

УДК 577.114

## РЕЗУЛЬТАТЫ РЕНТГЕНОГРАФИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Гладышева Е.К.

ФГБУН «Институт проблем химико-энергетических технологий»

Сибирского отделения Российской академии наук, Бийск, e-mail: evg-gladysheva@yandex.ru

Проведено культивирование бактериальной целлюлозы на синтетической сахарозной среде, на гидролизате крахмала, на среде ферментативного гидролизата мискантуса, с использованием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii*. Очищенные образцы исследованы методом рентгенографического анализа. В результате анализа определены структурные характеристики кристаллической составляющей: степень кристалличности, размеры и форма элементарных фибрилл, периоды элементарной ячейки и угол моноклинности, а также проведена оценка соответствия атомной структуры той или иной модели строения целлюлозы. Сравнение дифракционных картин, полученных в геометриях на отражение и просвет, в сопоставлении со штрихдиаграммой целлюлозы Ia, свидетельствует об анизотропии структуры полученных образцов. Обнаружено, что наибольшая степень кристалличности у образца бактериальной целлюлозы, полученного на среде ферментативного гидролизата мискантуса. Достоверно показано, что во всех образцах бактериальной целлюлозы преобладает низкосимметричная метастабильная фаза Ia.

**Ключевые слова:** бактериальная целлюлоза, ферментативный гидролизат мискантуса, *Medusomyces gisevii*, рентгенографические исследования, степень кристалличности, область когерентного рассеяния

## BACTERIAL CELLULOSE X-RAY STUDY RESULTS

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

Bacterial cellulose was cultivated on a synthetic sucrose broth, a starch hydrolyzate, and an enzymatic *Miscanthus* hydrolyzate broth using the symbiotic culture *Medusomyces gisevii*. The purified samples were examined by x-ray analysis. The analysis eventually identified structural characteristics of the crystalline constituent: crystallinity degree, dimensions and shape of elementary fibrils, unit cell periods, and monoclinic angle; the matching of the atomic structure to one cellulose structural model or another was also evaluated. A comparison of the diffraction patterns obtained in transmission and reflection modes as opposed to the Ia-cellulose line diagram suggests that the resultant samples have anisotropic structures. The highest degree of crystallinity was detected in the bacterial cellulose sample obtained on the enzymatic *Miscanthus* hydrolyzate broth. It was shown with certainty that the low-symmetry metastable Ia phase prevails in all of the bacterial cellulose samples.

**Keywords:** bacterial cellulose, enzymatic *Miscanthus* hydrolyzate, *Medusomyces gisevii*, x-ray studies, crystallinity degree, coherent scattering region

Впервые бактериальная целлюлоза (БЦ) была описана Брауном в 1886 г. [13]. С тех пор интерес к этому материалу непрерывно растет, раскрывая новые возможности уникального материала.

Технология БЦ развивается в странах ЕС, США и Японии с 40-х гг. XX века. В настоящее время достигнуты значительные успехи в данной области. БЦ используется в биотехнологической, пищевой, химической, электронной и целлюлозно-бумажной промышленности, в частности теоретически обосновано и экспериментально доказано, что добавление БЦ повышает устойчивость бумаги к старению, а также повышает электрофизические характеристики электроизоляционной бумаги [8]. Широкое применение БЦ нашла в медицине. На основе матриц БЦ создают раневые покрытия, в микрохирургии при протезировании кровеносных сосудов, также на их основе возможно

восстановить суставные хрящи. Наноконструкты БЦ – гидроксипатита могут быть использованы в тканевой инженерии [4]. Исследования в данной области продолжаются и в настоящее время [5, 6, 7], включая попытки химической модификации БЦ.

Бактериальная целлюлоза (БЦ) обладает свойствами, отличающими ее от растительной целлюлозы. Хотя молекулярная и полимерная структура соответствует растительной целлюлозе, БЦ имеет более высокие степени полимеризации и кристалличности, характеризуется высокой водопоглощающей способностью, более высокой механической прочностью при меньшей ширине волокна, чем у растительной целлюлозы [12].

В настоящее время методы рентгеноструктурного анализа позволяют рассчитывать и проанализировать структурные характеристики кристаллической состав-

ляющей: степень кристалличности (СК), размеры и форму элементарных фибрилл (областей когерентного рассеяния (ОКР)), периоды элементарной ячейки и угол моноклинности, а также оценить соответствие атомной структуры той или иной модели строения целлюлозы [9]. В литературе приведен рентгенодифракционный анализ различных видов целлюлозы [10].

