

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ

РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Национальный исследовательский
Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва»

На правах рукописи

Богатырева Алена Олеговна

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ
ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ПОЛУЧЕНИЕ НА ЕЕ ОСНОВЕ БИОКОМПОЗИЦИОННЫХ
МАТЕРИАЛОВ С АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Специальность

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук,
профессор,
В. В. Ревин

Саранск – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	8
ВВЕДЕНИЕ	9
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Строение и свойства бактериальной целлюлозы	15
1.1.1 Химическое строение и структура бактериальной целлюлозы	15
1.1.2 Физико-химические и физико-механические свойства бактериальной целлюлозы	20
1.2 Продуценты и процесс биосинтеза бактериальной целлюлозы	23
1.2.1 Продуценты бактериальной целлюлозы	23
1.2.2 Биохимические основы биосинтеза бактериальной целлюлозы	26
1.2.3 Молекулярно-генетические основы биосинтеза целлюлозы	29
1.2.4 Формирование нановолокон бактериальной целлюлозы в процессе биосинтеза	34
1.3 Влияние условий культивирования продуцента на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы	35
1.3.1 Влияние состава питательной среды на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы	35
1.3.1.1 Источники углерода	35
1.3.1.2 Источники азота	37
1.3.1.3 Индукторы биосинтеза бактериальной целлюлозы	37
1.3.1.4 Получение бактериальной целлюлозы на отходах биотехнологических производств	40
1.3.2 Влияние физико-химических факторов на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы	45

1.3.2.1	Влияние значения рН на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы	45
1.3.2.2	Влияние температуры на биосинтез бактериальной целлюлозы	46
1.3.2.3	Влияние аэрации и перемешивания на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы	46
1.3.2.4	Влияние способа культивирования на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы	47
1.3.2.5	Влияние типа биореактора на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы	49
1.4	Процессы, происходящие при заживлении ран	51
1.5	Применение бактериальной целлюлозы в медицине	55
1.5.1	Гидрогели – перспективные материалы для биомедицины	60
1.5.2	Антимикробные агенты, применяемые в композитах	66
1.5.2.1	Фузидин натрия	67
1.5.2.2	Характеристика хитозана	74
1.5.3	Композиты бактериальная целлюлоза – хитозан	81
Глава 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ		83
2.1	Объект исследования	83
2.2	Методы исследования	83
2.2.1	Условия культивирования продуцента бактериальной целлюлозы	83
2.2.2	Очистка и определение количества бактериальной целлюлозы	84
2.2.3	Определение рН	84
2.2.4	Определение концентрации сахаров в среде	84
2.2.5	Определение показателей кристалличности	85
2.2.5.1	ИК-спектроскопия	85
2.2.5.2	Рентгеноструктурный анализ	86

2.2.6	Определение ширины волокон бактериальной целлюлозы	86
2.2.7	Получение гидрогелей на основе бактериальной целлюлозы и хитозана	87
2.2.8	Изучение содержания гелевой фракции	87
2.2.9	Определение влагосвязывающей способности материалов	88
2.2.10	Определение структуры гидрогелей	88
2.2.10.1	Сканирующая электронная микроскопия	88
2.2.10.2	Микротомография образцов гидрогелей	88
2.2.11	Определение антибактериальной активности гидрогелей	89
2.2.11.1	Метод диффузии	89
2.2.11.2	Метод подсчета КОЕ	89
2.2.12	Статистическая обработка данных	90
Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ		91
3.1	Изучение биосинтеза бактериальной целлюлозы на стандартной среде NS	91
3.1.1	Исследование влияния источников углерода на образование целлюлозы	91
3.1.2	Подбор оптимальной концентрации сахаров	98
3.1.3	Изучение влияния органических кислот на выход бактериальной целлюлозы	103
3.2	Использование отходов промышленности для получения бактериальной целлюлозы	107
3.2.1	Сравнение образования бактериальной целлюлозы на стандартной среде и средах на основе мелассы и барды	107
3.2.2	Изучение образования бактериальной целлюлозы на послеспиртовой барде	114
3.2.2.1	Изучение влияния органических кислот	114

3.2.2.2	Изучение влияния глицерина	116
3.2.2.3	Исследование влияния сахаров на образование бактериальной целлюлозы	118
3.2.2.4	Изучение образования бактериальной целлюлозы на барде с мелассой	120
3.2.2.5	Исследование влияния полисахаридов на синтез бактериальной целлюлозы	121
3.2.2.6	Исследование влияния источников азота на образование бактериальной целлюлозы	124
3.2.2.7	Изучение влияния значения рН при культивировании на послеспиртовой барде	126
3.2.3	Изучение образования бактериальной целлюлозы на среде с мелассой	127
3.2.3.1	Изучение влияния начального значения рН	127
3.2.3.2	Изучение влияния количества мелассы на образование целлюлозы	133
3.2.3.3	Изучение влияния органических кислот	142
3.2.3.4	Исследование влияния глицерина на образование целлюлозы	143
3.3	Масштабирование процесса биосинтеза бактериальной целлюлозы при культивировании на средах с отходами биотехнологических производств	145
3.3.1	Изучение влияния условий культивирования на выход бактериальной целлюлозы при культивировании в шейкере инкубаторе при различных оборотах на среде с мелассой и NS	146
3.3.2	Изучение влияния условий культивирования на выход бактериальной целлюлозы при культивировании в шейкере инкубаторе при различных оборотах на среде с бардой	148

3.3.3	Оптимизация получения бактериальной целлюлозы в биореакторе Biostat Aplus объемом 1л	150
3.3.3.1	Изучение влияния режима культивирования на выход и структуру бактериальной целлюлозы при культивировании на среде с мелассой	150
3.3.3.2	Исследование влияния количества инокулята на образование бактериальной целлюлозы при культивировании на меласной среде в биореакторе	157
3.3.3.3	Изучение влияния концентрации мелассы на выход бактериальной целлюлозы в 1 л биореакторе Biostat A plus	158
3.3.3.4	Изучение влияния источников азота и витаминов на образование целлюлозы при культивировании на среде с мелассой	159
3.3.3.5	Изучение влияния условий культивирования на образование бактериальной целлюлозы при культивировании на послеспиртовой барде	160
3.3.3.6	Изучение влияния источников азота и витаминов на образование бактериальной целлюлозы при использовании послеспиртовой барды	162
3.3.3.7	Изучение влияния источников углерода на образование бактериальной целлюлозы при культивировании на послеспиртовой барде	162
3.3.4	Оптимизация получения бактериальной целлюлозы в биореакторе Biostat B plus объемом 6л	165
3.3.4.1	Культивирование с использованием послеспиртовой барды	165
3.3.4.2	Изучение влияния условий культивирования на среде с мелассой	168

3.3.5	Оптимизация получения бактериальной целлюлозы в биореакторе объемом 30 л Biostat C plus	170
3.4	Получение гидрогелей с антибактериальными свойствами на основе бактериальной целлюлозы и хитозана	173
3.4.1	Антибактериальная активность хитозана	173
3.4.2	Получение гидрогелей на основе бактериальной целлюлозы и хитозана	176
3.4.2.1	Изучение антибактериальной активности контрольных гидрогелей бактериальная целлюлоза:хитозан	185
3.4.3	Получение гидрогелей с фузидином натрия	186
3.4.4	Получение гидрогелей на основе окисленной бактериальной целлюлозы, хитозана и фузидовой кислоты	190
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	195
	ВЫВОДЫ	196
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	198

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСМ – атомно-силовая микроскопия;

АТФ – аденозинтрифосфат

БЦ – бактериальная целлюлоза;

ИК-спектроскопия (ИК-спектры) – инфракрасная спектроскопия (инфракрасные спектры);

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза;

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

C-di-GMP – циклический ди-гуанозинмонофосфат;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

HS – среда Хестрина-Шрама;

UDP-глюкоза – уридиндифосфат-глюкоза;

ЦТК – цикл трикарбоновых кислот.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Бактериальная целлюлоза (БЦ) представляет собой биополимер, обычно синтезируемый грамотрицательными бактериями рода *Komagataeibacter* (Shao et al., 2017). По сравнению с растительной целлюлозой бактериальный аналог демонстрирует более высокую степень чистоты, улучшенные механические, влагоудерживающие свойства и высокую степень кристалличности. Кроме того, БЦ является биоразлагаемым, биосовместимым, нетоксичным и неаллергенным полимером (Wang et al., 2015; Sriplai and Pinitsoontorn, 2021).

Вышеупомянутые свойства БЦ делают ее привлекательным новым материалом для биомедицинских применений. Вследствие широких возможностей использования бактериальной целлюлозы все больший интерес представляет ее производство в промышленном масштабе (Castro et al., 2011). Однако получение БЦ ограничено довольно низкой производительностью существующих штаммов бактерий. По этой причине получаемый биополимер обладает высокой себестоимостью (Fernandes et al., 2020; Mohammadkazemi et al., 2015).

Кроме того, структура и свойства целлюлозы существенно зависят от условий культивирования (Reiniati et al., 2016). Таким образом, помимо увеличения количества синтезируемого полимера, важное значение имеют свойства получаемого полисахарида. (Fu and Yang, 2013; Shahmohammadi and Almasi, 2016).

Исходя из изученных литературных данных, представляется целесообразным подобрать оптимальные условия культивирования продуцента БЦ, с целью увеличения выхода продукта и снижения себестоимости, путем использования отходов биотехнологических производств, в частности мелассы и послеспиртовой барды.

БЦ широко используются в биомедицине, например, в сфере доставки лекарств, тканевой инженерии, заживления ран и в качестве антимикробных

покрытий (Wahid et al., 2018). При этом сама бактериальная целлюлоза не обладает антибактериальными свойствами (Wahid et al., 2018). А между тем проблема лечения ран является весьма актуальной, поскольку число пациентов с хроническими ранами, ожогами и язвами ежегодно растет во всем мире.

Кроме того, проблема борьбы с антибиотикорезистентными штаммами является весьма актуальной, поскольку становится серьезной угрозой в человеческом обществе. По этой причине разработка эффективных альтернативных антибактериальных материалов остается весьма серьезной проблемой на сегодняшний день. Учитывая приведенные факты, важной задачей является создание новых биокomпозиционных материалов на основе гидрогеля БЦ, обладающих антимикробными свойствами.

Исходя из изученных литературных данных, представляется целесообразным подобрать оптимальные условия культивирования продуцента БЦ с целью увеличения выхода продукта и снижения его себестоимости путем использования отходов биотехнологических производств, в частности мелассы и послеспиртовой барды. И создать гидрогели с антибактериальными свойствами для лечения ран, состоящие из БЦ, хитозана и антимикробных агентов.

Цель и задачи исследования

Цель работы: подбор оптимальных условий культивирования продуцента бактериальной целлюлозы *Komagataeibacter sucrofermentans* В-11267 на питательных средах с низкой себестоимостью с целью эффективного производства полимера с заданными характеристиками и получение на его основе биокomпозиционных материалов с антибактериальными свойствами.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие **задачи** исследования:

1. Оптимизировать условия биосинтеза бактериальной целлюлозы на стандартной среде NS с различными источниками углерода.

2. Разработать питательные среды на основе отходов биотехнологических производств, таких как меласса и барда, с целью увеличения выхода и снижения себестоимости продукта.

3. Исследовать влияние условий культивирования продуцента на структуру и выход бактериальной целлюлозы в процессе масштабирования.

4. Получить гидрогелевые композиты на основе полисахаридов и фузидовой кислоты, обладающие антибактериальными свойствами.

5. Изучить свойства полученных материалов.

Научная новизна и значимость работы

Расширены представления о биосинтезе бактериальной целлюлозы на средах различного состава. Оптимизированы условия образования полисахарида на стандартной среде NS с различными источниками углерода. С целью увеличения выхода полимера и снижения себестоимости продукта исследован процесс биосинтеза БЦ на средах, содержащих отходы биотехнологических производств. Повышена продуктивность штамма *K. sacrofermentans* В-11267 на средах с мелассой и послеспиртовой бардой за счет использования различных эффекторов: сахаров, глицерина, органических кислот и т.д.

Впервые изучено влияние условий культивирования *K. Sacrofermentans* В-11267 на выход и структуру целлюлозы в процессе масштабирования. Определены параметры культивирования, обеспечивающие максимальное накопление полисахарида.

Исследованы структура и физико-химические свойства полученного полимера. Показана возможность получения БЦ с заданными свойствами (степень кристалличности, аспектное соотношение) путем изменения условий культивирования продуцента.

Впервые получены биокомпозиционные материалы в гидрогелевой форме на основе бактериальной целлюлозы, хитозана и фузидовой кислоты, обладающие антибактериальными свойствами.

Практическая значимость

Разработаны технологические основы получения БЦ на средах с отходами биотехнологических производств – послеспиртовой бардой и мелассой. Предложены варианты питательных сред и условий культивирования для производства БЦ с заданными свойствами (степень кристалличности, аспектное соотношение). Предложенная технология позволит осуществлять переработку отходов спиртовой и сахарной промышленности, которые часто не находят рационального применения, а их утилизация является серьезной проблемой для предприятий.

Разработан способ получения гидрогелей на основе БЦ, хитозана и фузидовой кислоты, обладающих антибактериальными свойствами. Гидрогели более чем на 90 % состоят из воды, вследствие чего они обладают мягкой текстурой. В дополнение к действию в качестве барьера, гидрогели облегчают заживление, отдавая влагу в случае сухих некротических ран и поглощая избыточный экссудат в случае экссудативных ран. Эта особенность делает их превосходными материалами для регенерации. Кроме того, гидрогели способны уменьшать боль, позволяют осуществлять обмен газами и могут содержать антимикробные, антиоксидантные, регенерационные препараты и другие лечебные агенты. Результаты экспериментальных исследований позволяют рекомендовать разработанные гидрогели с антибактериальной активностью для лечения ран.

Полученные в работе результаты могут быть использованы для чтения курсов лекций по микробной биотехнологии в высших учебных заведениях.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены для обсуждения на следующих конференциях, форумах, конкурсах и конгрессах: 1) ежегодной научной конференции «Огарёвские чтения» в Национальном исследовательском Мордовском государственном университете им. Н. П. Огарёва», Саранск, 2014-2016; 2) научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов Национального исследовательского

Мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва, Саранск, 2015-2016; 3) Международной конференция молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии», Казань, 2016; 4) Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление», Нижний Новгород, 2016; 5) Молодежном образовательном форуме приволжского федерального округа «iВолга-2015», Самарская область, 2015; 6) Всероссийском нанотехнологическом инженерном конкурсе для студентов и аспирантов, Москва, 2015; 7) VIII Конгрессе молодых ученых университета ИТМО, Санкт-Петербург, 2019.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, в числе которых 2 статьи в российских научных журналах, рекомендованных ВАК, 1 статья в иностранном научном журнале, входящем в реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science, Scopus, а также 1 патенте.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Работа изложена на 220 страницах, включает 31 таблицу, 100 рисунков, список литературы из 204 наименований, из них 15 на русском и 199 на английском языке.

Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена на кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Н. П. Огарёва.

Автор выражает особую благодарность и признательность научному руководителю доктору биологических наук Ревину Виктору Васильевичу за внимание и помощь в подготовке диссертации, полезные советы и поддержку на всех этапах работы. А также к.б.н. Лияськиной Е. В. за практическую и консультативную помощь при выполнении данной работы и всему коллективу кафедры биотехнологии, биоинженерии и биохимии Национального

исследовательского Мордовского государственного университета им.
Н. П. Огарёва за поддержку при выполнении диссертационного исследования.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структура и свойства бактериальной целлюлозы

1.1.1 Химическое строение и структура бактериальной целлюлозы

Целлюлоза – один из самых распространенных биополимеров в природе (Kiziltas et al., 2015; Zahan et al., 2017). Она является основным компонентом хлопка (более 94%) и древесины (более 50 %) (Keshk, 2014).

С химической точки зрения целлюлоза представляет собой линейный гомополисахарид, состоящий из остатков D-глюкозы, соединенных между собой β -1,4-гликозидными связями (рис. 1) (Çakar et al., 2014). Параллельно расположенные макромолекулы целлюлозы имеют множество внутри- и межмолекулярных связей, что приводит к возникновению структур фибриллярного типа: элементарных фибрилл, микрофибрилл и других более крупных надмолекулярных образований (Ul-Islam et al., 2012).

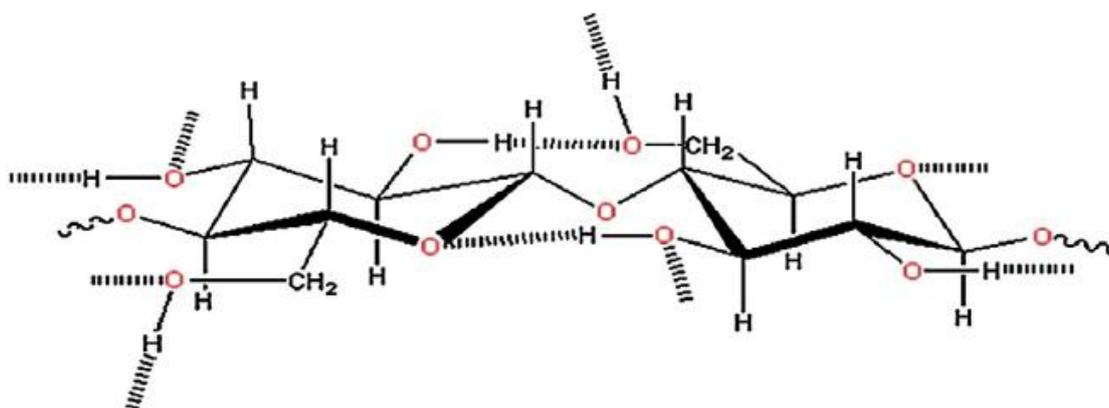


Рисунок 1 – Химическое строение целлюлозы (Torgbo and Sukyai, 2018)

Целлюлоза – это водонерастворимый полисахарид, который можно получить из разнообразных организмов, включая растения, животные, бактерии и водоросли (Kim et al., 2006). Бактериальная целлюлоза (БЦ) была впервые обнаружена Брауном в 1886 году (Esa et al., 2014).

БЦ представляет собой чистую целлюлозу, обладающую уникальными свойствами, отличными от растительного аналога (Shi et al., 2016; Cazon and Vázquez, 2021). Такими свойствами являются: высокая чистота полимера, разветвленная наноструктура, термическая стабильность и механическая прочность (Gao et al., 2016) Кроме этого для БЦ характерна высокая степень полимеризации (Dahman et al., 2010) и высокая степень кристалличности (Bilg et al., 2016). Этот полисахарид также обладает высокой водопоглощающей способностью, биосовместимостью и биоразлагаемостью (Ревин и др., 2014).

Микрофибриллы микробной целлюлозы были впервые описаны Muhlethalerin в 1949. Они примерно в 100 раз тоньше, чем фибриллы растительной целлюлозы (Gayathry and Gopalaswamy, 2014).

На рисунке 2 показана микроструктура БЦ и растительной целлюлозы при увеличении в 5000 раз (Pa'е et al., 2011).

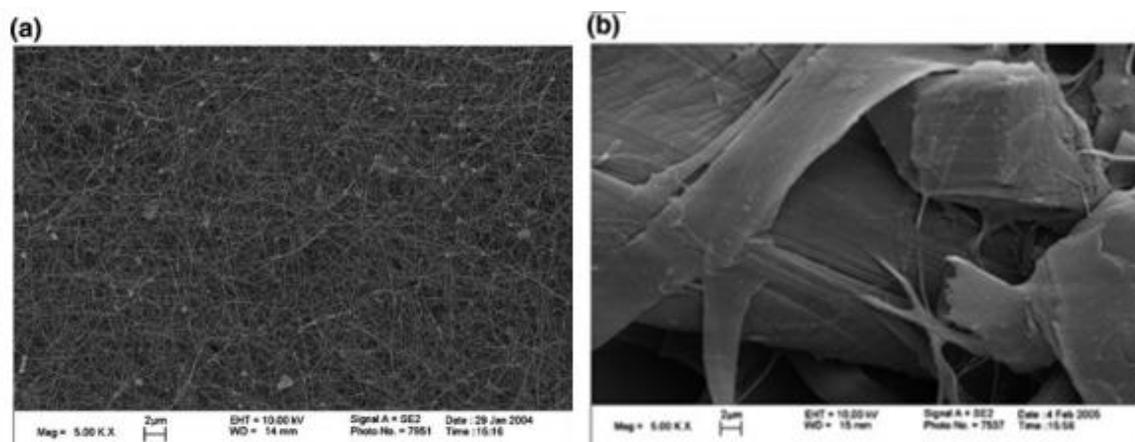


Рисунок 2 – СЭМ-изображение бактериальной (a) и растительной (b) целлюлозы при увеличении в 5000 раз (Pa'е et al., 2011)

Сравнение свойств БЦ и растительного аналога приведено в таблице 1 с ссылками (Wang, Tavakoli, and Tang, 2019).

Структура волокон БЦ представляет собой трехмерную сеть нановолокон без какой-либо предпочтительной ориентации в пространстве. Они объединяются в микрофибриллы в результате биологического процесса синтеза

полимера, образуя гидрогелевую пленку с высокой площадью поверхности и высокой пористостью (Esa et al., 2014; Torgbo and Sukyai, 2018).

Таблица 1 – Сравнение свойств бактериальной и растительной целлюлозы

Свойства	БЦ	Растительная целлюлоза	Ссылка
Прочность на разрыв (МПа)	20-300	25-200	Feng et al., 2015
Модуль Юнга (Мпа)	20000	2,5	Wang, Tavakoli, and Tang, 2019
Влагосвязывающая способность (%)	>95	25-35	Rebelo et al., 2018
Ширина волокон (нм)	20-100	Неск. мкм	Wang, Tavakoli, and Tang, 2019
Кристалличность (%)	74-96	40-85	Park et al., 2010
Относительная гидрофильность (%)	40-50	20-30	Wang, Tavakoli, and Tang, 2019
Чистота (%)	>99	< 80	Klemm et al., 2005
Степень полимеризации	14000-16000	300-10000	Wang, Tavakoli, and Tang, 2019
Пористость (%)	>85	< 75	Elham and Amir, 2013
Общая площадь поверхности (м ² / г)	>150	< 10	Islam et al., 2012

Целлюлоза богата гидроксильными группами, что объясняет такие ее свойства как гидрофильность, способность к биологическому разложению и способность к химической модификации (Esa et al., 2014).

Для целлюлозы характерно четыре полиморфных модификации. Природная целлюлоза представляет собой целлюлозу I и существует в виде двух алломорфов: триклинной I α и моноклинной I β . Целлюлоза II может быть получена из I с помощью двух различных процессов: регенерации (растворение и осаждение) и мерсеризации (щелочная обработка). (Faria-Tischer et al., 2015).

Целлюлозу III получают после более мягкой предварительной обработки аммиаком, а IV при высоком нагревании около 260 °C в присутствии глицерина (Klem et al., 2005; Fontana et al., 2017).

Komagataeibacter xylinus производит две формы целлюлозы. Различия в образовании целлюлозы I и целлюлозы II вне цитоплазматической мембраны показаны на рисунке 3 (Chawla et al., 2009).

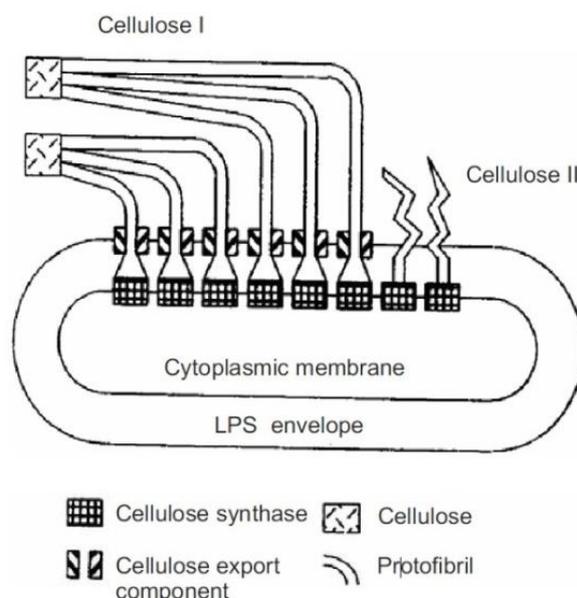


Рисунок 3 – Сборка микрофибрилл целлюлозы *K. xylinum* (Chawla et al., 2009)

На рисунке 4 можно увидеть различия в строении двух форм целлюлозы. Исходная культура *K. xylinus* имеет четкие, длинные фибриллы целлюлозы I, которая окружает клетки бактерий (A, C). После обработки бактерий пеллицином – веществом, нарушающим процесс кристаллизации целлюлозы, образуется целлюлоза II, имеющая более аморфную, гелеобразную структуру (B, D) (Strap et al., 2011). Степень кристалличности целлюлозы при этом снижается с 70 до 38 %.

Целлюлоза I β может быть получена из целлюлозы I α путем гидротермической обработки в слегка щелочной среде при температуре 260 °C в течение 30 мин. Так как I β целлюлоза образуется необратимо из целлюлозы I α , то структура целлюлозы I β должна быть термодинамически более стабильна, чем I α целлюлозы.

Целлюлоза содержит свободную гидроксильную группу на атомах C-2, C-3 и C-6. Основываясь на этих группах и атоме кислорода каждого ангидроглюкопиранозного кольца и гликозидных связей, в целлюлозе присутствуют внутри- и межмолекулярные водородные связи. Наличие внутримолекулярной водородной связи оказывает большое влияние на формирование одноцепочечной конформации и жесткость молекулы.

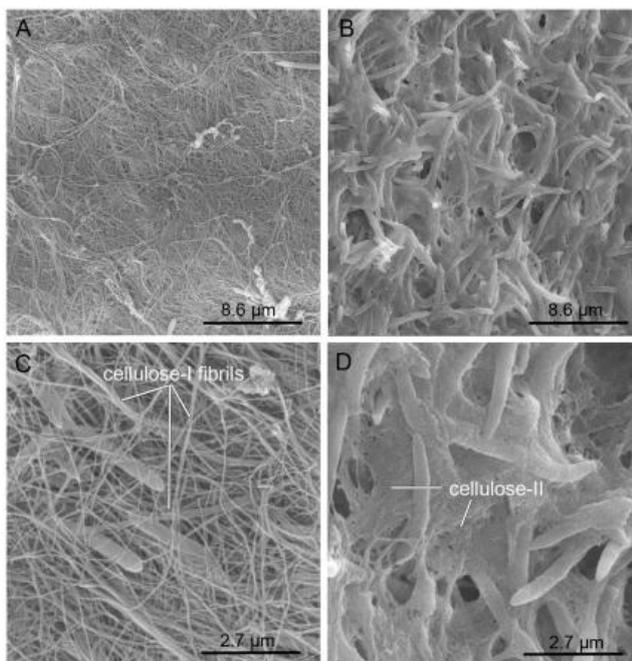


Рисунок 4 – Электронная микрофотография культуры *K. xylinus* на среде HS, образующей целлюлозу I (A и C) и целлюлозу II (B и D) (Strap et al., 2011).

Существование водородных связей между O-3-N и O-5 соседних глюкопиранозных единиц и O-2-N и O-6' в нативной кристаллической целлюлозе характеризует конформацию целлюлозы I α (рис. 5). Водородные связи между O-6' и HO-2 характеризуют конформацию целлюлозы I β (Fontana et al., 2017).

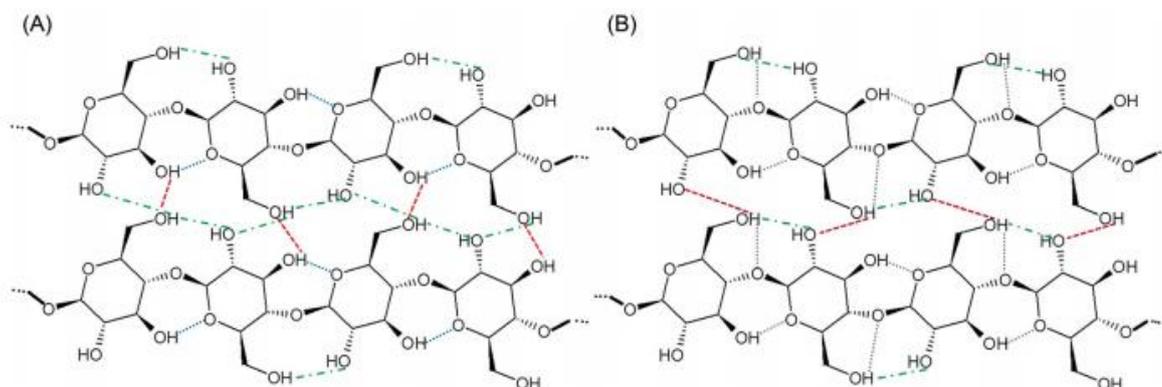


Рисунок 5 – Кристаллическая структура родственных форм целлюлозы I α и I β . A - I α -внутримолекулярные водородные связи O3N \rightarrow O5' и межмолекулярные O6-N \rightarrow O3'. B - I β -внутримолекулярные водородные связи O6 \rightarrow H-O2' и межмолекулярные связи (Fontana et al., 2017)

Соотношение различных форм целлюлозы (I α и I β), зависит от её происхождения. Целлюлоза морских водорослей и бактериальная целлюлоза, содержит большое количество I α целлюлозы, средняя массовая доля которой составляет около 0,63. В случае бактериальной целлюлозы, массовая доля I α целлюлозы также зависит от штамма продуцента и условий культивирования, и изменяется в пределах от 0,64 до 0,71. Тогда как целлюлоза, формирующая клеточные стенки высших растений, богата целлюлозой I β с массовой долей около 0,8, характерной для древесины (Keshk, 2014).

