Бийск, Россия

Введение. Бактериальная наноцеллюлоза представляет собой линейный, неразветвленный экзополисахарид, его сверхтонкие нанофибриллы сплетаются и удерживаются вместе меж- и внутримолекулярными водородными связями. Глюкоза с ее отличительной структурой и связями служит основным строительным блоком бактериальной наноцеллюлозы. Гидроксигруппы наделяют бактериальную наноцеллюлозу химически реактивной поверхностью, обеспечивая такие процессы, как этерификация, и ацилирование. В бактериальной наноцеллюлозе отсутствуют такие примеси, как лигнин, гемицеллюлозы и пектин, которые обычно встречаются в целлюлозе из растительных источников и требуют энергоемких стадий очистки [1].

Бактериальная целлюлоза обладает превосходными физико-химическими и механическими свойствами. Благодаря величине нановолокна с шириной менее 100 нм она обладает целым рядом уникальных свойств: высокой степенью полимеризации, высокой кристалличностью, биосовместимостью, эластичностью, высокой прочностью на разрыв, долговечностью, возобновляемостью, высокой степенью биоразлагаемости, она нетоксична и неаллергенна, легко изолируется и очищается благодаря тому, что синтезируется без гемицеллюлоз, пектинов и лигнина [2].

Бактериальная наноцеллюлоза имеет множество применений, например, в виде упаковки в пищевой промышленности, в производстве оптически прозрачной бумаги, подходящей для подложек, используемых в производстве электронных устройств, таких как солнечные батареи и гибкие дисплеи [3]. Применяется для производства мембран, которые используют для очистки сточных вод [4], используется в биомедицине для каркаса кровеносных сосудов [5].

Биосинтез бактериальной наноцеллюлозы очень трудоемкий и дорогостоящий процесс. На данный момент уже известно множество альтернативных питательных сред, которые способны заменить синтетические среды на основе глюкозы. Для получения бактериальной наноцеллюлозы в качестве источника углерода и азота описано использование гидролизатов растений, промышленных гидролизатов древесины, торфа, щелоков целлюлозно-бумажного производства, нестандартного сырья плодово-ягодных производств [6]. Лигноцеллюлозная биомасса является наиболее распространенным и возобновляемым ресурсом на земле, обеспечивая богатый незерновой субстрат для производства биопродуктов [7].

Главной задачей данной работы является получение наноразмерной бактериальной целлюлозы из растительной целлюлозы, выделенной из мискантуса гигантского сорта КАМИС. Данная культура выбрана в связи с тем, что в глобальных масштабах это массовая техническая культура с повышенным содержанием целлюлозы, промышленно применяется к примеру, при производстве бумаги недревесного происхождения [8].

Препятствием в использовании лигноцеллюлозного материала для биотехнологических целей является его устойчивая структура, требующая процесса предварительной обработки для деконструкции. Этап предварительной обработки направлен на повышение доступности целлюлозы и гемицеллюлозы путем разрушения водородных связей в структуре лигноцеллюлозы для эффективного гидролиза, который высвобождает сахара, необходимые для микробного использования [9].

Материалы и методы. В качестве сырья использовали мискантус гигантский сорт КАМИС, предоставленный ООО «Мастер Брэнд», г. Москва, Россия. Мискантус был предварительно обработан на опытном производстве в стандартном емкостном оборудовании объемом 250 л при атмосферном давлении. Для получения технической целлюлозы азотнокислым способом мискантус подвергали двухстадийной обработке по методике [10]. Первая стадия – обработка мискантуса 4 %-ным раствором азотной кислоты при температуре 90 – 96 °С и атмосферном давлении в течение 1–6 ч. Данная

обработка позволила получить продукт азотнокислой обработки. Полученный продукт отжимали на вакуум-филт্রে и промывали до нейтральной реакции. Вторая стадия – обработка продукта азотнокислой обработки мискантуса 4 %-ным раствором гидроксида натрия при температуре 90–96 °С и атмосферном давлении в течение 1–6 ч. Полученный продукт – техническую целлюлозу, полученную азотнокислым способом (ЦАС) – отжимали на вакуум-филт্রে и промывали до нейтральной реакции.

Нативный мискантус и ЦАС мискантуса подвергали ферментативному гидролизу согласно методике, описанной в [11]. Гидролиз проводили в течение 72 ч при постоянном перемешивании, при использовании следующих ферментативных препаратов: «Целлолюкс-А» (грибного происхождения, ООО ПО «Сиббиофарм, Россия) и, «Ультрафло-Коре» (продуцент *Trichoderma reesei*, «Novozymes A/S», Дания).