**Целью данной работы** является исследование БЦ, выращенной на различных питательных средах, методом рентгенографического анализа.

**Материалы и методы исследования**

В экспериментах использовались: синтетическая питательная среда, приготовленная растворением сахарозы в экстракте черного чая, гидролизат крахмала, ферментативный гидролизат мискантуса. В качестве инокулята использовалась семидневная симбиотическая культура, выращенная на глюкозной среде, доза внесения составляла 10%. Начальная концентрация субстрата во всех питательных средах составила 20 г/л, уровень активной кислотности саморегулировался симбиозом [3]. Культивирование проводилось в статических условиях при 25–29°C в течение 13 суток.

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

Рентгенографический анализ высушенных образцов проводился сотрудниками Петрозаводского государственного университета Л.А. Алешиной и И.В. Люхановой на автоматизированном дифрактометре ДРОН-6.0 в CuK $\alpha$  излучении, монохроматор – пиролитический графит. Рентгенограммы сняты в двух геометриях: на отражение и просвет.

**Результаты исследования и их обсуждение**

На рис. 1 сравниваются картины рассеяния образцом, полученные в геометриях на отражение и просвет, в сопоставлении со штрих-диаграммой целлюлозы Ia, рассчитанной по координатам атомов, приведенным в литературе [11]. Указаны индексы наиболее интенсивных отражений. Видно, что зарегистрированная в геометрии на отражение дифракционная картина по соотношению интенсивностей отражений от кристаллической фазы резко отличается от таковой, зарегистрированной в геометрии на просвет. Это свидетельствует об анизотропии структуры изучаемого образца. Ранее были сняты рентгенограммы образцов бактериальной целлюлозы, выращенной на питательной среде, приготовленной из сахарозы и экстракта черного чая, в геометриях на отражение и на просвет. Рентгенограммы исследованных образцов, полученные в геометрии на отражение и просвет, также резко отличаются, что также указывает на анизотропию структуры [2].

В табл. 1 сравниваются результаты расчета размеров кристаллов (ОКР) и СК для образцов бактериальной целлюлозы, выращенной на различных питательных средах.

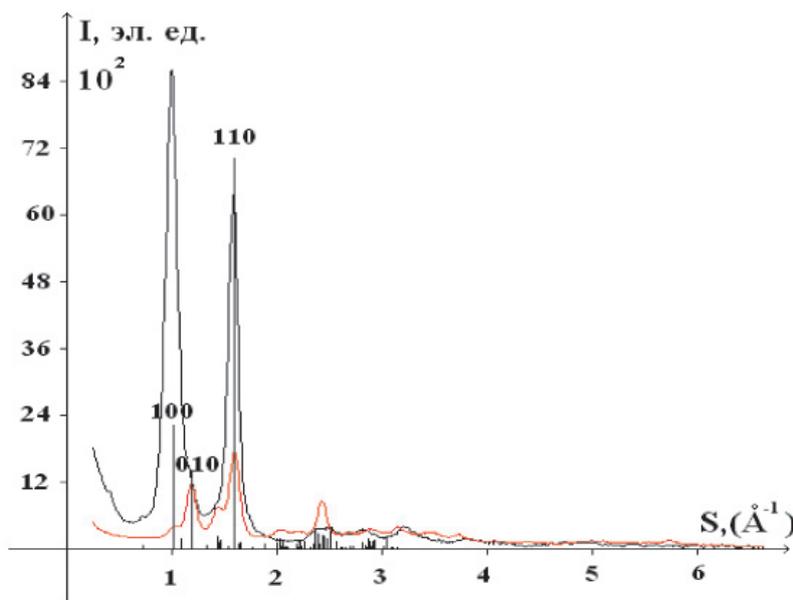


Рис. 1. Нормированные кривые распределения интенсивности рассеяния образцом бактериальной целлюлозы, полученной на среде ферментативного гидролизата мискантуса, в геометриях: — на отражение, — на просвет

Таблица 1

Размеры ОКР в различных кристаллографических направлениях  
и СК образцов бактериальной целлюлозы

Образец бактериальной целлюлозы, выращенной	СК, %	Размер кристаллитов D (Å) в направлениях		
		[100]	[010]	[110]
на сахарозе [2]	89	51	57	57
на гидролизате крахмала	91	68	38	49
на гидролизате мискантуса	95	48	38	51

Примечание. Погрешность:  $\Delta СК = \pm 5\%$ ;  $\Delta D = \pm 5 \text{ \AA}$ .