1.1.2. Физико-химические и физико-механические свойства бактериальной целлюлозы

БЦ обладает уникальными свойствами: высокой водоудерживающей и водосвязывающей способностью, высокой растяжимостью и прочностью, способностью принимать необходимую форму. (Reiniati et al., 2016; Casicedo et al., 2016a). Ее сетчатая структура позволяет поглощать воду в 100 раз больше собственного веса (Meftahi et al., 2010).

Это биосовместимое вещество, обладающее высокой степенью полимеризации и превосходными механическими свойствами (Reiniati et al., 2016; Casicedo et al., 2016a). Наличие сетчатой структуры с ультратонкими волокнами способствует хорошим механическим свойствам полимера. Прочность на растяжение бактериальной целлюлозы варьирует между 200-300 МПа, тогда как модуль Юнга достигает более 20 ГПа (Torgbo and Sukuai, 2018).

По сравнению с целлюлозой полипропилен, имеет более низкую прочность при растяжении 30-45 МПа и модуль Юнга 1,0-1,5 ГПа (Ruka et al., 2014). Эти механические свойства являются прямым следствием кристаллической структуры микрофибрилл БЦ (Casicedo et al., 2016b).

Рентгенографические исследования БЦ показывают высокую степень кристалличности (до 90 %) и преобладание низкосимметричной реакционноспособной фазы I α (Шипина и др., 2015). Степень кристалличности

описывает относительное количество кристаллических областей в биополимере. Степень кристалличности – это отношение доли упорядоченных молекул (кристаллических областей) к доли менее упорядоченных молекул (аморфные области) в полимерной цепи. β -1,4-D-глюкановые цепи в целлюлозе связаны посредством образования водородных связей и отвечают за высокую степень кристалличности и уникальные механические свойства целлюлозы (Reiniati et al., 2016).

Волокна целлюлозы удерживаются между собой слабыми Ван-дер-Ваальсовыми силами для формирования пленки целлюлозы. Ее волокна ориентированы случайным образом, что приводит к чередованию кристаллических и аморфных фаз (Fontana et al., 2017).

Сочетание высокой степени кристалличности и высокого содержания воды ответственны за термостабильность БЦ (Qiu and Netravali, 2014). Это ключевая особенность делает возможной стерилизацию материала с помощью простого процесса нагревания, например, автоклавирования. Простой и дешевый способ стерилизации биоматериала является преимуществом в области биомедицины, так как малое количество полимеров можно нагревать выше 100 °C без изменения их свойств (Cacicedo et al., 2016a Qiu and Netravali, 2014).

Трехмерная пористая архитектура очень важна для создания биоматериалов медицинского применения. Микропористость композита может регулироваться путем изменения следующих параметров: источников углерода, объем инокулята, время культивирования и метод сушки целлюлозы. Например, исследование влияния условий ферментации и методов последующей обработки на пористость целлюлозной мембраны показывает, что лиофилизированные мембраны обладают гораздо более высокой пористостью (92 %) по сравнению с высушенными под воздействием горячего воздуха (65 %) (Torgbo and Sukyai, 2018).

Кристаллическое состояние, степень кристалличности и молекулярная масса зависят от среды, на которой получена целлюлоза (Титок и др., 2007).

Например, добавление альгината натрия и маннана к среде прерывает образование водородных связей, тем самым снижая степень кристалличности полимера. БЦ, полученная на среде с альгинатом натрия, имеет меньший размер кристаллитов и низкую степень кристалличности (около 59 %), по сравнению с контрольной средой (78 %). Маннан вызвал снижение интенсивности пика целлюлозы I α , что приводило к снижению отношения целлюлозы I α / I β . (Reiniati et al., 2016). Подобные явления также наблюдаются при получении БЦ на среде с агропромышленными отходами, где могут присутствовать другие полисахариды (Castro et al., 2011) Это свидетельствует о том, что наличие вышеуказанных веществ изменяет процесс кристаллизации целлюлозы и влияет на агрегацию целлюлозных цепей.

Кроме того, ключевую роль в воздействии на пиковую интенсивность целлюлозы I α и размер кристаллитов играют методы культивирования. Перемешивание нарушает процесс кристаллизации, что способствует образованию меньших по размеру кристаллитов. В результате чего, образуется целлюлоза с низкой степенью кристалличности. Показано, что степень кристалличности БЦ составила 84,1 % при выращивании в статических условиях, 86,5 % в культуре с циркулирующим воздухом и 51,2 % при перемешивании (Reiniati et al., 2016).

Более низкая степень кристалличности вызывает ухудшение механических свойств БЦ. Целлюлоза, полученная в статических условиях, имеет предел прочности при растяжении 92 МПа по сравнению с 22 МПа у целлюлозы, полученной во вращающемся дисковом биореакторе (Krystynowicz et al., 2002). Несмотря на то, что динамический метод получения целлюлозы способствует повышению выхода полимера, важно также учитывать влияние условий культивирования на физические свойства (Reiniati et al., 2016).

1.2. Продуценты и процесс биосинтеза бактериальной целлюлозы

1.2.1. Продуценты бактериальной целлюлозы

Выбор микроорганизма штамма продуцента является важным фактором, который следует учитывать при оптимизации производства (Zeng et al., 2014; Fernandes et al., 2020).

Бактериальную целлюлозу производят такие грамотрицательные бактерии как *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* и грамположительные бактерии *Sarcina ventriculi*. Однако наиболее эффективными продуцентами являются бактерии рода *Komagataeibacter*, в частности *K. xylinus*, *K. hansenii*, *K. pasteurianus*, *K. sucrofermentans* (Machado et al., 2016). Было выявлено, что *K. xylinus subsp. sucrofermentans* (BPR2001) производит значительно больше целлюлозы в условиях перемешивания по сравнению с другими изученными штаммами (Reiniati et al., 2016).

В дополнение к различным бактериальным родам БЦ также продуцируется бесклеточными ферментативными системами (Sriplai and Pinitsoontorn, 2021).

K. xylinus является модельным микроорганизмом для изучения синтеза бактериальной целлюлозы, поскольку он производит довольно большое количество биополимера на различных источниках углерода и азота (Moosavi-Nasab and Yousefi, 2011; Carreira et al., 2011; Çakar et al., 2014). Этот продуцент, ранее известный как *Acetobacter xylinum* или *Gluconacetobacter xylinus*, в настоящее время переименован в *Komagataeibacter xylinus* (Kumbhar et al., 2015).

Бактерии *Gluconacetobacter sp.* широко распространены и могут быть выделены из сока цитрусовых, китайского уксуса, яблочного уксуса и таких фруктов, как сливы, яблоки и виноград (Fernandes et al., 2020).

К настоящему времени выделено значительное количество новых штаммов продуцентов БЦ: *K. intermedius* (Lin et al., 2016a), *K. rhaeticus* (Machado et al., 2016), *K. medellinensis* (Castro et al., 2012), *K. xylinus* (Волова и др.; Патент RU 2568605. 11.12.2014. Оpubл. 20.11.2015), *K. sucrofermentans* В-11267 (Ревин и др.; Патент РФ № 2523606. Оpubл. 20.07.2014). Продуценты целлюлозы были выделены из разнообразных источников: из чайного гриба, с поверхности фруктов и овощей, ферментированных продуктов, уксуса, вина и т.д. (Campano et al., 2016; Aydin and Aksoy, 2014).

Это строго аэробные, грамотрицательные неподвижные палочки (рис. 6), которые способны трансформировать глюкозу и другие органические субстраты в целлюлозу. В ходе жизнедеятельности *K. xylinus* окисляет этанол до уксусной кислоты и превращает глюкозу в глюконовую кислоту (Campano et al., 2016; Lin et al., 2013).

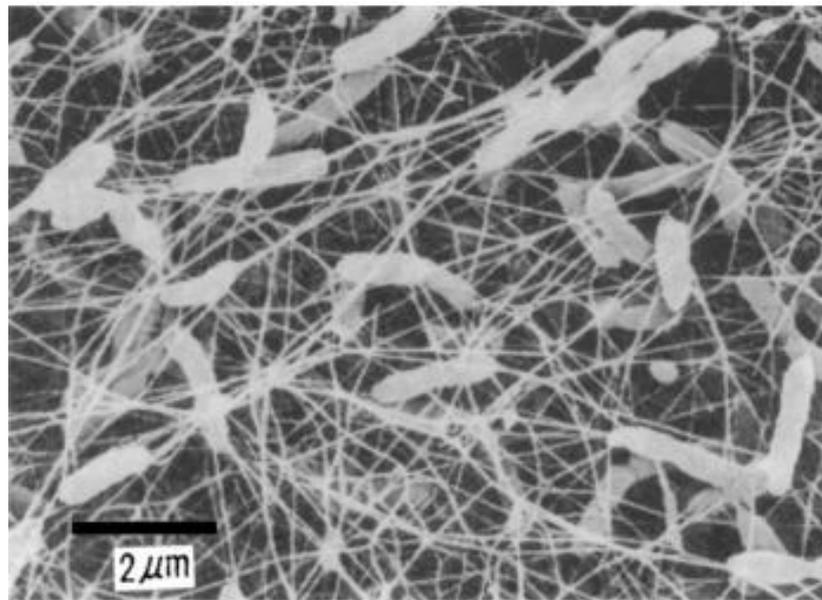


Рисунок 6 – СЭМ изображение бактерий *G. xylinus*, продуцирующих БЦ (Campano et al., 2016)

Escherichia coli и *Salmonella spp.* также способны к биосинтезу целлюлозы, что связано с адгезией и патогенностью данных организмов. Гены

синтеза целлюлозы (*bcsA*, *bcsB*, *bcsZ* и *bcsC*) этих видов аналогичны генам *K. xylinus*, однако данные продуценты пока отличаются меньшей продуктивностью.

Установлено также, что БЦ образуется в ходе жизнедеятельности анаэробного патогенного грамотрицательного организма *Sarcina ventriculi*. В процессе биосинтеза БЦ остается тесно связанной с клеточной мембраной, что помогает защитить бактерию от воздействия кислоты в кишечнике млекопитающих (Lin et al., 2013).

Существует несколько точек зрения на физиологическую роль БЦ в жизненном цикле бактерий. Бактериальные клетки, синтезирующие целлюлозу, могут улучшить доступность кислорода при нахождении на границе раздела фаз жидкость-воздух (Lee et al., 2014; Gromovykh et al., 2017). Другая причина связана с повышением доступности питательных веществ, поскольку частицы органических соединений адсорбируются на полимерной матрице и становятся более доступными для иммобилизованных бактериальных клеток (Gromovykh et al., 2017). БЦ способна защитить бактерии от вредного воздействия УФ-излучения (Reiniati et al., 2016; Cazon and Vázquez, 2021). Опухолеобразующая бактерия *Agrobacterium tumefaciens* при контакте с клетками-хозяевами секретирует фибриллы целлюлозы для прикрепления и проявления вирулентности (Keshk, 2014).

Показано, что бактерия *K. xylinus* дикого типа (Cel⁺) в процессе неоднократных пересевов способна спонтанно мутировать в штаммы, не продуцирующие целлюлозу (Cel⁻). В отличие от дикого типа, Cel⁻ мутанты имеют недостаточное количество UDP-глюкозо-пирофосфарилазы и производят водорастворимый полисахарид, идентифицированный как ацетан (Ishida et al., 2003). Поэтому важное значение имеет выбор штамма и его усовершенствование.

Высокий выход БЦ штаммами *Glucacetobacter sp.* подтверждается многими исследованиями; например, штамм *K. europaeus* SGP37 показал выход

БЦ 26,2 г / л но за 16 дней культивирования на среде HS с добавлением сахара и сладкой лимонной мякоти (Fernandes et al., 2020).

Новый штамм *Komagataeibacter rhaeticus*, выделенный из чайного гриба с зеленым чаем, продемонстрировал высокий потенциал производства БЦ (6,7 г / л за четыре дня) (Machado et al., 2016). Торат и Дастагер представили исследование о штамме *K. rhaeticus* PG2, синтезирующем примерно 4,0 г / л БЦ при использовании стандартной среды HS в течение 15 дней культивирования (Fernandes et al., 2020).

Примечательно, что разница в продуктивности штаммов зависит также от питательных веществ культуральной среды и условий ферментации, что все больше способствует поиску наилучшего состава питательной среды для каждого штамма.

1.2.2 Биохимические основы биосинтеза бактериальной целлюлозы

Биосинтез целлюлозы представляет собой многоступенчатый процесс с участием отдельных ферментов, каталитических комплексов и регуляторных белков (Reiniati et al., 2016). Он существенно зависит от двух основных амфиболических путей: пентозофосфатного цикла (гексозомонофосфатный путь) окисления углеводов и цикла Кребса (цикл трикарбоновых кислот) (Zhong et al., 2013).

Процесс биосинтеза можно подразделить на 4 ключевые стадии:

1. Фосфорилирование глюкозы глюкокиназой. 2. Изомеризация глюкозо-6-фосфата в глюкозо-1-фосфат фосфоглюкомутазой. 3. Синтез UDP-глюкозы из глюкозо-1-фосфата UDP-глюкозо-пирофосфарилазой. 4. Реакция синтеза целлюлозы из UDP-глюкозы под действием целлюлозосинтазы (Lee et al., 2014). Биохимический путь синтеза БЦ представлен на рисунке 7.

