

УДК 577.114

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ПРОДУЦИРУЕМОЙ КУЛЬТУРОЙ MEDUSOMYCES GISEVII

Гладышева Е.К.

ФГБ УН «Институт проблем химико-энергетических технологий» Сибирского отделения
Российской академии наук, Бийск, e-mail: evg-gladysheva@yandex.ru

Исследовано культивирование бактериальной целлюлозы на синтетической глюкозной среде с использованием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii*. Определены физико-химические свойства очищенного химическими методами образца: массовая доля кислотонерастворимого лигнина, зольность, степень полимеризации целлюлозы и влажность. Установлено, что степень полимеризации бактериальной целлюлозы близка к степени полимеризации хлопковой целлюлозы. Методом инфракрасной спектроскопии установлено, что данный образец бактериальной целлюлозы не содержит лигнина и соответствует основным полосам поглощения функциональных групп бактериальной целлюлозы, выращенной с помощью продуцента *Acetobacter*. Методом электронной микроскопии изучено распределение значений диаметра микрофибрилл в образце бактериальной целлюлозы, в результате установлена упорядоченная структура и рассчитан средний диаметр микрофибрилл 30,6 нм.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, симбиоз, степень полимеризации, инфракрасная спектроскопия, диаметр микрофибрилл

STUDY INTO PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF MEDUSOMYCES GISEVII BACTERIAL CELLULOSE

Gladysheva E.K.

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy
of Sciences, Biysk, e-mail: evg-gladysheva@yandex.ru

The cultivation of bacterial cellulose on a synthetic glucose medium using the symbiotic culture *Medusomyces gisevii* was studied. Physicochemical properties of the chemically purified specimen were determined, that is, acid-insoluble lignin content, ash content, cellulose degree of polymerization, and moisture. The bacterial cellulose degree of polymerization was found to be close to that of linter cellulose. Infrared spectroscopy revealed that the said sample of bacterial cellulose contains no lignin and corresponds to the main absorption bands of the functional groups of bacterial cellulose produced by *Acetobacter*. The microfibril diameter distribution in the bacterial cellulose specimen was studied by electron microscopy, the ordered structure being eventually elucidated and the average microfibril diameter estimated at 30.6 nm. Keywords: bacterial cellulose, degree of polymerization, symbiosis, infrared spectroscopy, microfibril diameter distribution

Keywords: bacterial cellulose, degree of polymerization, symbiosis, infrared spectroscopy, microfibril diameter distribution

Целлюлоза – это один из наиболее распространенных природных полисахаридов, который является составным компонентом большинства растительных материалов. Недостатком растительных целлюлоз (кроме хлопковой) является наличие значительных количеств примесей: лигнина, гемицеллюлоз, экстрактивных и минеральных веществ. В отличие от растительной целлюлозы бактериальная целлюлоза (БЦ) имеет ряд преимуществ: высокая чистота, более высокая механическая прочность, кристалличность и гидрофильность при наличии такой же структуры, как и у растительной целлюлозы [9]. В настоящее время ведутся исследования свойств и возможности применения БЦ [6, 10, 11].

Одним из перспективных продуцентов БЦ является *Medusomyces gisevii*. Этот уникальный симбиоз, образованный разными видами дрожжей и уксуснокислых

бактерий. Дрожжевые клетки преобразуют источники углерода и синтезируют этанол, стимулирующий уксуснокислые бактерии к синтезу БЦ, уксуснокислые бактерии синтезируют плавающую целлюлозную сетку, которая защищает клетки дрожжей от неблагоприятных условий окружающей среды. Симбиоз обладает огромным адаптивным потенциалом. Благодаря подвижному симбиотическим отношениям культура легко приспосабливается к изменению внешних условий, стрессам, способна утилизировать различные субстраты, устойчива к фагам [8]. С учетом вышеизложенного целесообразно использовать культуру *Medusomyces gisevii* для биосинтеза БЦ.