СК и ОКР являются характеристиками надмолекулярной структуры БЦ [9]. ОКР исследованных образцов практически равноосны по форме и в направлениях осей  $a$  и  $b$  элементарной ячейки практически не отличаются друг от друга. Следует отметить, что образец БЦ, выращенной на гидролизате мискантуса, имеет более высокую степень кристалличности, по сравнению с БЦ, полученной на гидролизате крахмала и сахарозной среде.

Расчет данной рентгенограммы методом полнопрофильного анализа показал, что бактериальная целлюлоза состоит из двух различных кристаллических модификаций: триклинной  $I\alpha$  и моноклинной  $I\beta$  (с антипараллельным расположением молекул). Процентное соотношение фаз  $I\alpha : I\beta$  в образце составило 99:1 соответственно. Аномально высокая интенсивность отражения (100) связана с наличием текстуры (преимущественной ориентации кристаллитов) в фазе

$I\alpha$ : ось текстуры [010]. Коэффициент, учитывающий текстуру, больше 1, что свидетельствует об игольчатой форме кристаллов целлюлозы  $I\alpha$ . При этом плоскости (100) кристаллитов оказываются параллельны поверхности пленки. Графический результат уточнения профильных характеристик показан на рис. 2.

Уточненные значения периодов  $a$ ,  $b$ ,  $c$  и углов  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  элементарных ячеек обеих фаз представлены в табл. 2.

Полученные данные соответствуют литературным [1], где с целлюлозой  $I\alpha$  была идентифицирована одноцепочная триклинная элементарная ячейка со следующими размерами:  $a = 6,74$ ;  $b = 5,93$ ;  $c = 10,36$ ;  $\alpha = 117^\circ$ ;  $\beta = 113^\circ$ ;  $\gamma = 81^\circ$ . Пространственная группа симметрии  $P1$ . Структура фазы  $I\beta$  описывается моноклинной элементарной ячейкой с размерами:  $a = 8,01$ ;  $b = 8,17$ ;  $c = 10,36$ ;  $\gamma = 97,3^\circ$ . Пространственная группа симметрии  $P2$ .

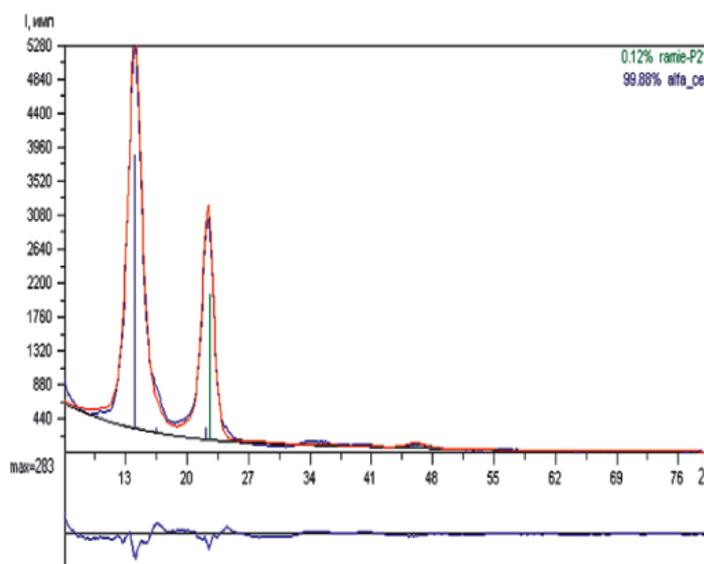


Рис. 2. Рентгенограммы:

— теоретическая, рассчитанная по данным, полученным в результате уточнения профильных и структурных параметров, — экспериментальная для образца бактериальной целлюлозы. В нижней части рисунка показана разностная кривая; вертикальные линии соответствуют штрихдиаграмме: —  $I\alpha$ , —  $I\beta$