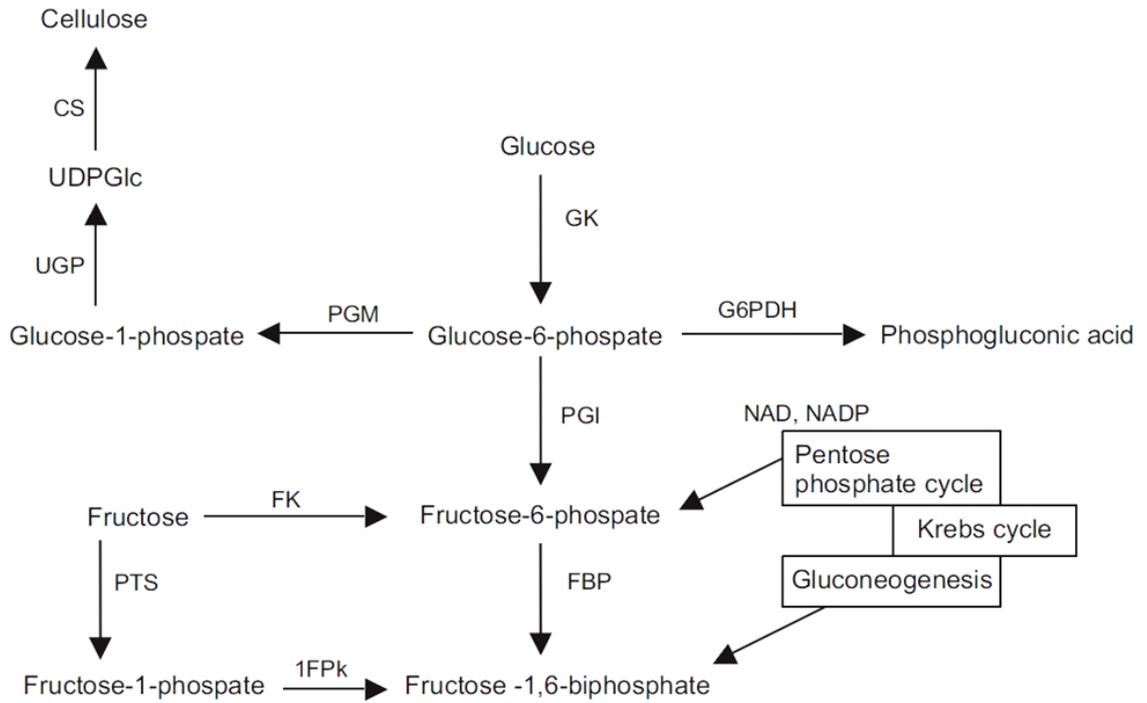


Рисунок 7 – Биохимический путь синтеза БЦ *K. xylinum*.

CS – целлюлозсинтаза, GK – глюкокиназа, FBP – фруктоза – 1,6 бифосфатфосфатаза, FK – фруктокиназа, 1FPK – фруктоза – 1-фосфаткиназа, PGI – фосфоглюкозоизомераза, PGM – фосфоглюкомутаза, UPG - UDP-глюкозо-пирофосфарилаза, G6PDH – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Chawla et al., 2009)

UDP-глюкоза является непосредственным предшественником целлюлозы, а UDP-глюкозо-пирофосфарилаза играет одну из ключевых ролей в ее синтезе. Этот фермент более чем в 100 раз активнее у продуцентов целлюлозы, по сравнению со штаммами, не способными образовывать БЦ. Если в качестве источников углерода используют дисахариды (сахароза, мальтоза), то биосинтез начинается с гидролиза дисахаридов до моносахаров (глюкоза, фруктоза).

Целлюлоза также может быть получена из других источников углерода, таких как 5- или 6-углеродные моносахариды, олигосахариды, крахмал, спирт и органические кислоты (Keshk, 2014).

Синтез целлюлозы может также происходить из эндогенных источников путем глюконеогенеза. У бактерии *K. xylinus* синтез из эндогенных источников начинается с превращения оксалоацетата в пируват под действием фермента пируваткарбоксилазы. Трансформация пирувата в фосфоенолпируват происходит под действием фермента фосфоенолпируваткарбоксикиназы. Синтез целлюлозы для клетки является энергозатратным процессом, потребляющим около 10 % АТФ, генерируемой в процессе метаболизма (Lustri et al., 2015).

Синтез целлюлозы – это сложный процесс, который взаимосвязан с другими метаболическими процессами. Существенное влияние на процесс оказывает образование в ходе жизнедеятельности большого числа побочных продуктов, а именно органических кислот (уксусной и глюконовой). В результате этого процесса не только снижается оптимальное значение pH, но и сахара расходуются не на синтез целевого продукта, а окисляются до кислот за счет ферментов, в частности глюкозодегидрогеназы. Однако участники цикла трикарбоновых кислот и образующиеся в этом процессе молекулы АТФ ингибируют активность этих ферментов (Islam et al., 2017).

Уксуснокислые бактерии имеют большой набор дегидрогеназ. Дегидрогеназы – группа ферментов из класса оксидоредуктаз, катализирующих перенос протонов от субстрата (органических веществ) и пары электронов – к акцептору. В качестве акцептора выступает обычно НАД/НАДФ или флавиновый кофермент, например ФАД или ФМН.

Алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1) – фермент, который осуществляет окисление спиртов, с образованием альдегидов и кетонов. Реакция проходит в присутствии никотинамидадениндинуклеотида (НАД) (Go'mez-Manzo et al., 2010).

Глюкозо-1-дегидрогеназа (КФ 1.1.1.118) – фермент, ответственный за превращение глюкозы в глюконовую кислоту. Помимо глюкозы субстратами для фермента так же могут быть: галактоза, манноза, рибоза, ксилоза и т.д. Для активности фермента необходимо наличие НАДФ⁺, а также ионов металлов

Ca^{2+} , Mg^{2+} и Mn^{2+} . Однако, для повышения уровня биосинтеза целлюлозы необходимо добиться ингибирования этого метаболического пути. Известными ингибиторами активности фермента являются: 2-меркаптоэтанол – соединение, проявляющее антиоксидантную активность; ЭДТА в концентрации 5 % и гуанидин гидрохлорид, а добавление Mg^{2+} в избытке восстанавливает начальную активность (Giardina et al., 1986). Ингибиторами фермента могут также выступать соли тяжелых металлов: Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} и Zn (Adachi et al., 1980).

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (НАДФ^+) (КФ 1.1.1.49) – фермент, приводящий к образованию глюконовой кислоты, субстратом для которого является глюкозо-6-фосфат. Ингибиторами фермента являются широкий ряд веществ. Среди них можно выделить ионы металлов, например Zn^{2+} (Sung and Lee, 2007). Кроме того, витамин Е, ванкомицин, рибулозо-1,5-бифосфат, фосфоенолпируват, никотин и другие (Gumustecin et al., 2005).

1.2.3 Молекулярно-генетические основы биосинтеза целлюлозы

Синтез БЦ происходит на уровне цитоплазматической мембраны, катализируется ферментом целлюлозосинтетазой (Skinner and Cannon, 2000; Brown and Saxena, 2000). Целлюлозосинтаза принадлежит к семейству гликозилтрансфераз и синтезирует линейный β -1,4-глюкан из цитозольной активированной UDP-глюкозы.

Бактериальная целлюлоза синтезируется клетками бактерий благодаря наличию в их геноме целлюлозосинтезирующего оперона. Целлюлозосинтазу кодируют три (*acsAB*, *acsC* и *acsD*) или четыре (*bcsA*, *bcsB*, *bcsC* и *bcsD*) гена в зависимости от микроорганизма (Kawano et al., 2002) (рис. 8).

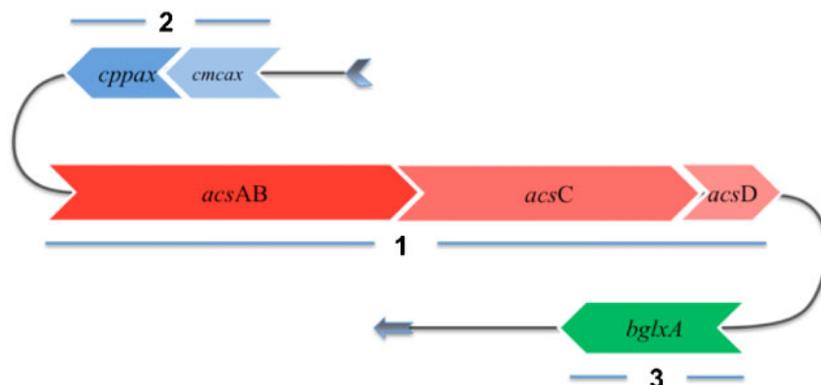


Рисунок 8 – Целлюлозосинтезирующий оперон *A. xylinum* ATCC 53582 (Lee et al., 2014)

Бактериальная целлюлозосинтаза содержит несколько субъединиц (рис. 9) (Du et al., 2016). Первый ген оперона *bcsABCD* кодирует каталитическую субъединицу целлюлозосинтазы, связывающуюся с уридиндифосфоглюкозой. Внутренний мембранно-интегрированный комплекс *BcsA-B* может взаимодействовать с периплазматическим доменом *BcsC*, тем самым формируя канал для синтезируемого полимера (McNamara et al., 2015).

Каталитическая субъединица *BcsA* представляет собой полипептид массой 83 кДа, локализованный в цитоплазматической мембране, который способен переносить глюкозу на растущую цепь глюкана. *BcsA* содержит каталитический домен во внутриклеточной петле и регуляторный домен *PilZ* на своем карбоксильном конце (Du et al., 2016). С этим участком связывается *C-di-GMP*, играя важную роль в качестве вторичного мессенджера и активирует процесс синтеза целлюлозы.

Генетические исследования *K. xylinus* и *A. tumefaciens* показали, что биосинтез БЦ зависит от периплазматической некаталитической *BcsB*-субъединицы (McNamara et al., 2015).

Продукт гена *bcsB* идентифицировали как полипептид массой 93 кДа. *BcsB* является периплазматическим белком. Считается, что он прикреплен к цитоплазматической мембране с помощью одной С-концевой трансмембранной

спирали, которая вместе с предшествующей периплазматической спиралью, плотно взаимодействует с каталитической субъединицей BcsA (Du et al., 2016).

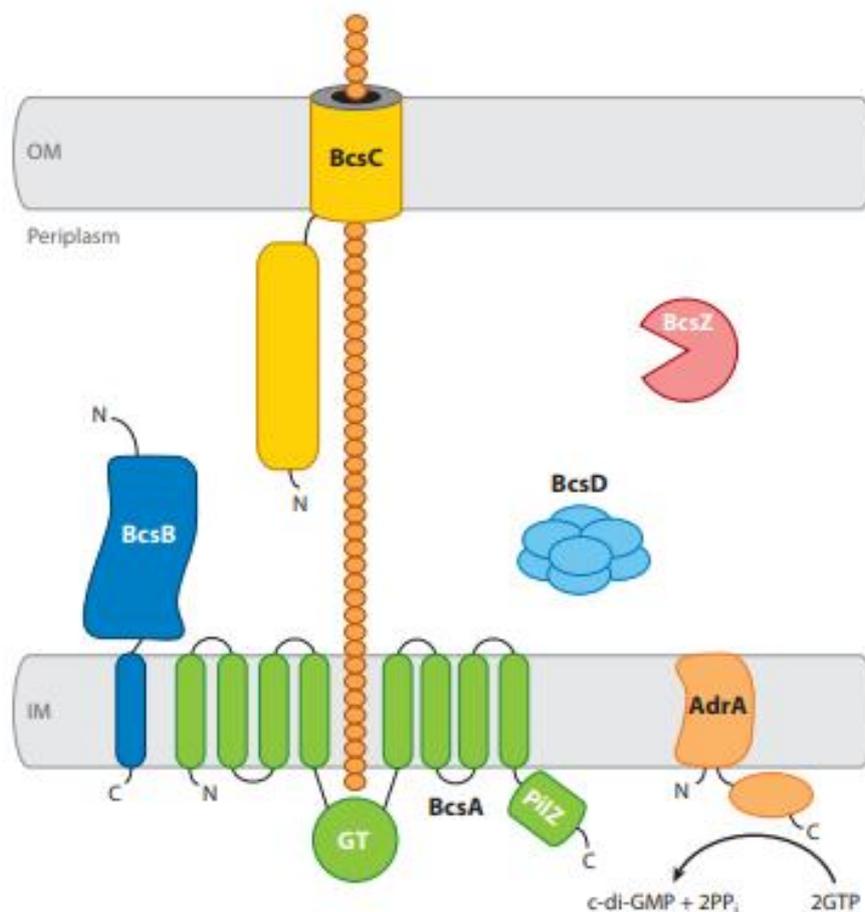


Рисунок 9 – Структура целлюлозосинтазы (McNamara et al., 2015)

Отключение таких генов, как *bcsA*, *bcsB* и *bcsC* полностью останавливает синтез БЦ, тогда как дезактивация гена *bcsD* приводит к снижению синтеза на 40 % (Brown and. Saxena, 2000; Lee et al., 2014).

Хотя функции генов *acsC/bcsC* и *acsD/bcsD* не выяснены полностью, предполагают, что ген *bcsC* ответственен за образование пор в мембране для секреции целлюлозы, поскольку он кодирует белок, подобный белкам, участвующим в образовании мембранных каналов или пор (Buldum et al., 2018).

BcsC представляет собой большой белок, который несет N-концевую расщепляемую сигнальную последовательность для транслокации в периплазме. (McNamara et al., 2015).

Субъединица BcsD встречается главным образом в микроорганизмах, образующих целлюлозу и ее биологическая функция, а также ее клеточная локализация до конца неясны (Buldum et al., 2018).

В клетках *K. hansenii*, лишенных bcsD, продуцируются целлюлоза, но с пониженным выходом, модифицированной морфологией и пониженной кристалличностью, что указывает на роль bcsD в кристаллизации целлюлозы. BcsD является растворимым белком, присутствующим в периплазматическом пространстве, и его кристаллическая структура вероятно представляет собой гомомерный октамер, который образует 2x4-кольцевую структуру с очевидной способностью удерживать четыре цепи β -глюкана (Du et al., 2016).

Верхняя область оперона (2) имеет два гена: *сmsA*х и *сsрA*х (рис. 9). *сmsA*х кодирует эндо- β -1,4-глюканазы, имеющие целлюлозогидролитическую активность, что увеличивает синтез целлюлозы. Однако окончательно функции *сmsA*х не выяснены (Kawano et al., 2002). Основываясь на данных электронной микроскопии, Кавано и др. предположили, что *сmsA*х в *K. xylinum* может влиять на сборку микрофибрилл целлюлозы. Согласно их данным, фибриллы целлюлозы у *сmsA*х-суперпродуцентов, находятся в более диспергированном состоянии, чем целлюлоза, полученная от диких штаммов (Kawano et al., 2002).

*ссрA*х также необходим для синтеза целлюлозы. Было высказано предположение, что функции *ссрA*х могут быть связаны с внеклеточным переносом целлюлозных цепей из участков полимеризации в клеточной мембране и кристаллизацией целлюлозных фибрилл (Buldum et al., 2018). Предполагается, что *ссрA*х может функционировать в качестве медиатора белок-белковых взаимодействий (Sunagawa et al., 2013).