Целью данной работы являлось культивирование БЦ на синтетической глюкозной среде с помощью *Medusomyces gisevii* и исследование её физико-химических

свойств, в том числе исследования структуры методом инфракрасной спектроскопии и распределения значений диаметра микрофибрилл в образцах БЦ.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовалась синтетическая питательная среда, приготовленная растворением глюкозы в экстракте черного чая (12 г чая на 1 л воды). В качестве инокулята использовалась семидневная симбиотическая культура, выращенная на глюкозной среде, доза внесения составляла 10%. Начальная концентрация глюкозы составила 20 г/л, уровень активной кислотности саморегулировался симбиозом [5]. Выбор концентрации глюкозы и активной кислотности обоснован в статье [4]. Культивирование проводилось в статических условиях при $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 13 суток в реакторе объемом 16 л, коэффициент заполнения 50%.

Структура бактериальной целлюлозы была исследована на инфракрасном спектрофотометре «Инфралюм ФТ-801» в таблетках КВг.

Определение физико-химических характеристик БЦ (массовой доли кислотонерастворимого лигнина, массовой доли золы, массовой доли альфа-целлюлозы, степени полимеризации целлюлозы) проводили согласно стандартным методикам [7]. Влажность была установлена на определителе влажности МВ 23.

Исследование структуры микрофибрилл бактериальной целлюлозы проводили при помощи электронного растрового микроскопа Zeiss SIGMA VP (ЦКП НО «Арктика», САФУ, г. Архангельск).

Результаты исследования и их обсуждение

Гель-плёнка, образующаяся в результате культивирования инокулята, загрязнена остатками компонентов питательной среды, метаболитами и клетками микроорганизмов. Очистка плёнок может быть проведена разными способами: растворами кислот и щелочей, энзимной обработкой, при этом может изменяться диаметр и распределение микрофибрилл БЦ [2].

В данной работе образцы пленок были очищены следующим способом: в течение двух суток пленка выдерживалась в 2%-м растворе NaOH для удаления клеток, затем пленка промывалась в дистиллированной воде до нейтральной реакции, после этого пленку обрабатывали в течение суток в 2%-м растворе HCl для удаления красящих веществ чая, затем пленка промывалась дистиллированной водой до нейтральной реакции среды. Плёнка высушивалась при комнатной температуре в расправленном состоянии.

Методом инфракрасной спектроскопии была установлена структура бактериальной целлюлозы. Сравнение полос поглощения функциональных групп в образцах бактериальной целлюлозы с литературными данными для бактериальной целлюлозы, выращенной с помощью продуцента *Acetobacter* [12], представлено в табл. 1.

Интенсивная полоса $3200\text{--}3600\text{ см}^{-1}$ обусловлена валентными колебаниями OH-групп. Менее интенсивная в области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ обусловлена валентными колебаниями групп CH_2 , CH. В спектре целлюлозы интенсивная полоса с максимумом при 1641 см^{-1} принадлежит деформационным колебаниям OH-групп прочно связанной воды. Полоса при 1281 см^{-1} указывает на валентные колебания OH-групп в спиртах. Полосы поглощения в области $1000\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ обусловлены в основном валентными колебаниями C—O—C и C—O в спиртах. Полоса при 899 см^{-1} подтверждает наличие β -1,4 связей. ИК-спектры показывают, что БЦ не содержит примесей, в частности лигнина, присутствующего в растительной целлюлозе, так как отсутствуют полосы поглощения, характерные для ароматических соединений (лигнина).

Таблица 1

Отнесение полос поглощения функциональных групп в образце бактериальной целлюлозы

Отнесение полос поглощения*	Максимум полосы поглощения, см^{-1}	
	БЦ	БЦ [12]
ν OH-групп, участвующих в межмолекулярных и внутримолекулярных H-связях	3432	3408
ν связей в группах CH и CH_2	2919 2852	2897
ν присутствия аминокислот	2135 2234	—
δ связей NOH обусловлено присутствием прочно связанной воды	1641	1635
δ групп OH в CH_2OH	1281	1370
ν связей C—O (характерные для полисахаридов полосы, обусловленные наличием ацетильных связей C—O—C и связей C—O в спиртах)	1059	1163 1060
β -1,4 связи	899	899

Примечания: * ν – валентные колебания, δ – деформационные колебания, БЦ – бактериальная целлюлоза.

В отличие от литературных данных [12], в спектре присутствуют слабые полосы при 2135 и 2234 см^{-1} , указывающие на наличие аминокислот, которые могут принадлежать остаткам клеток дрожжей и бактерий [1].