**Таблица 2**  
Кристаллографические характеристики исследуемых образцов БЦ

Образец БЦ		<i>a</i> , Å	<i>b</i> , Å	<i>c</i> , Å	$\alpha$ , °	$\beta$ , °	$\gamma$ , °	<i>Rwp</i> , %	<i>Rp</i> , %
на сахарозной среде	1 $\alpha$	6,82(8)	6,10(6)	10,35(2)	118,(10)	114,(17)	82,(6)	13,84	11,03
	1 $\beta$	8,171	7,846	10,340	90,00	90,00	96,4		
на гидролизате крахмала	1 $\alpha$	7,(1)	5,97(1)	10,(3)	116,(31)	112,(3)	81,(20)	14,75	11,75
	1 $\beta$	7,88(9)	8,17(3)	10,36(2)	90	90	97,(3)		
на гидролизате мискантуса	1 $\alpha$	6,74(5)	5,97(3)	10,(2)	117,(59)	112,(86)	81,(18)	12,26	8,50
	1 $\beta$	7,90(1)	8,18(2)	10,38(3)	90	90	98,(6)		

Примечание. *Rwp*, *Rp* – факторы недовостовренности.

Рассчитанные значения СК и размеры ОКР, рассчитанные из ширин трех отражений целлюлозы, индексы которых приведены в табл. 2. Видно, что СК не зависит от геометрии исследований.

Преобладание низкосимметричной фазы 1 $\alpha$  в экспериментальном образце хорошо согласуется с литературными данными, свидетельствующими, что, в отличие от растительной целлюлозы, целлюлозы примитивных организмов характеризуются высоким процентом фазы 1 $\alpha$  (~70%). Также известно, что триклинная модификация целлюлозы 1 $\alpha$  метастабильна, поэтому её реакционная способность выше. Сосуществование двух полиморфов, имеющих различную стабильность, будет влиять на реакционную способность нативной целлюлозы: так как 1 $\alpha$  метастабильна, то её реакционная способность выше, чем у 1 $\beta$ , и 1 $\alpha$  будет участком первичной реакции [1].

### Выводы

Проведено культивирование бактериальной целлюлозы на синтетической сахарозной среде, на гидролизате крахмала, на среде ферментативного гидролизата мискантуса, с использованием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii*. Очищенные образцы исследованы методом рентгенографического анализа. В результате анализа определены структурные характеристики кристаллической составляющей: степень кристалличности, размеры и форма элементарных фибрилл, периоды элементарной ячейки и угол моноклинности, а также проведена оценка соответствия атомной структуры той или иной модели строения целлюлозы. Установлено, что все образцы характеризуются анизотропией структуры. Обнаружено, что наибольшая степень кристалличности у образца бактериальной целлюлозы, полученного на среде ферментативного гидролизата. Достоверно

показано, что во всех образцах бактериальной целлюлозы преобладает низкосимметричная метастабильная фаза 1 $\alpha$ .

### Список литературы

1. Алешина Л.А., Глазкова С.В., Луговская Л.А., Подойникова М.В., Фофанов А.Д., Сирина Е.В. Современные представления о строении целлюлоз (обзор) // Химия растительного сырья. – 2001. – № 1. – С. 5–35.
2. Алешина Л.А., Люханова И.В., Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю. Рентгенографические исследования бактериальной целлюлозы / Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы V Всероссийской конференции с международным участием (г. Барнаул 24–26 апреля 2012 г.) / Под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2012. – С. 28–30.
3. 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.
4. Гладышева Е.К. Обоснование выбора питательной среды для синтеза бактериальной целлюлозы // Вестник Алтайской науки. – 2014. – № 1. – Р. 307–310.
5. Громовых Т.И., Хан Фан Ми, Дмитренко А.С. Направленное использование бактериальной целлюлозы в пищевых технологиях и медицине // Биотехнология и качество жизни: материалы Международной научно-практической конференции (г. Москва 18–20 марта 2014 г.). – М.: ЗАО «Экспо-биохимтехнологии», 2014. – С. 331–332.
6. Кезина Е.В., Парчайкина О.В., Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Котина Е.А. Получение карбоксиметильных производных бактериальной целлюлозы с высокой степенью замещения // Актуальная биотехнология. – 2014. – № 3. – С. 37.
7. Кучина И.А., Литвиненко А.В., Болотова К.С. Исследование синтеза бактериальной целлюлозы в среде на основе ферментативного гидролизата // Пищевые технологии и биотехнологии: материалы XIV Международной конференции молодых ученых (г. Казань, 13–14 мая 2015 г.). Сборник тезисов докладов. – Казань: Изд-во «БРИГ», 2015. – С. 70.
8. Смирнова Е.Г. Повышение устойчивости бумаги к старению формированием ее композиционного состава: дис. ... д-ра тех. наук: 05.21.03. – СПб., 2014. – 32 с.
9. Структура и физико-химические свойства целлюлоз и нанокмозитов на их основе / под ред. Л.А. Алешина, В.А. Гуртова, Н.В. Мелех. – Петрозаводск: ПетрГУ, 2014. – 240 с.
10. Шипина О.Т., Валишина З.Т., Косточко А.В. Рентгенодифракционный анализ различных видов целлюлозы // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18, № 17. – С. 166–170.