После того, как был получен ферментативный гидролизат ЦАС мискантуса, из него была приготовлена питательная среда для биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы, биосинтез проводили по методике [12].

Результаты. Химический состав мискантуса и целлюлозы из него исследовали согласно [13], он приведен в таблице 1.

Таблица 1 – Химический состав мискантуса гигантского и целлюлозы из него

Субстрат	Массовая доля, %						
	α -целлюлозы	целлюлозы	пентозанов	лигнина	зола	ЖВФ	СП
Мискантус	–	54,00	22,80	21,00	1,70	0,48	–
ЦАС	88,20	–	1,80	1,08	0,27	–	1200

Примечание: ЦАС – техническая целлюлоза, полученная азотнокислым способом, ЖВФ – жировосковая фракция, СП – степень полимеризации.

В результате предварительной обработки азотнокислым способом в ЦАС содержание лигнина снизилось в 18 раз, содержание пентозанов снизилось в 11,8 раз, зольность снизилась в 6 раз, содержание целлюлозы увеличилось в 1,8 раза. Массовая доля целлюлозы невысока – 88,2 %, в то же время содержание нецеллюлозных примесей также низкое. В работе [10] из мискантуса сахароцветного азотнокислым способом в аналогичных условиях была получена техническая целлюлоза с массовой долей α -целлюлозы 91,0–94,0 % с выходом 25–26 %. В нашей работе выход технической целлюлозы мискантуса составил 22,5 %. Сниженное содержание целлюлозы и сниженный выход свидетельствует о «переваре» в условиях опытно-промышленного производства.

Результаты ферментативного гидролиза нативного мискантуса и технической целлюлозы мискантуса представлены на рисунке 1. Реакционная способность нативного мискантуса к ферментативному гидролизу оказалась крайне низкой, так как конечная концентрация редуцирующих веществ составила всего 0,6 г/л. Концентрация редуцирующих веществ технической целлюлозы мискантуса составила 20,0 г/л. Из полученных данных можно сделать вывод, что азотнокислая обработка мискантуса является очень эффективной, так как повышает конечную концентрацию редуцирующих веществ в 33 раза.

Из ферментативного гидролизата ЦАС мискантуса была приготовлена питательная среда для биосинтеза. В результате биосинтеза получен образец бактериальной наноцеллюлозы (начальная концентрация редуцирующих веществ 20,0 г/л), в качестве контроля получен образец бактериальной наноцеллюлозы на полусинтетической глюкозной питательной среде (начальная концентрация редуцирующих веществ 20,0 г/л). В инокуляте количество дрожжей составило $1,1 \times 10^6$ КОЕ/мл, уксуснокислых бактерий – $1,3 \times 10^6$ КОЕ/мл.

Начальная кислотность обеих питательных сред составила 5 ед. pH. После 10 суток биосинтеза на среде из мискантуса содержание дрожжей увеличилось до $2,7 \times 10^6$ КОЕ/мл, содержание уксуснокислых бактерий возросло до $3,0 \times 10^6$ КОЕ/мл, что подтверждает микробиологическую доброкачественность среды; кислотность среды составила 7,5 ед. pH, а концентрация редуцирующих веществ снизилась до 3 г/л. Выход бактериальной наноцеллюлозы составил 8,6 %, степень полимеризации целлюлозы – 1230 причем средняя ширина микрофибрилл составила 36 нм.

После биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы на контрольной полусинтетической глюкозной питательной среде в течение 10 суток содержание дрожжей $2,5 \times 10^6$ КОЕ/мл, уксуснокислых бактерий

$2,3 \times 10^6$ КОЕ/мл; кислотность среды составила 2,8 ед. рН, а концентрация редуцирующих веществ снизилась до 1,0 г/л. На контрольной среде выход бактериальной наноцеллюлозы выше, чем на гидролизной среде в 1,4 раза и составляет 11,8 %, степень полимеризации выше в 2,4 раза и составляет 3000. Но следует подчеркнуть, что ширина микрофибрилл на контрольной среде ниже, чем на гидролизной в 1,5 раза, и составляет 22 нм.