Полученный образец БЦ был проанализирован по стандартным методикам [7] для определения физико-химических показателей, представленных в табл. 2, в сравнении с данными хлопковой целлюлозы [3].

Таблица 2
Физико-химические показатели
бактериальной целлюлозы
в сравнении с хлопковой

Показатели*	БЦ	Хлопковая целлюлоза [3]
Степень полимеризации целлюлозы	2000	2000
Массовая доля золы, %	0,14	0,10
Массовая доля кислотонерастворимого лигнина, %	0,80	0,50

Примечание. * – в пересчете на а.с.в.

Воздушно-сухая БЦ содержит 4,7 масс. % влаги. Степень полимеризации микробиологической БЦ соответствует степени полимеризации растительной хлопковой целлюлозы, пригодной для химической модификации.

Согласно данным [9] в компонентном составе БЦ отсутствуют примеси лигнина и других сопутствующих компонентов. С целью подтверждения этого факта в образце БЦ была определена массовая доля кислотонерастворимого лигнина по стандартной методике [7], значение – 0,80%. Данный показатель превышает массовую долю кислотонерастворимого лигнина в хлопковой целлюлозе. Однако можно

предположить, что кислотонерастворимый осадок в данном случае представляет собой не истинный лигнин, а кислотонерастворимые лигниноподобные вещества, например фенольные и красящие вещества чая, которые присутствуют в питательной среде. Массовая доля золы в образцах БЦ сравнима с зольностью хлопковой целлюлозы. При попытке определить массовую долю альфа-целлюлозы по стандартной методике для хлопковой целлюлозы было обнаружено, что измельченный образец, помещенный в 17,5%-ный раствор гидроксида натрия, не набухает и не растворяется. Содержание альфа-целлюлозы в образце составило 101,6%, – это свидетельствует о недостаточной промывке образца от гидроксида натрия, а также о высоком содержании высокополимерной целлюлозы.

На рис. 1 приведена сетчатая структура бактериальной целлюлозы, сформированная микрофибриллами.

Для анализа структуры микрофибрилл БЦ проводили статистическую обработку значений их диаметра. В расчете использовали выборку данных, включающую 1000 измерений. На рис. 2 представлено распределение значений диаметров микрофибрилл БЦ от частоты их встречаемости в образце, средний диаметр которой составляет 30,6 нм.

Среднее квадратичное отклонение равно 164,7. Это означает, что диаметры 12,4% единиц выборочной совокупности отклоняются от среднего арифметического диаметра не более чем на $\pm 5,2\%$ для БЦ. Основная ошибка среднего значения является величиной, на которую может отличаться среднее значение выборочной совокупности при том условии, что распределение изучаемого признака приближается к нормальному. Таким образом, среднее значение диаметра фибрилл равно $(30,6 \pm 5,0)$ нм.