11. Aabloo A., French A.D., Mikelsaar R.H., Pertsin A.J. Studies of crystalline native cellulose using potential – energy calculations // *Cellulose*. – 1994. – Vol. 1. – P. 161–168.

12. Belgacem M.N. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Amsterdam, 2008. – 553 p.

13. 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.

### References

1. Aleshina L.A., Glazkova S.V., Lugovskaja L.A., Podonikova M.V., Fofanov A.D., Silina E.V. Sovremennye predstavlenija o stroenii celljuloz (obzor) // *Himija rastitelnogo syrja*. 2001. no. 1. pp. 5–35.

2. Aleshina L.A., Ljuhanova I.V., Budaeva V.V., Mitrofanov R.Ju. Rentgenograficheskie issledovanija bakterialnoj celljulozy // *Novye dostizhenija v himii i himicheskoj tehnologii rastitelnogo syrja: materialy V Sserossijskoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem (g. Barnaul 24–26 aprlja 2012 g.) / Pod red. N.G. Bazarnovoj, V.I. Markina*. Barnaul: Izd-vo Alt. un-ta, 2012. pp. 28–30.

3. Gladysheva E.K. Izuchenie biosinteza bakterialnoj celljulozy kulturoj *Medusomyces gisevii* J. Lindau na sredah s razlichnoj nachalnoj koncentraciej gljukozy // *Fundamentalnye issledovanija*. 2015. no. 2–1. pp. 13–17.

4. Gladysheva E.K. Obosnovanie vybora pitatelnoj sredy dlja sinteza bakterialnoj celljulozy // *Vestnik Altajskoj nauki*. 2014. no. 1. pp. 307–310.

5. Gromovych T.I., Han Fan Mi, Dmitrenok A.S. Napravlennoe ispolzovanie bakterialnoj celljulozy v pishhevych tehnologijah i medicine / *Biotehnologija i kachestvo zhizni: materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii (g. Moskva 18–20 marta 2014 g.)*. M.: ZAO «Jekspo-biohimtehnologii», 2014. pp. 331–332.

6. Kezina E.V., Parchajkina O.V., Kadimaliev D.A., Revin V.V., Kotina E.A. Poluchenie karboksimetilnyh proizvodnyh bakterialnoj celljulozy s vysokoj stepenju zameshenija // *Aktualnaja biotehnologija*. 2014. no. 3. pp. 37.

7. Kuchina I.A., Litvinenko A.V., Bolotova K.S. Issledovanie sinteza bakterialnoj celljulozy v srede na osnove fermentativnogo gidrolizata. // *Pishhevyeh tehnologii i biotehnologii: materialy HIV Mezhdunarodnoj konferencii molodyh uchenykh (g. Kazan, 13–14 maja 2015 g.)*. Sbornik tezisov dokladov. Kazan: Izdatelstvo «BRIG», 2015. pp. 70.

8. Smirnova E.G. Povyshenie ustojchivosti bumagi k stareniju formirovanem ee kompozicionnogo sostava: dis... dokt. teh. nauk: 05.21.03 / Smirnova Ekaterina Grigorevna. Sankt-Peterburg, 2014. 32 p.

9. Struktura i fiziko-himicheskie svojstva celljuloz i nanokompozitov na ih osnove / pod red. L.A. Aleshina, V.A. Gurtova, N.V. Meleh. Petrozavodsk: PetrGU, 2014. 240 p.

10. Shipina O.T., Valishina Z.T., Kostochko A.V. Rentgenodifrakcionnyj analiz razlichnyh vidov celljulozy // *Vestnik tehnologicheskogo universiteta*. 2015. T.18, no. 17. pp. 166–170.

11. Aabloo A., French A.D., Mikelsaar R.H., Pertsin A.J. Studies of crystalline native cellulose using potential energy calculations // *Cellulose*. 1994. Vol. 1. pp. 161–168.

12. Belgacem M.N. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Amsterdam, 2008. 553 p.

13. 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. no. 6. pp. 10–32.

### 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, Институт холода и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики», г. Санкт-Петербург.