Морфология целлюлозы из мискантуса и бактериальной целлюлозы принципиально отличаются, растровая электронная микроскопия представлена на рисунке 2. Азотнокислый способ позволяет выделить из мискантуса микрофибриллы целлюлозы шириной 4,7–8,5 мкм, длиной 156,0–928,0 мкм, в основном микрофибриллы сохраняют параллельную укладку, характерную для микрофибрилл нативного мискантуса. Известно, что микрофибриллы являются основными элементами надмолекулярной структуры целлюлозы. Микрофибриллы собираются в более крупные агрегаты – фибриллы (макрофибриллы), в клеточной стенке фибриллы образуют тонкие слои – ламеллы, внутри которых фибриллы ориентируются в одном направлении. В разных слоях клеточной стенки ламеллы ориентированы в разных направлениях, благодаря чему клеточная стенка обладает высокой механической прочностью [14].

Фибриллы бактериальной наноцеллюлозы в 1000 раз меньше микрофибрилл растительных клеток, на рисунке 2 Б виден фрагмент трехмерной неупорядоченной структуры, характерной для этого наноматериала.

Таблица 2 – Сравнение свойств технической целлюлозы (ЦАС) мискантуса с бактериальной наноцеллюлозой.

Критерий сравнения	ЦАС мискантуса	Бактериальная наноцеллюлоза из ЦАС мискантуса
Степень полимеризации	1200	1230
Ширина микрофибрилл	4,7–8,5 мкм	36 нм
Длина микрофибрилл	156,0–928,0 мкм	мкм (невозможно измерить)
Массовая доля α -целлюлозы	88,20 %	$99,5 \pm 0,1$ % [15]

Данные таблицы 2 хорошо согласуются с литературными данными: бактериальная наноцеллюлоза наноразмерная и химически чистая, степень полимеризации образца бактериальной наноцеллюлозы полученный на среде на основе ферментативного гидролизата из технической целлюлозы совпадает со степенью полимеризации технической целлюлозы.

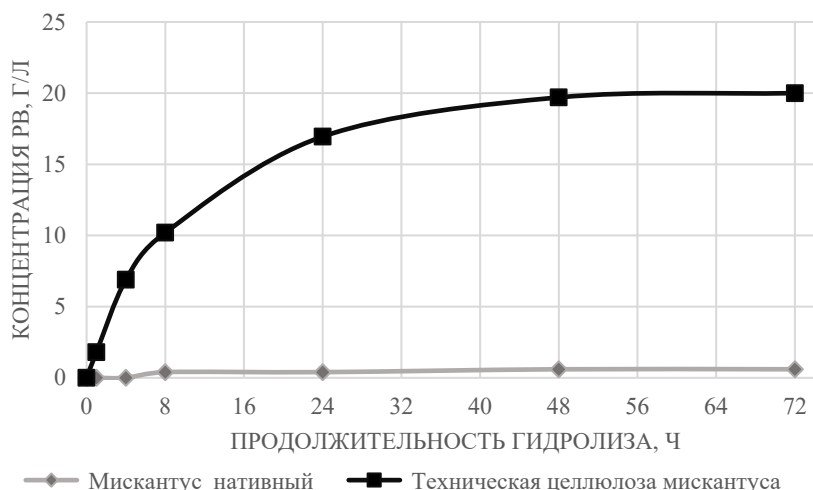
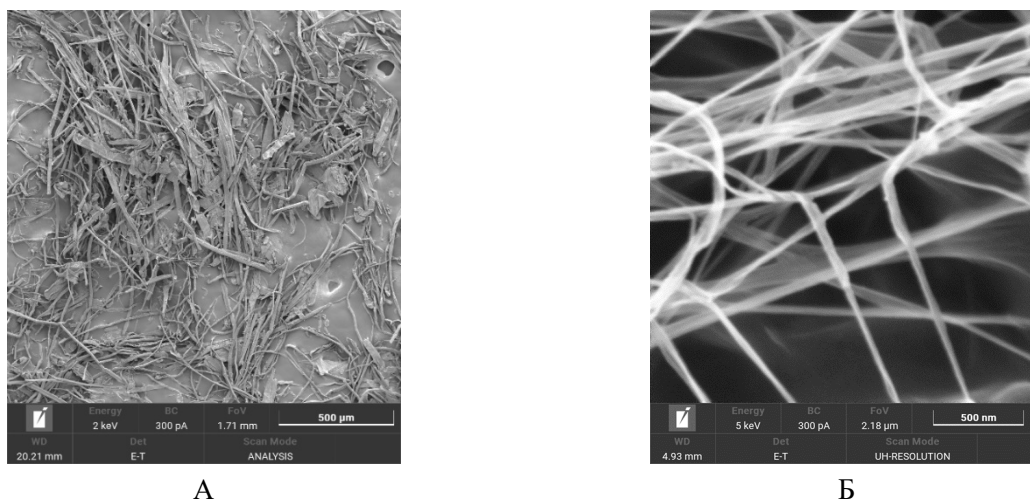