Нижняя (3) область содержит ген *bglxA*, который кодирует β -глюкозидазу, гидролизующую более трех единиц β -1-4- глюкозы.

C-di-GMP также играет важную роль в синтезе БЦ – это аллостерический активатор целлюлозосинтазы. В его отсутствии целлюлозосинтаза остается неактивной или проявляет низкую ферментативную активность (Lee et al., 2014).

C-di-GMP участвует во многих бактериальных процессах, включая подвижность клеток, образование биопленки и деление клеток. Однако механизм, с помощью которого c-di-GMP активирует bcsA до конца не выяснен. Первоначально, исследователи считали bcsB является c-di-GMP-связывающей субъединицей, но последующие анализы показали, что каталитическая субъединица bcsA содержит C-терминальный цитозольный домен, называемый PilZ, который отвечает за связывание с c-di-GMP.

Результаты исследования привели к созданию механистической модели, в которой активный сайт bcsA блокирован и недоступен для связывания с UDP-глюкозой в отсутствие c-di-GMP. Таким образом, предположительно имеет место аллостерическая активация посредством связывания c-di-GMP. При этом происходит снятие блокировки, тем самым позволяя bcsA функционировать с максимальной ферментативной активностью. Цитозольная концентрация c-di-GMP контролируется большим семейством дигуанилатциклаз и фосфодиэстераз (McNamara et al., 2015).

Кроме того, важное значение для активации целлюлозосинтазы оказывают ионы металлов, в частности Ca, Mg и Zn (Jacob-Wilk et al., 2006).

Кроме того, известно, что целлодекстрины стимулируют синтез целлюлозы, поскольку синтез зависит от присутствия растворимого праймера (McNamara et al., 2015).

Согласно ряду литературных источников, активность фермента целлюлозосинтазы, выделенной из *K. xylinus* наблюдается при pH 6,5-8,3. При pH 6,5 активность достигает 13% от максимальной активности, а при pH 7,5 – 39 % от максимальной активности. При pH 8,3 наблюдается максимум активности. Фермент не тестировался в более щелочных условиях из-за нестабильности UDP-глюкозы (McNamara et al., 2015).

1.2.4 Формирование нановолокон БЦ в процессе биосинтеза

Биосинтез целлюлозы можно разделить на следующие два этапа: первый этап включает полимеризацию β -1-4 глюконовых цепей целлюлозы, а второй этап включает в себя сборку цепей и кристаллизацию целлюлозы (Reiniati et al., 2016).

БЦ состоит из элементарных фибрилл, которые, объединяясь, образуют микрофибриллу целлюлозы. Микрофибриллы в свою очередь переплетаются, формируя 3D наносеть, которая образует гель-пленку целлюлозы (Santos et al., 2017).

В случае бактериальной целлюлозы в культуральную среду выделяются приблизительно 16 параллельных целлюлозных цепей из каждого синтетического участка (называемого терминальной комплексной субъединицей, в виде субэлементарных фибрилл шириной около 1,5 нм (Suzuki et al., 2012). Они образуют более крупные объединения с поперечным сечением до 3,5-4 нм – микрофибриллы, которые объединяются в нановолокна – 40-60 нм (Keshk, 2014; Титок и др., 2007) (рис.10).

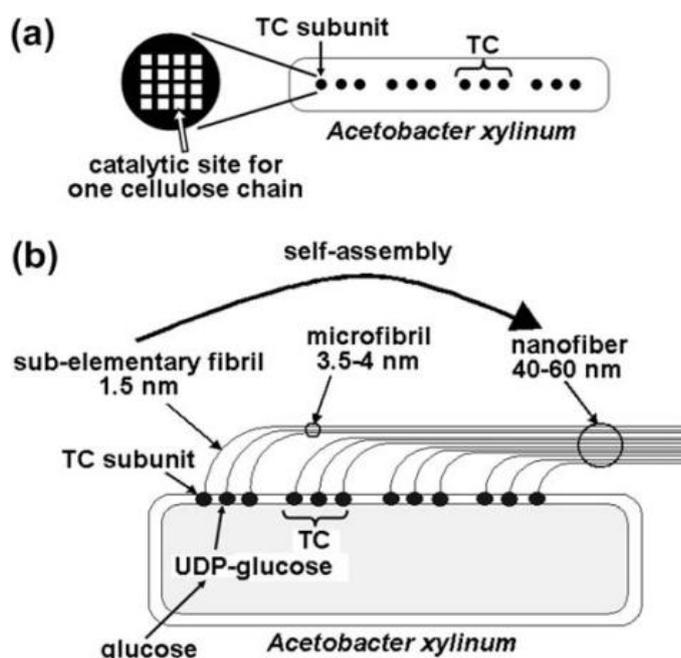


Рисунок 10 – Схематическое изображение формирования нанофибрилл БЦ у *K. xylinum* (Wee et al., 2011)

Наконец, волокна связываются в трехмерные сети, формируя целлюлозные гидрогели с содержанием воды более 99 % (Wee et al., 2011; Sconti, 2010).

Термин микрофибриллы был предложен для обозначения тончайших структур, видимых в области электронного микроскопа (Keshk, 2014).

Кристаллизация целлюлозы в I α и I β алломорфы происходит во время агрегации субэлементарных фибрилл (Keshk, 2014; Suzuki et al., 2012).

1.3 Влияние условий культивирования продуцента на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы

1.3.1 Влияние состава питательной среды на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы

Выход продукта зависит от штамма продуцента, состава питательной среды и условий культивирования (температура, рН, количество кислорода, способы культивирования).

Оптимизация питательной среды является важным фактором, стимулирующим образование целлюлозы (Chawla et al., 2009; Campano et al., 2016). От этого зависит не только продуктивность процесса, но и молекулярная и микроскопическая структура целлюлозы (Zhong et al., 2013).

Наиболее обильное образование экзополисахарида происходит, когда бактерии максимально снабжаются источником углерода и минимально источником азота. В ряде случаев для повышения роста клеток используются аминокислоты и витамины (Ramana et al., 2000).

1.3.1.1 Источники углерода

Выбор источника углерода и его количество являются одним из основных факторов, влияющих на выход БЦ (Lee et al., 2014).

Бактерии рода *Komagataeibacter* могут потреблять различные источники углерода: сахара, спирты, глицерин, органические кислоты и другие (Wu and

Li, 2012). Как правило, в качестве источников углерода используются глюкоза и сахароза, хотя иногда используются и другие углеводы (фруктоза, мальтоза, ксилоза, крахмал, глицерин и т.д.).

Получение бактериальной целлюлозы традиционно осуществляется с использованием питательной среды HS, созданной Хестрином и Шраммом в 1954 году. Среда HS состоит из глюкозы, пептона, дрожжевого экстракта, натрия фосфорнокислого двузамещенного, лимонной кислоты с конечным pH 6,0 (Cacicedo et al., 2016b). Однако стандартная среда является дорогостоящей, что затрудняет широкомасштабное использование и получение БЦ (Kiziltas et al., 2015).

Было предложено много модификаций состава среды HS, таких как использование моно- и дисахаридов, например, фруктозы, сахарозы, мальтозы, целлобиозы, ксилозы, галактозы и других (Pacheco et al., 2017).

Глюкоза как единственный источник углерода используется не только как источник энергии, но и как предшественник целлюлозы. В ходе жизнедеятельности она превращается в кето-глюконовые кислоты. pH культуральной среды резко уменьшается с 6,0 до 3,5 в течение первых двух дней, что значительно снижает образование целлюлозы. (Campano et al., 2016)

Выход целлюлозы на среде с сахарозой в два раза меньше, чем на среде с глюкозой. Возможно, это связано с низкой активностью сахаразы у *K. xylinum* и неспособностью бактериальной клетки транспортировать сахарозу через клеточную мембрану, что означает необходимость гидролиза сахарозы в периплазме до глюкозы и фруктозы (Zhong et al., 2013).

Эффективность биотехнологического процесса может быть оценена по степени конверсии субстрата: необходимо выбрать оптимальную начальную концентрацию субстрата и подобрать такие условия, чтобы конверсия субстрата была полной, а выход целевого продукта максимальным (Гладышева, 2015a). Образование целлюлозы также зависит от начальной концентрации сахара в среде. При избытке сахаров происходит повышенное образование глюконовой кислоты – побочного продукта. Это приводит к снижению

активности процессов биосинтеза целлюлозы (Reiniati et al., 2016). Son с соавторами сообщили о том, что наибольший выход БЦ был получен при концентрации глюкозы в среде в пределах от 1,5 % до 2 % (Son et al., 2003).

1.3.1.2 Источники азота

На образование БЦ также оказывают влияние источники азота. В качестве источников азотного питания могут быть использованы органические и неорганические вещества. Дрожжевой экстракт и пептон являются наиболее часто используемыми источниками азота и факторов роста в процессе биосинтеза целлюлозы. При этом наибольший выход, согласно исследованию Campano, наблюдался при использовании в качестве источника азота пептона, а также смеси пептона и дрожжевого экстракта (Campano et al., 2016).

Jung с соавторами изучали различные источники азота для оценки влияния на выход БЦ. Они использовали дрожжевой экстракт, полипептон, кукурузный экстракт и другие источники азота в концентрациях 0,5 % – 2 %. Наибольший выход наблюдался на среде с дрожжевым экстрактом, а также с полипептоном и кукурузным экстрактом (Jung et al., 2010).

Одним из рекомендуемых источников азота является кукурузный экстракт, который не только увеличивает выход БЦ, но и является дешевым и доступным сырьем (Campano et al., 2016). Он представляет собой жидкий побочный продукт обработки кукурузы мокрого помола, который богат аминокислотами, минералами и витаминами (Reiniati et al., 2016).

При культивировании *K. xylinus* с гидролизатом казеина выход бактериальной целлюлозы составил 5 г/л, а при дополнительном внесении пептона – 4,8 г/л. Добавление дополнительного количества азотсодержащего сырья способствует увеличению биомассы бактерий, но снижает производство целлюлозы (Ramana et al., 2000).

1.3.1.3 Индукторы биосинтеза бактериальной целлюлозы

Другая стратегия повышения уровня биосинтеза БЦ основана на добавлении индукторов для активации энергетического метаболизма

микроорганизма или уменьшения образования побочных продуктов (Cacicedo et al., 2016b).

Добавление различных веществ в культуральную среду, таких как этанол, (Son et al., 2001; Park et al., 2003, Park et al., 2004), полиакриламид-акриловая кислота (Joseph et al., 2003), КМЦ (Cheng et al., 2009), альгинат натрия (Zhou et al., 2007), агар (Bae and Shoda, 2005) увеличивает выход БЦ.

Добавление водорастворимых полисахаридов увеличивает вязкость среды и облегчает дисперсию гранул БЦ, тем самым увеличивая количество свободных клеток, что может ускорять потребление сахара и образование полимера (Ishida et al., 2003). При добавлении микрокристаллической целлюлозы Avicel в питательную среду происходит улучшение биосинтеза на 116 % по сравнению с контролем (Lin, 2016). Добавление КМЦ в культуральную среду увеличивало выход с 1,3 г/л до 8,2 г/л. При этом наблюдалось уменьшение степени кристалличности БЦ и размера кристаллитов (Islam et al., 2017).

Органические кислоты положительно влияют на биосинтез БЦ. Добавление уксусной кислоты в концентрации 20 г/л значительно увеличивало выход полисахарида: от 0,6 г/л до 3,8 г/л (Islam et al., 2017). Установлено, что органические кислоты могут служить дополнительным источником углерода. Таким образом, промежуточные соединения, например, кислоты из цикла трикарбоновых кислот могут выступать ускорителями процесса биосинтеза целлюлозы (Dudman, 1959). Кроме того, повышенная концентрация внутриклеточного АТФ в результате окисления лактата может дополнительно улучшить потребление фруктозы. Лактат стимулирует рост клеток на раннем этапе развития культуры. Предполагается, что он действует как ускоритель цикла Кребса, в результате чего повышается выход целлюлозы и рост клеток. (Islam et al., 2017; Matsuoka et al., 1996).

Показано положительное влияние на биосинтез БЦ антиоксидантов, например, лигносульфоната (Keshk and Sameshima, 2006a; Keshk and Sameshima, 2006b). Выход БЦ увеличился на 57 % в присутствии 1 %

лигносульфоната. Увеличение уровня образования БЦ связано с ингибированием образования глюконовой кислоты в присутствии антиоксидантных полифенольных соединений, содержащихся в лигносульфонате. Показано, что БЦ, синтезируемая в присутствии лигносульфоната, обладала высокой степенью кристалличности и высоким содержанием I α целлюлозы.

Известны сведения о положительном влиянии аскорбиновой кислоты на образование БЦ и на ее качественные характеристики. Продуктивность была увеличена у всех исследуемых штаммов в присутствии 0,5 % витамина С и достигла 0,47 г / 30 мл по сравнению с 0,25 г / 30 мл без витамина С. Повышение продуктивности, вероятно, связано с уменьшением концентрации глюконовой кислоты, что обусловлено антиоксидантными свойствами витамина С (Keshk, 2014b).

Хорошо известен стимулирующий эффект этанола на образование целлюлозы (Molina-Ramírez et al., 2018). Этанол не может служить единственным источником углерода, но при добавлении к среде, содержащей подходящие субстраты, происходит увеличение биосинтеза продукта. Этанол может способствовать подавлению образования мутантов, не продуцирующих целлюлозу (Park et al., 2004). Кроме того, считается, что этанол приводит к образованию восстановленных форм никотинамидадениндинуклеотида, что снижает окислительно-восстановительный потенциал до уровней, необходимых для синтеза продукта. Было также высказано предположение, что этанол функционирует как источник энергии для образования АТФ на ранней стадии ферментации в гексозомонофосфатном пути (Zhong et al., 2013).

В ряде работ также исследовалось влияние глицерина на образование БЦ. Так, при росте на среде с 3,0 % глицерина в качестве источника углерода образуется в 3,8 раз больше целлюлозы, чем на той же среде с глюкозой (Jung et al., 2010). Его использование может быть очень привлекательным с экономической точки, учитывая то, что глицерин является основным отходом в производстве биодизельного топлива.

Высокая стоимость питательных сред требует поиска нового дешевого источника питательных веществ. Данным источником могут являться различные отходы биотехнологических производств.