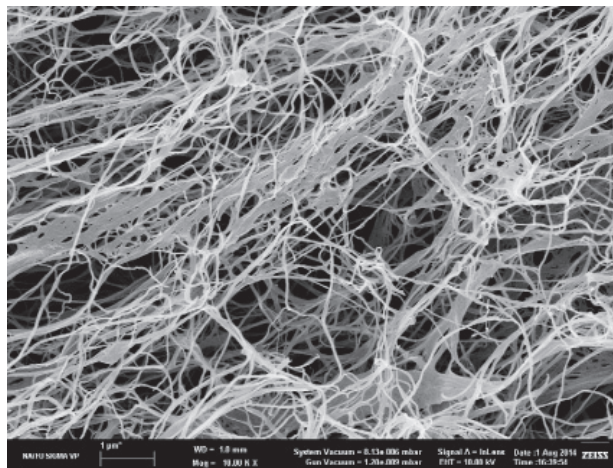


Рис. 1. Структура микрофибрилл БЦ

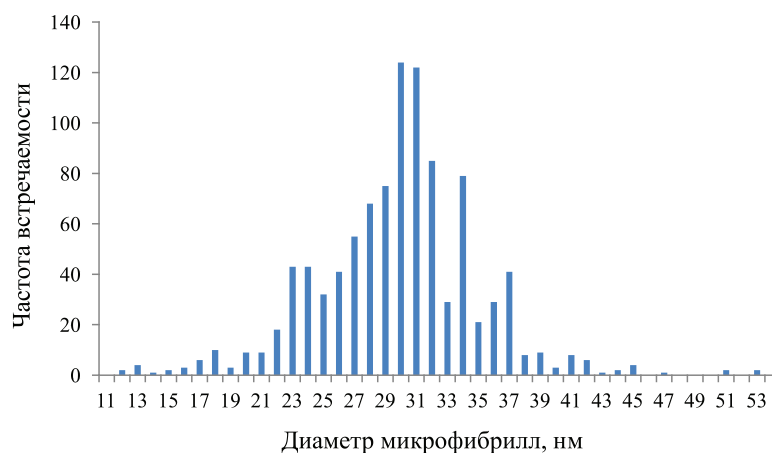


Рис. 2. Распределение значений диаметра микрофибрилл БЦ

Выводы

Исследовано культивирование бактериальной целлюлозы на синтетической глюкозной среде с использованием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii*. Определены физико-химические свойства очищенного химическими методами образца: массовая доля кислотонерастворимого лигнина, зольность, степень полимеризации целлюлозы и влажность. Установлено, что степень полимеризации бактериальной целлюлозы близка к степени полимеризации хлопковой целлюлозы. Методом инфракрасной спектроскопии выявлено, что полученный ИК-спектр не содержит полос поглощения, характерных для ароматических соединений (лигнина), что подтверждает чистоту полученного образца и соответствует основным полосам поглощения функциональных групп бактериальной целлюлозы, выращенной с помощью продуцента *Acetobacter*. Методом электронной микроскопии изучено распределение значений диаметра микрофибрилл в образце бактериальной целлюлозы, в результате установлена упорядоченная структура и рассчитан средний диаметр микрофибрилл 30,6 нм.

Исследование структуры микрофибрилл выполнено с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» (САФУ, г. Архангельск) при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (уникальный идентификатор работ RFMEFI59414X0004). Автор выражает признательность администрации ЦКП НО «Арктика» и Чухчину Дмитрию Германовичу, к.т.н., доценту.

Список литературы

- Беллами Л. Новые данные по ИК спектрам сложных молекул. – М.: Мир, 1971. – 320 с.
- Виноградова В.Р., Болотова К.С. Влияние химической и ферментативной обработки бактериальной целлюло-

зы на ее структуру и состав // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (21–23 мая 2014 г., г. Бийск). – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2014. – С. 216–218.

- Гисматулина Ю.А., Будаева В.В. Сравнение целлюлоз, выделенных из мискантуса, с хлопковой целлюлозой методом ИК-Фурье спектроскопии Ползуновский вестник. – 2014. – № 3. – С. 177–181.

- Гладышева Е.К. Изучение биосинтеза бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* J. Lindau на средах с различной начальной концентрацией глюкозы Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2–1. – С. 13–17.

- Гладышева Е.К., Судакова О.А. Культивирование *Medusomyces gisevii* J. Lindau при различных значениях активной кислотности // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, 21–23 мая 2014 г., г. Бийск. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2014. – С. 284–286.

- Кезина Е.В., Парчайкина О.В., Кадиалиев Д.А., Ревин В.В., Котина Е.А. Получение карбоксиметильных производных бактериальной целлюлозы с высокой степенью замещения Актуальная биотехнология. – 2014. – № 3. – С. 37.

- Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: учебное пособие для вузов. – М.: Экология, 1991. – 320 с.

- Юркевич Д.И., Кутышенко В.П. Медузомицет (Чайный гриб): научная история, состав, особенности физиологии и метаболизма Биофизика. – 2002. – № 6. – С. 1116–1129.

- Belgacem M.N. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources / M.N Belgacem, A. Gandini. – Amsterdam: Elsevier. – 2008. – 553 p.

- Koon-Yang Lee, Gizem Buldum, Anthanasios Mantalaris, Alexander Bismarck. More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Boisynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites Macromolecular Bioscience. – 2014. – № 6. – P. 10–32.

- Mitrofanov R.Yu., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Preparation and Properties of Bacterial Cellulose Gel Films Chemistry for Sustainable Development. – 2010. – № 5. – P. 503–508.