Рисунок 1 – Зависимость концентрации редуцирующих веществ от продолжительности ферментации



А

Б

Рисунок 2 – Растровая электронная микроскопия: А – технической целлюлозы мискантуса; Б – бактериальной наноцеллюлозы, полученной на питательной среде ферментативного гидролизата технической целлюлозы мискантуса

Выводы. В данной работе из мискантуса гигантского сорта КАМИС азотнокислым способом выделена техническая целлюлоза, которая в результате биотехнологического трансформации превращена в бактериальную целлюлозу с шириной микрофибрилл 36 нм.

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

Литература

1. Acharyya P.P., et al. Recent advances in synthesis and bioengineering of bacterial nanocellulose composite films for green, active and intelligent food packaging // Cellulose. – 2024. – С. 1–25. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10570-024-06023-3>.
2. El-Naggar N.E.A., et al. Bacterial nanocellulose production using Cantaloupe juice, statistical optimization and characterization //Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13. – №. 1. – С. 51. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26642-9>.
3. Amorim J.D.P. et al. Plant and bacterial nanocellulose: Production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review //Environmental Chemistry Letters. 2020. Vol. 18. С. 851–869.
4. Sahari N.S. et al. Bacterial nanocellulose and its application in heavy metals and dyes removal: a review //Environmental Science and Pollution Research. – 2023. – Vol. 30. – №. 51. – С. 110069–110078. DOI: [10.1007/s11356-023-30067-w](https://doi.org/10.1007/s11356-023-30067-w).
5. Харченко А.В., Ступак В.В. Бактериальная наноцеллюлоза как пластический материал для закрытия дефектов твердой мозговой оболочки: обзор литературы // Хирургия позвоночника. – 2019. – Т. 16. – №. 3. – С. 62–73.
6. Skiba E.A. et al. Biosynthesis of Bacterial Nanocellulose from Low-Cost Cellulosic Feedstocks: Effect of Microbial Producer //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 18. – С. 14401. <https://doi.org/10.3390/ijms241814401>.
7. Walling B. et al. Bacterial nanocellulose: A novel nanostructured bio-adsorbent for green remediation technology //Acta Ecologica Sinica. – 2023. – Т. 43. – №. 6. – С. 946–967. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2023.02.002>.
8. Shavyrkina N.A., et al. Review of Current Prospects for Using Miscanthus-Based Polymers // Polymers. 2023. Vol. 15. No. 14. 3097 p. <https://doi.org/10.3390/polym15143097>
9. Taokaew S. Bacterial Nanocellulose Produced by Cost-Effective and Sustainable Methods and Its Applications: A Review // Fermentation. – 2024. – Vol. 10. – №. 6. – С. 316. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation10060316>.
10. Гисматулина Ю.А. Разработка рациональных условий азотнокислого способа получения целлюлозы из мискантуса // Фундаментальные исследования. – 2017. – №. 10–2. – С. 189–193.
11. Зенкова А.А., и др.Обоснование выбора концентрации ацетатного буфера при ферментативном гидролизе шелухи овса для биосинтеза бактериальной наноцеллюлозы / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности. – 2022. – С 297–300. <https://doi.org/10.25699/tohbipp.2022.60.85.032>.
12. Сакович Г.В. и др. Мискантус – сырье для производства бактериальной наноцеллюлозы // Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах. – 2020. – Т. 495. – №. 1. – С. 42–45. <https://doi.org/10.31857/S2686953520060138>.
13. Ovchinnikova E.V. et al. Bioprocessing of oat hulls to ethylene: Impact of dilute HNO₃-or NaOH-pretreatment on process efficiency and sustainability //ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 2021. Vol. 9. №. 49. С. 16588–16596.
14. Козозубова Г.М., Зотова-Спановская Н.П. Диагностические признаки древесины и целлюлозных волокон: атлас // Петрозаводск: Карельский филиал АН СССР. – 1986. с. 148.
15. Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Cellulose Nitrates-Blended Composites from Bacterial and Plant-Based Celluloses // Polymers. – 2024. – Т. 16. – №. 9. – С. 1183 <https://doi.org/10.3390/polym16091183>.