1.3.1.4 Получение бактериальной целлюлозы на отходах биотехнологических производств

Несмотря на все преимущества БЦ, ее широкое использование ограничено высокой стоимостью (Islam et al., 2017). Известно, что около 30 % от общей стоимости процесса составляет стоимость культуральной среды. Таким образом, одним из важных аспектов в процессе ферментации является поиск новых экономически эффективных питательных сред для получения высокого выхода бактериальной целлюлозы.

С экономической точки зрения переработка отходов является довольно рентабельной (Çakar et al., 2014). Себестоимость готовых продуктов должна быть существенно ниже, чем при использовании традиционных источников питательных веществ. Вследствие низкой цены и довольно высокого содержания питательных веществ, отходы промышленности являются ценным сырьем для производства питательных сред.

Способность продуцентов БЦ усваивать различные источники углерода и азота, включая сельскохозяйственные (Rani et al., 2011; Carreira et al., 2011; Castro et al., 2011) и пищевые отходы (Moon et al., 2006; Choi et al., 2009), обеспечивает возможность снизить издержки производства и способствует улучшению экологической обстановки. Поскольку многие отходы не находят рационального применения в промышленности, и требуют переработки.

Многочисленные исследования направлены на возможность использования различных питательных сред из агропромышленных отходов с целью получения выгодных питательных сред, способствующих снижению себестоимости производства БЦ (Azeredo et al., 2019; Wang, Tavakoli, and Tang, 2019).

Примеры культивирования продуцентов БЦ на различных отходах представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Различные субстраты, используемые для производства БЦ

Субстрат	Выход БЦ	Ссылка
Свекловичная меласса	Увеличение на 31% по сравнению с глюкозной средой	(Keshk S. and Sameshima, 2006b)
Меласса	1,6 г/л	(Çakar F. et al., 2014)
Тростниковая меласса	Увеличивается на 106 %	(Hungund and Gupta, 2010)
Тростниковая меласса	Увеличивается на 190-225 %	(Premjet <i>et al.</i> , 2007)
Апельсиновый и ананасовый сок	Выход увеличивается на 31 %	(Hungund and Gupta, 2010)
Ананасовый сок и кожура	Сопоставимы по продуктивности со средой HS	(Castro <i>et al.</i> , 2012)
Кислотный гидролизат кукурузных початков	4 г/л	(Huang <i>et al.</i> , 2014)
Сырой глицерин и гидролизат жмыха подсолнечника	13,3 г/л	(Tsouko <i>et al.</i> , 2015)
Финиковый сироп	В 3 раза выше, чем на среде с сахарозой	(Moosavi-Nasab and Yousefi, 2011)
Финиковый сироп	1,2 г/л	(Mohammadkazemi <i>et al.</i> , 2015)
Мучные гидролизаты (из отходов кондитерской промышленности)	13 г/л	(Tsouko <i>et al.</i> , 2015)
Мука из луковицы растения аморфофаллус коньяк	В 3 раза выше, чем на среде с глюкозой	(Hong and Qiu, 2008)
Лигноцеллюлоза биопереработки сточных вод	20 г/л	(Cavka <i>et al.</i> , 2013)
Кленовый сироп	Сопоставимо с фруктозной средой	(Zeng <i>et al.</i> , 2011)
Гидролизат пшеничной соломы	8,31 г/л	(Chen <i>et al.</i> , 2013)

Поскольку меласса представляет собой побочный продукт конечной стадии кристаллизации в процессе производства сахара, она является одним из наиболее экономичных источников углерода. Меласса образуется на заводах в большом количестве. Из тонны сахарной свеклы получают около 35 кг сахара, 540 кг сырого жома и 40 кг мелассы (Çakar *et al.*, 2014).

Меласса на 50 % состоит из сахаров, из которых 33 % – 35 % составляет сахароза, 21 % – 22 % – инвертный сахар, а также небольшое количество рафинозы. Также в мелассе содержатся аминокислоты, органические кислоты и их соли, бетаин, минеральные вещества и витамины (Vohra *et al.*, 2004). Кроме

того, она богата белками и органическим азотом, содержит значительное количество серы в виде сульфидов и диоксидов. Наличие этих компонентов в питательной среде приводит к увеличению скорости роста бактерий. Именно поэтому меласса широко используется в качестве субстрата, например, при производстве молочной кислоты, этанола, ксантана и т.д. (Bae and Shoda, 2004).

Поскольку меласса содержит большое количество посторонних веществ: ионы металлов, красящие компоненты, взвешенные частицы, которые могут действовать как ингибиторы роста клеток, меласса для получения целлюлозы может быть подвергнута различным обработкам, в частности термокислотной обработке (Bae and Shoda, 2004; Çakar et al., 2014). При этом увеличение выхода может быть связано с удалением тяжелых металлов, а также с денатурацией ряда белков. Кроме того, сахароза, содержащаяся в мелассе гидролизуется до фруктозно-глюкозной смеси, которая лучше усваивается бактериями.

Из литературных данных известно, что высокие начальные концентрации мелассы продлевают лаг-фазу и замедляют рост клеток. Однако также известно, что увеличение концентрации сахара от 40 г/л до 70 г/л приводит к увеличению выхода полисахарида (Bae and Shoda, 2004).

В процессе производства спирта образуется значительное количество отходов производства – барды, которая при сбросе в стоки вызывает загрязнение окружающей среды.

Послеспиртовая барда – быстрозакисающая суспензия, содержащая практически все питательные вещества, присущие исходному сырью: протеины, жиры, клетчатку, безазотистые экстрактивные вещества, включая несброженные сахара и крахмал. Состав барды представлен в таблице 3.

Наиболее рациональным способом утилизации послеспиртовой барды, при котором она превращается в продукт с высокой питательной ценностью, транспортабельный и сохраняющийся в течение нескольких лет, является сушка. Однако, этот процесс требует высоких затрат энергии, поскольку барда содержит большое количество влаги. Вопрос переработки барды выглядит не менее важным и экономически привлекательным, чем само производство

спирта. Являясь отходом спиртового производства, барда богата источниками углерода, а также органическими кислотами. Таким образом, многие исследователи проводят ферментацию с использованием барды в качестве среды для получения новых различных продуктов, например, этанола, ферментов, биомассы микроорганизмов и т.д.

Таблица 3 – Химический состав послеспиртовой барды различного происхождения, % в с.в.

Показатели	Ячменная барда	Кукурузная барда	Ячменная и зерновая в среднем
Сухое вещество	89,0	89,3	92,4
Сырой протеин	24,5	27,1	26,1
Сырой жир	5,3	12,4	5,1
Сырая клетчатка	12,1	5,3	15,1

Так как введение в питательную среду органических кислот повышает выход целлюлозы, то барда, богатая ими, является хорошей средой для производства целлюлозы. Из литературных данных известно, что послеспиртовая барда от производства рисового вина может быть использована для производства БЦ (Wu and Liu, 2012). Она использовалась в качестве добавки к стандартной среде NS. Рисовая барда содержит в своем составе редуцирующие сахара, источники азота, аминокислоты, а также органические кислоты, такие как янтарная, глюконовая, уксусная, лимонная и яблочная кислота. Производство целлюлозы было увеличено в 2,5 раза при культивировании в течение 7 дней. Наибольшее количество БЦ – 6,31 г/л образовывалось при 50 % разбавлении среды NS бардой (Wu and Liu, 2012).

В таблице 4 показаны альтернативные источники углерода, которые недавно использовались для оптимизации производства БЦ, а также сравнение продуктивности штаммов (Fernandes, et al., 2020).

Таблица 4 – Продуктивность штаммов на средах с отходами производств

Источник углерода	Штамм продуцент	Условия культивирования	Выход, г/л	Продуктивность (г / л в сут.)	Ссылка
Картофельная кожура	<i>K. xylinus</i> ATCC 10245	T 35 °C; pH 9,0; 6 дней статического культивирования	4,70	0,78	Abdelraof, Hasanin and El-Saied
Барда	<i>K. xylinus</i> PTCC 1734	T 30 °C; 10 дней статического культивирования	1,80	0,18	Barshan et al.
Остаточный сырой глицерин	<i>K. xylinus</i> KCCM 41431	T 30 °C; 7 дней статического культивирования	6,95	0,99	Jin et al.
Свекловичная меласса	<i>K. xylinus</i> PTCC 1734	T 28 °C; pH 5,5; 14 дней статического культивирования	4,56	0,32	Salari et al.
Подсырная сыворотка			3,55	0,25	
Меласса и кукурузный экстракт	<i>K. xylinus</i> BPR 2001	T 30 °C; 9 дней статического культивирования	7,50	0,83	Rodrigues et al.
Послеспиртовая барда	<i>K. sucrofermentans</i> B-11267	T 28 °C; pH 3,95 и 4,96; 3 дня динамического культивирования	6,19	2,06	Revin et al.
Подсырная сыворотка			5,45	1,81	
Рапсовое масло	<i>K. xylinus</i> DSM 46604	T 30 °C; 7 дней статического культивирования	7,00	1,00	Żywicka et al.
Сок рамбутана	<i>K. xylinum</i> TISTR 107	T 30 °C; 5 дней статического культивирования	5,89	1,18	Suwannarat, Ninlanon and Suwannarat
Тростниковая меласса	<i>K. intermedius</i> SNT-1	T 30 °C; 10 дней статического культивирования	12,60	1,26	Tyagi and Suresh

На кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии также проводились работы по использованию отходов для образования бактериальной целлюлозы. Культуру штамма *K. sucrofermentans* Н-110 выращивают в течение 3 суток в динамических условиях в шейкере-инкубаторе при использовании нативной творожной молочной сыворотки с pH – 4,9. Выход целлюлозы составил 5,5 г/л на третьи сутки культивирования (Патент РФ № 2536257).

При культивировании этого же штамма на послеспиртовой зерновой барде с рН 3,9–4,4 на третьи сутки культивирования выход составляет 6,2 г/л (Патент РФ № 2536973).

Таким образом, использование отходов биотехнологических производств не только позволяет снизить себестоимость готового продукта и решить экологические проблемы, но и во многих случаях существенно увеличить выход полимера.

1.3.2 Влияние физико-химических факторов на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы

Микроорганизмы быстро реагируют на изменения условий окружающей среды. Соответственно, рост клеток, а также синтез целлюлозы существенно будут зависеть от этих факторов. Основные параметры окружающей среды: рН, температура, концентрация растворенного кислорода, скорость перемешивания (Chawla et al., 2009).

1.3.2.1 Влияние значения рН на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы

Оптимальное значение рН для роста клеток и образования БЦ зависит от штамма продуцента и обычно находится в пределах от 4,0 до 7,0. Начальное значение рН 4,0 и 5,0 приводит к высокому уровню образования БЦ и роста бактерий (Yassine et al., 2016, Coban and Biyik, 2011). И, как уже было отмечено, его необходимо поддерживать, так как в процессе жизнедеятельности бактерий образуются органические кислоты, в частности глюконовая кислота, снижающая рН (Lee et al., 2014).

Однако имеются сведения, что, бактерии могут самостоятельно регулировать значение рН. Водородный показатель естественным образом повышался от 4,0 до 5,0 за счет потребления клетками глюконовой кислоты. В данном исследовании выход БЦ составил 5,89 г/л, что в 1,5 раза выше, чем выход БЦ при доведении значения рН до постоянного 5,0 (Reiniati et al., 2016).

1.3.2.2. Влияние температуры на биосинтез бактериальной целлюлозы

Температура является важным параметром. Она влияет и на рост микроорганизмов, и на синтез БЦ. В большинстве экспериментов максимальный выход целлюлозы достигается при температуре 28 °С – 30 °С. В одном из экспериментов исследовалось образование БЦ при различных температурах, в пределах от 20 °С до 40 °С в динамических условиях. Оптимальной оказалась температура 30 °С (Son et al., 2001). Температурный минимум для продуцентов составляет 6 °С – 10 °С, температурный максимум – 35 °С – 45 °С (Coban and Biyik, 2011).

1.3.2.3 Влияние аэрации и перемешивания на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы

Многочисленными исследованиями установлено, что кислород является важным фактором для роста клеток и синтеза БЦ различными продуцентами, так как они являются облигатными аэробами (Фан Ми Хань и Громовых, 2011).

Если подобрать среды с различным начальным количеством растворенного кислорода, то можно определить условия индукции биосинтеза полимера. Результаты исследований показали: в течение первых часов культивирования количество растворенного кислорода во всех питательных средах потребляется активно и появление пленок бактериальной целлюлозы инициируется уже через 24 часа на тех питательных средах, в которых начальное количество кислорода было более 2,5 мг/л (Фан Ми Хань и Громовых, 2011).

Высокая концентрация растворенного кислорода в среде повышает концентрацию глюконовой кислоты, которая снижает выход БЦ (Reiniati et al., 2016).

Hwang с соавторами исследовали влияние концентрации растворенного кислорода от 2 % до 15 % от насыщения в культуре с подпиткой и сообщили, что 10 % насыщение среды растворенным кислородом вызвало наибольший

выход БЦ – 15,3 г/л по сравнению с 10,2 г/л с концентрацией растворенного кислорода 2 % (Hwang et al., 1999).

В другом исследовании, концентрация растворенного кислорода в 10-литровом ферментере с двумя турбинами для автоматического изменения скорости перемешивания варьировалось от 20 % до 40 % от концентрации насыщения. Оптимальная концентрация растворенного кислорода для производства БЦ составила 30 %, что значительно выше, чем у Hwang, что вероятно связано с наличием агара в среде (Bae and Shoda, 2005).

1.3.2.4 Влияние способа культивирования на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы

Для биосинтеза целлюлозы используются два основных метода – статический и динамический. Выбор метода зависит от ряда факторов: длительности процесса, применения конечного продукта, экономической целесообразности. При статическом способе культивирования на границе раздела фаз воздух-жидкость образуется гель-пленка целлюлозы, которая со временем увеличивается в толщину (рис. 11). В динамических условиях целлюлоза продуцируется в виде агломератов различной формы и размеров (Atwa et al., 2015).