- Xueqiong Yin, Changjiang Yu, Xiaoli Zhang, Jianxin Yang, Qiang Lin, Jinbang Wang, Qingmei Zhu. Comparison of succinylation methods for bacterial cellulose and adsorption capacities of bacterial cellulose derivatives for Cu²⁺ ion Polymer Bulletin. – 2011. – № 67. – С. 401–412.

References

1. Bellami L. Novye dannye po IK spektram slozhnyh molekul. M.: Mir, 1971. 320 s.
2. Vinogradova V.R., Bolotova K.S. Vliyanie himicheskoy i fermentativnoy obrabotki bakterialnoj celljulozy na ee strukturu i sostav / *Tehnologii i oborudovanie himicheskoy, biotehnologicheskoy i pishhevoj promyshlennosti: materialy VII Vserossiyskoj nauchno-prakticheskoy konferencii studentov, aspirantov i molodyh uchenyh s mezhdunarodnym uchastiem* (21–23 maja 2014 g., g. Bijsk). Bijsk: Izd-vo Alt. gos. tehn. un-ta, 2014. pp. 216–218.
3. Gismatulina Ju.A., Budaeva V.V. Sravnenie celljuloz, vydelennyh iz miskantusa, s hlopkovoj celljulozoj metodom IK-Fure spektroskopii *Polzunovskij vestnik*. 2014. no. 3. pp. 177–181.
4. Gladysheva E.K. Izuchenie biosinteza bakterialnoj celljulozy kulturoj *Medusomyces gisevii* J. Lindau na sredah s razlichnoj nachalnoj koncentraciej gljukozy *Fundamentalnye issledovanie*. 2015. no. 2–1. pp. 13–17.
5. Gladysheva E.K., Sudakova O.A. Kultivirovanie *Medusomyces gisevii* J. Lindau pri razlichnyh znachenijah aktivnoj kislotnosti / *Tehnologii i oborudovanie himicheskoy, biotehnologicheskoy i pishhevoj promyshlennosti: materialy VII Vserossiyskoj nauchno-prakticheskoy konferencii studentov, aspirantov i molodyh uchenyh s mezhdunarodnym uchastiem*, 21–23 maja 2014 g., g. Bijsk. Bijsk: Izd-vo Alt. gos. tehn. un-ta, 2014. pp. 284–286.
6. Kezina E.V., Parchajkina O.V., Kadimaliev D.A., Revin V.V., Kotina E.A. Poluchenie karboksimetilnyh proizvodnyh bakterialnoj celljulozy s vysokoj stepenju zameshhenija *Aktualnaja biotehnologija*. 2014. no. 3. pp. 37.
7. Obolenskaja A.V., Elnickaja Z.P., Leonovich A.A. *Laboratornye raboty po himii drevesiny i celljulozy: Uchebnoe posobie dlja vuzov*. M.: Jekologija, 1991. 320 p.
8. Jurkevich D.I., Kutysenko V.P. *Meduzomicet (Chajnyj grib): nauchnaja istorija, sostav, osobennosti fiziologii i metabolizma Biofizika*. 2002. no. 6. pp. 1116–1129.
9. Belgacem M.N. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources* / M.N. Belgacem, A. Gandini. Amsterdam: Elsevier. 2008. 553 p.
10. Koon-Yang Lee, Gizem Buldum, Anthanasios Mantalas, Alexander Bismarck. More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Boisynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites *Macromolecular Bioscience*. 2014. no. 6. pp. 10–32.
11. Mitrofanov R.Yu., Budaeva V.V., Sakovich G.V. Preparation and Properties of Bacterial Cellulose Gel Films *Chemistry for Sustainable Development*. 2010. no. 5. pp. 503–508.
12. Xueqiong Yin, Changjiang Yu, Xiaoli Zhang, Jianxin Yang, Qiang Lin, Jinbang Wang, Qingmei Zhu. Comparison of succinylation methods for bacterial cellulose and adsorption capacities of bacterial cellulose derivatives for Cu²⁺ ion *Polymer Bulletin*. 2011. no. 67. pp. 401–412.

Рецензенты:

Канарский А.В., д.т.н., профессор кафедры пищевой биотехнологии, ФГБОУ ВПО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань;

Меледина Т.В., д.т.н., профессор, заведующая кафедрой пищевой биотехнологии продуктов из растительного сырья Института холода и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», г. Санкт-Петербург.