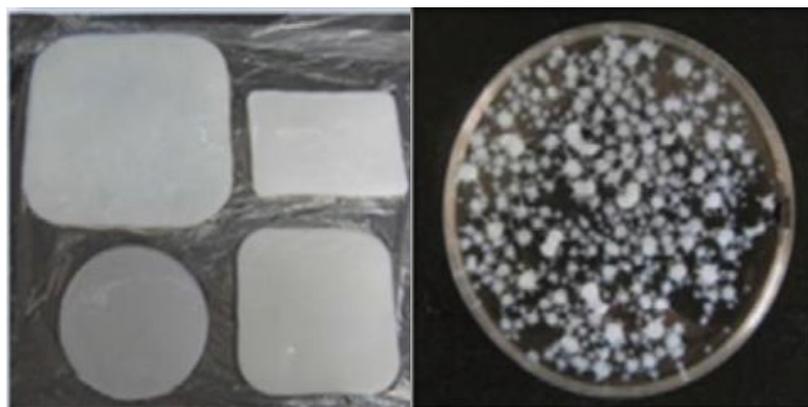


Рисунок 11 – Бактериальная целлюлоза, полученная в статических и динамических условиях (Islam et al., 2017)

Мнения по поводу того, какой из способов культивирования более эффективный расходятся. В ряде работ показано, что в статических условиях культивирования образование целлюлозы происходит более эффективно (Krystynowicz et al., 2002). Другие исследователи утверждают, что динамические условия способствуют большему выходу БЦ, что может быть связано с увеличением площади поверхности ферментации и усилением аэрации клеток (Pa'е et al., 2011). Однако сообщалось о мутации бактерий, продуцирующих целлюлозу, особенно при динамических условиях (Reiniati et al., 2016).

Традиционно статическое культивирование является основным методом производства (Çakar et al., 2014). Оно довольно простое и не требует больших энергозатрат на перемешивание. Тем не менее, в настоящее время производительность этого способа не удовлетворяет потребностям промышленности (Lin et al., 2016). Статический метод считается не пригодным для крупномасштабного производства, так как это требует длительного времени и больших помещений для культивирования (Czaja et al., 2006). Следовательно, необходимо разрабатывать новые высокопроизводительные подходы для получения БЦ (Lin et al., 2016b).

Именно динамический способ культивирования подходит для промышленного производства бактериальной целлюлозы и способствует коммерческому применению БЦ в различных областях промышленности.

Несмотря на то, что динамический способ получения целлюлозы способствует повышению выхода полимера, важно учитывать влияние условий культивирования на структуру и физические свойства БЦ (Reiniati et al., 2016). Рядом авторов показано, что при динамическом культивировании полимер имеет более низкую степень кристалличности, полимеризации и механическую прочность по сравнению с пленками (Torgbo and Sukuai, 2018). Так Czaja и др. показали, что БЦ, полученная в динамических условиях, имеет более низкую степень полимеризации и степень кристалличности по сравнению с БЦ, полученной статическим культивированием. По мнению исследователей,

перемешивание нарушает процесс кристаллизации, что способствует образованию меньших по размеру кристаллитов и приводит к образованию целлюлозы с более низкой степенью кристалличности (Czaja et al., 2004).

Целлюлоза, полученная в динамических условиях, характеризуется гораздо более неупорядоченной и более плотной структурой с изогнутыми и перекрывающимися целлюлозными лентами (Krystynowicz et al., 2002). 13С ЯМР анализ показал, что содержание целлюлозы Ia, полученной в динамических условиях, ниже, чем у целлюлозы, произведенной в статических условиях (Keshk, 2014).

Согласно данным Choi с соавторами, относительная молекулярная масса БЦ, образуемой в статических условиях максимальна и составляет 3 265 000, в биореакторе на 10 л – 2 822 000, в биореакторе на 50 л – 2 722 000 (Choi et al., 2009).

1.3.2.5 Влияние типа биореактора на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы

Для производства БЦ изучены различные методы культивирования такие как периодическое культивирование, культивирование с подпиткой, непрерывная ферментация, при перемешивании или в статических условиях. При этом физические характеристики, свойства и морфология целлюлозы будут различными в каждом конкретном случае. Способ ферментации используется в зависимости от штамма и типа необходимой целлюлозы, так как надмолекулярная структура может быть изменена с помощью изменения способа получения (Cacicedo et al., 2016b, Islam et al., 2017).

Конструкция реактора является ключевым фактором в производстве полисахарида, поскольку выход и условия культивирования в конечном итоге определяют конечную стоимость продукта (Behera and Ray, 2016).

Биореакторы с механическим перемешиванием обеспечивают хороший контроль над средой культивирования, позволяя вести измерения в режиме реального времени и контролировать pH, температуру, перемешивание и уровень растворенного кислорода (Reiniati et al., 2016). Однако в таком

биореакторе целлюлоза прикрепляется к металлическим конструкциям, что затрудняет сбор продукта и очистку реакторов (Zhijun and Yue, 2014; Cheng et al., 2011).

Для получения БЦ также предлагаются такие типы биореакторов как модифицированная барботажная колонна (Song et al., 2009), эрлифтный реактор (Cheng et al., 2002), модифицированный эрлифтный биореактор (Sani and Dahman, 2009), роторный биореактор (Campano et al., 2016), аэрозольный биореактор, мембранный биореактор (Zhijun and Yue, 2014; Hofinger et al., 2011).

При культивировании в роторном биореакторе при непрерывном вращении поверхность диска поочередно погружается в питательную среду. Бактерии оказываются прикреплены к поверхности диска, они получают питательные вещества из среды и кислород из атмосферы. На образование полимера в этом типе реактора влияют такие факторы как объем среды, скорость вращения и количество используемых дисков. Показано, что максимальное количество БЦ образовывалось, когда скорость вращения и отношение площади поверхности к объему среды (S/V) составляли соответственно 4 об/мин и $0,71 \text{ см}^{-1}$ (Islam et al., 2017). Такой биореактор является довольно эффективным. Роторные реакторы способствуют более высокому выходу целлюлозы: на 86,78 % больше, чем при использовании традиционного статического культивирования (Zhijun and Yue, 2014; Pa'e, 2009). Yong-Jun Kim с соавторами сообщили, что при использовании роторного биореактора в оптимальных условиях БЦ образуется в количестве 6,17 г/л (Zhijun and Yue, 2014; Kim et al., 2007).

В настоящее время в исследованиях довольно распространено использование мембранного биореактора (Sheng-Chi, Meng-Hsun, 2015). Это статический реактор, где целлюлоза образуется на поверхности проницаемой для кислорода синтетической мембраны (Islam et al., 2017).

Другим распространенным типом реактора для ферментации является эрлифтный биореактор, который более энергоэффективен. Модифицированный

эрлифтный биореактор уменьшает проблемы, связанные с ограниченным снабжением кислородом в процессе биосинтеза (Sheng-Chi, Meng-Hsun, 2015). Так, на 72-й час культивирования количество БЦ в среде достигало 7,72 г/л при количестве растворенного кислорода 35 % (Cheng et al., 2002).

При периодическом культивировании в эрлифтном биореакторе на 50 л на среде с 60 г/л – 70 г/л фруктозы наблюдалось образование целлюлозы в количестве 10,4 г/л (Chao et al., 2001). Использование модифицированной барботажной колонны с подачей кислорода и с добавлением в питательную среду агара приводит к увеличению образования БЦ до 6,8 г/л (Choi et al., 2009).

При культивировании с использованием аэрозольного биореактора полученная пленка БЦ обладала улучшенными механическими свойствами, но более низкой степенью полимеризации (Hornung et al., 2006).

Несмотря на перспективность использования бактериальной целлюлозы в различных сферах народного хозяйства, в России до сих пор нет её производства вследствие отсутствия эффективных продуцентов и технологий. Потенциал БЦ в использовании для создания передовых материалов сдерживается ограниченным знанием оптимальных условий производства, эффективного процесса масштабирования, методов разделения и методов очистки (Reiniati et al., 2016).

1.4 Процессы, происходящие при заживлении ран

Как самый большой орган человека, кожа составляет 10 % от общей массы тела и действует как защитный барьер от окружающей среды. Помимо этой физической защитной функции, кожа также отвечает за сенсорное обнаружение, терморегуляцию, гомеостаз жидкости и иммунный контроль. Обычно человеческое тело способно восстановить целостность кожи после травмы с минимальным рубцом с помощью сложного процесса. Процессы быстрого восстановления тканей делятся на последовательность из четырех

зависимых от времени фаз: коагуляция и гемостаз, воспаление, пролиферация и ремоделирование.

Рана – нарушение анатомической целостности кожи или слизистых оболочек на всю их толщину, с возможным повреждением более глубоко лежащих тканей, вызванное внешним фактором, например, механическим воздействием или в результате медицинской или физиологической ситуации. Раны также включают ожоги и повреждения, вызванные химическими веществами, электричеством, радиацией и термическим воздействием. По данным Всемирной организации здравоохранения, 180000 смертей в год связаны с ожогами (Aksu et al., 2019).

Кожа покрывает все тело и служит первой линией защиты от внешнего проникновения микроорганизмов и других факторов, таких как тепло, попадание химических веществ и токсинов, а также обезвоживание. Толщина рогового слоя составляет всего от 20 до 25 мкм, но, тем не менее, это обеспечивает очень эффективный барьер от проникновения посторонних агентов. Однако непроницаемость является серьезной проблемой при доставке лекарств через кожу. Дермальная доставка лекарств имеет ряд преимуществ, например, что высокие концентрации лекарств могут быть локализованы в месте действия, снижая негативное воздействие лекарств и, следовательно, также уменьшая системные побочные эффекты (Aksu et al., 2019).

Повреждения кожи представляют серьезную опасность для здоровья человека, поскольку нарушаются барьерные функции кожи. Чтобы обеспечить быстрое выздоровление, эндогенный процесс заживления начинается практически мгновенно. Кровоток останавливается в течение нескольких минут путем агрегации тромбоцитов и образования фибриновых сгустков (рис. 12 А). Местно высвобождаемые факторы роста и клеточные медиаторы рекрутируют воспалительные клетки, такие как нейтрофилы и моноциты, в область раны (рис. 12 В). В результате вторая фаза или воспалительный ответ направлен на очистку раны от инородных тел, бактерий и поврежденной эндогенной ткани.

К концу воспалительной фазы в рану выделяются тромбоцитарные факторы роста, что обуславливает перемещение и разделение клеток во время пролиферативной фазы (рис. 12 С).

Начинается третья стадия или пролиферация (рост новой ткани). В пролиферативной фазе формируются новые кровеносные сосуды, инициируется синтез армирующих коллагеновых волокон, и формируется грануляционная ткань, происходит эпителизация.

Полное заживление раны занимает несколько недель или месяцев (рис. 12 D). Когда рана сокращается, грануляционная ткань превращается в более стабильный внеклеточный матрикс. Общая продолжительность процесса заживления зависит от возраста и состояния здоровья пациента (наличия таких факторов, как диабет или венозная недостаточность), а также от внешних факторов, таких как наличие инородных тел или инфекций в ране.

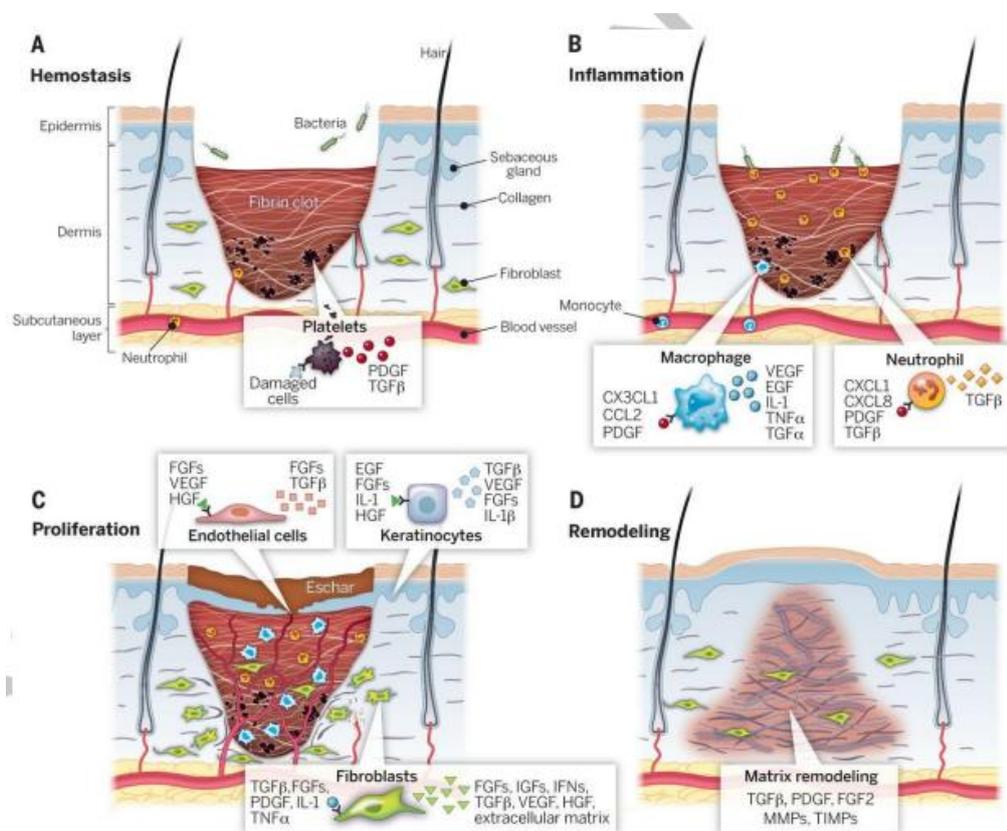


Рисунок 12 – Схематическая иллюстрация процесса заживления, включая гемостаз и коагуляцию (А), воспаление (В), пролиферацию (С) и созревание и перестройка (полное заживление) (D) (Koehler et al., 2014).

Заживление острых ран следует описанному выше процессу и заканчивается в течение 8 – 12 недель. В отличие от этого, хронические раны застывают в воспалительной фазе, сопровождаясь значительными выделениями, тяжелыми инфекциями, болью и некрозом тканей. В результате для полного заживления хронических ран может потребоваться несколько месяцев или лет (Koehler et al., 2014).

Однако процесс заживления может быть прерван рядом факторов, таких как местные факторы (оксигенация, инфекция раны, инородное тело, венозная недостаточность, площадь раны, глубина) и системные факторы (возраст и пол, уровень гормонов, стресс, наличие заболеваний, ожирение, прием лекарств, алкоголизм, курение, иммунодефицитные состояния и питание).

Таким образом, на заживление ран влияет ряд факторов, и для ускорения заживления необходимо медицинское лечение. Как правило, основной проблемой выступают инфицирование раны. Поэтому был разработан широкий спектр продуктов для заживления ран.

Развитие микробов на ране также представляет собой серьезную клиническую проблему во время ее заживления. Дисбаланс между патологическими факторами и целостностью механизма иммунной защиты способствует колонизации грамположительных и грамотрицательных бактерий на поверхности раны, включая *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и метициллин-устойчивый *Staphylococcus aureus*.

Во время бактериальной инфекции воспалительная фаза затягивается вместе с повышением уровня провоспалительных цитокинов, и, как следствие, ткани кожи не могут проходить через нормальные стадии заживления (Thakur et al., 2018).

До 1960-х годов перевязочные материалы считались так называемыми пассивными продуктами с минимальной ролью в процессе заживления. В новаторском исследовании Winter и соавторы положил начало концепции активного участия раневой повязки в создании и поддержании оптимальных условий для заживления ран. Это понимание привело к разработке

перевязочных материалов для ран от традиционных пассивных материалов до функциональных активных повязок. Взаимодействуя с раной, функциональные активные повязки создают и поддерживают влажную среду для заживления ран. Ожидается, что идеальная раневая повязка будет обеспечивать влажную среду раны, выполнять защитную роль при вторичных инфекциях, удалять экссудат из раны и способствовать регенерации тканей, а также улучшать качество заживления ран. Принимая во внимание вышеуказанные факторы, гидрогель имеет большой потенциал в качестве перевязочного материала для ран.

В связи с чем, в настоящее время необходимо разработать новые материалы с антибактериальными свойствами.

1.5 Применение бактериальной целлюлозы в медицине

Бактериальная целлюлоза и материалы на ее основе находят крайне широкое применение в современной регенеративной и диагностической медицине. БЦ – это высокочистый, биосовместимый и универсальный материал, который может быть использован в различных сферах. Целлюлозные материалы широко используются для лечения кожи при ожогах, ранах и язвах. Пленки БЦ ускоряют процесс эпителизации и позволяют избежать инфекций. Кроме того, биокомпозиты на основе БЦ обладают способностью регулировать клеточную адгезию, что является важной характеристикой для скаффолдов и трансплантатов; ультратонкие пленки БЦ могут также использоваться при разработке диагностических датчиков для определения их способности к иммобилизации нескольких антигенов. Варианты применения БЦ в медицине показаны на рисунке 13 (Picheth et al., 2017).

Токсикологические эксперименты показали, что использование БЦ не оказывало репродуктивной токсичности, эмбриотоксического и тератогенного эффектов. Таким образом, БЦ с 1992 года названа управлением по контролю за

продуктами питания и лекарствами США общепризнанным безопасным веществом (GRAS) (Lin et al., 2020).

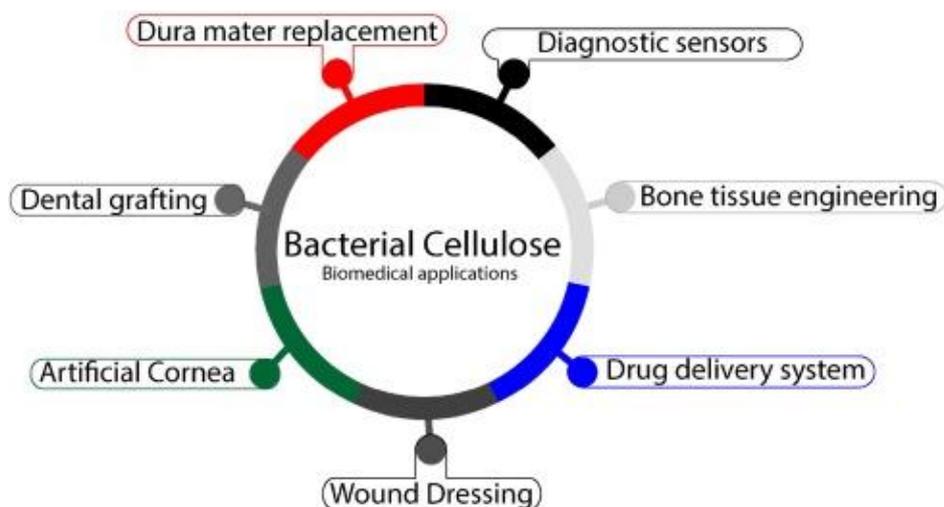


Рисунок 13 – Схематическая иллюстрация биомедицинских применений бактериальной целлюлозы (Picheth et al., 2017)

БЦ представляет собой широко распространенный биоматериал, который может использоваться, как в научных исследованиях, так и в фармацевтической и медицинской промышленности: в качестве искусственной кожи, имплантатов *in vivo*, искусственных кровеносных сосудов, ранозаживляющих покрытий и гемостатических материалов (табл. 5) (Picheth et al., 2017).

Исследования и продажа этих биоматериалов ВС сосредоточена в основном в США, Китае, Индии, Европе, Японии и регионах Юго-Восточной Азии. Однако другие страны с потенциалом роста на этом рынке включают Германию, Австралию, Бразилию, Канаду, Корею, Египет, Испанию, Францию, Израиль, Италию, Мексику, Перу, Россию и страны, входящие в Совет сотрудничества стран Персидского залива. Они все больше инвестируют в исследования и разработку новых продуктов, чтобы на равных конкурировать со странами с широко развитой торговлей. Среди основных поставщиков БЦ и НКЦ следует выделить Celluforce (Канада), Fiberlean Technology (США) и Borregaard Chemcell (Норвегия), которые успешно конкурируют с американскими компаниями, такими как US Forest Service (Университет штата

МЭН), American Process Inc. и японской Бумажная группа Nippon (Fernandes et al., 2020).

Таблица 5 – Композиты на основе бактериальной целлюлозы и их назначение (Picheth et al., 2017; Fernandes et al., 2020)

Название	Использование	Пример лечения	Оказываемый эффект
Biofill®	Искусственные временные кожные покровы	Лечение язв и ожогов	Облегчение боли, борьба с инфекциями, более быстрое заживление.
Gengiflex®	Зубные имплантаты, имплантационные материалы	Восстановление тканей пародонта	Уменьшение воспалительного ответа и уменьшение хирургических вмешательств.
Bionext®	Перевязочный материал для лечения ран	Язвы, ожоги, рваные раны	Облегчение боли, борьба с инфекциями, более быстрое заживление.
Membracell®	Искусственные временные кожные покровы	Язвы, ожоги, рваные раны	Быстрая регенерация кожи
Xcell®	Перевязочный материал для лечения ран	Венозные язвенные раны	Облегчение боли, борьба с инфекциями, более быстрое заживление.

Согласно данным Pro Market Research и Decision Database, мировой рынок БЦ достиг 250 миллионов долларов в 2017 и 2019 годах, включая объем продаж основных сфер применения БЦ, таких как композитные материалы, продукты питания, бумага и другие. По оценкам глобальных поставщиков отчетов о бизнес-исследованиях, мировой рынок БЦ достигнет 570 миллионов долларов в 2024 году и 680 миллионов долларов к концу 2025 года, при этом совокупный годовой темп роста (CAGR) составит 13,3 % в течение 2018–2025 годов (Fernandes et al., 2020).

Гель-пленки бактериальной целлюлозы считаются идеальным перевязочным материалом для лечения ран из-за ее высокой биосовместимости *in vivo* (Helenius et al., 2006), способности обеспечивать оптимальную трехмерную матрицу для прикрепления клеток и микрофибриллярной структуры, которая обеспечивает гибкость, высокую способность к удержанию воды и газообмен (Sokolnicki et al., 2006). Кроме того, пленки БЦ

поддерживают физический барьер, который снижает болевые ощущения, бактериальную инфекцию и позволяет переносить препарат в область раны (Czaja et al., 2006).

По сравнению с БЦ, полученной статическим культивированием, БЦ, полученная при динамическом культивировании имеет рыхлую, слоистую, пористую структуру, большую площадь поверхности и сильно гидрофильные сетчатые структуры, что дает дополнительные преимущества.

Следовательно, БЦ, полученная при динамическом культивировании может рассматриваться также для расширения потенциальных применений БЦ в других областях. Сферы и агломераты БЦ можно использовать в качестве носителя для адсорбции, переноса и сшивания различных веществ, включая липазы, Fe_3O_4 , графен, углеродные нанотрубки, белок, фермент, человеческий остеобласт, нуклеиновую кислоту и другие соединения. Она также применяется в биоразделении, доставке лекарств, для иммобилизации ферментов, и в качестве адсорбента для ионов тяжелых металлов, масла, органических растворителей и очистки сточных вод. Ну и соавторы получили сферические частицы БЦ при динамическом культивировании с использованием *K. xylinum* для роста остеобластов человека.

Сферические частицы БЦ различных размеров были получены при скоростях вращения 125 об/мин и 150 об/мин. Клетки остеобластов человека могут прикрепляться к частицам БЦ. При сравнении агломератов, полученных при двух разных скоростях вращения, клетки показали лучшее прикрепление и жизнеспособность на более крупных сферических частицах БЦ, которые были получены при скорости вращения 125 об/мин. Это было связано с тем, что частицы БЦ, полученные при двух скоростях вращения различались площадью поверхности, пористостью, жесткостью и микроструктура (Hu et al., 2013).

В настоящее время основным коммерческим использованием пленок БЦ является использование в качестве раневых перевязочных покрытий, коммерциализируемых под несколькими торговыми марками, такими как Bionext® , Membracell® и Xcell®, которые имитируют внеклеточный матрикс

для усиления эпителизации (Kwak et al., 2015). Согласно исследованиям, лечение ран с помощью пленок БЦ показывает большую эффективность по сравнению с обычными марлевыми или синтетическими материалами, такими как Tegaderm®, Cuprophan® или Xeroform™ (Lin et al., 2014). Покрытия на основе бактериальной целлюлозы демонстрируют быстрые темпы эпителизации и регенерации тканей, включая диабетические, хронические раны и ожоги (Ullah et al., 2016).

Все эти материалы приводят к эпителизации даже при ожогах второй и третьей степени, без необходимости ежедневного покрытия лечебными средствами и обеспечивают поддержание влажной среды, всасывание экссудата и адаптацию к раневой поверхности. Кроме того, мембраны БЦ способствуют удалению некротических остатков (Czaja et al., 2006). Они могут быть изготовлены в виде тонких и прозрачных пленок, позволяющих проводить оценку состояния раны в процессе лечения. Аналогичные подходы позволяют успешно использовать БЦ-пленки в качестве естественного трансплантата для барабанной перепонки у пациентов, перенесших местную перфорацию (Silveira et al., 2016).

Поскольку на гель-пленки БЦ не действуют протеолитические ферменты и активные формы кислорода (АФК), они защищают организм от канцерогенеза и предотвращают появление воспаления. В настоящее время использование био-имитирующих каркасов привело к исследованию БЦ в качестве потенциального материала для матриц в тканевой инженерии. Предыдущие исследования показали, что БЦ не индуцирует активацию провоспалительных цитокинов во время скрининга макрофагов *in vitro*, а скорее стимулирует биогенез коллагена II типа с помощью хондроцитов, выращенных на мембранах БЦ, что указывает на пригодность БЦ в качестве био-имитирующего каркаса.

Однако, БЦ не обладает антимикробной активностью. Кроме того, попытки адсорбировать лекарственные средства для лечения инфекций или ускорения процесса эпителизации часто приводят к быстрым темпам

высвобождения (Picheth et al., 2017). Все это приводит к необходимости создания композита на основе БЦ с антибактериальными свойствами.

Для устранения ряда недостатков, получают композиты на основе БЦ и других полимеров, таких как хитозан, альгинат, желатин и ксилан. Такие модификации связаны с улучшением свойств материала, повышением эффективности молекулярного связывания или способности к гидратации. Например, биокompозиты БЦ-пектин показали 20-кратное увеличение модуля сжатия и демонстрировали большую прочность (Dayal et al., 2016). Кроме того, композиты БЦ, содержащие сшитую карбоксиметилцеллюлозу, обладают более высокой способностью к связыванию ибупрофена, чем немодифицированные композиты. В результате чего, данные материалы перспективно использовать для доставки лекарств (Juncu et al., 2016). Дальнейшие модификации могут быть направлены на увеличение клеточной адгезии или диффузии лекарственных средств (Pertile et al., 2010).

1.5.1 Гидрогели – перспективные материалы для биомедицины

Весьма перспективно разрабатывать матрицу, доставляющую антимикробный агент к раневому слою. Раневые повязки на основе влажных природных или синтетических полимеров нашли широкое применение в медицине и здравоохранении. Они имеют преимущества перед мазями или ирригационными средствами, поддерживая необходимый уровень влажности и постоянную температуру, ускоряя заживление и защищая рану от микробной контаминации.

Целлюлозные материалы нашли широкое применение в медицине благодаря сочетанию хороших механических свойств, а также высокой адсорбционной способности (Kozyrovska et al., 2014).

Традиционные повязки, такие как марля и тканевые основы, в основном покрывают раны, сохраняя при этом надлежащий газообмен. Тем не менее, их сильное прилипание к месту раны вызывает боль и дальнейшие поражения во

время смены повязки. Напротив, повязки на основе гидрогеля уменьшают боль благодаря охлаждающему эффекту и низкой адгезии к ткани (Koehler et al., 2014).

Гидрогель был впервые изобретен в 1960-х годах Вичтерле и Лимом (Wichterle and Lím, 1960). С тех пор данный материал вызывает большой интерес как в научных кругах, так и в промышленности. В настоящее время гидрогели широко используются в средствах гигиены, пищевых добавках, косметологии, в сельском хозяйстве и биомедицине (Chau et al., 2016).

Гидрогель состоит из трехмерной (3D) сети гидрофильных полимеров. Эта сеть придает материалу нерастворимость полимерной системе и позволяет гидрогелям поглощать количество воды от 10 % – 20 % (произвольный нижний предел) до тысяч раз от их веса, пока процесс не достигнет состояния равновесия.

Гели состоят, по крайней мере, из двух компонентов, один из которых образует непрерывную трёхмерную макромолекулярную сетку, выступающую в роли каркаса, пустоты в которой заполнены низкомолекулярным растворителем – дисперсной фазой. По сравнению с кремами и мазями, гели из-за высокого содержания воды обеспечивают большее растворение лекарств и облегчают миграцию лекарств через носитель. Кроме того, гели могут увлажнять кожу, удерживая значительное количество трансэпидермальной воды и облегчая транспортировку лекарств (Yozgatli et al., 2019).

Гидрогели состоят из 90 % воды и 10 % природных или синтетических полимеров. Высокое содержание воды делает гидрогелевые повязки подходящими для лечения сухих и некротических ран (Kozyrovska et al., 2014).

Повязки на основе гидрогеля – одни из наиболее перспективных материалов для заживления ран, которые отвечают таким важным требованиям как:

- поддержание влажности раны во время абсорбции экссудата,
- отсутствие адгезии к клеткам,
- уменьшение болевых ощущений,

– возможность активного вмешательства в процесс заживления ран.

Хотя на рынке уже есть многочисленные перевязочные материалы на основе гидрогеля, требуются новые варианты для лечения ран, чтобы справиться с растущим числом тяжелых, острых и хронических ран, с которыми сталкивается современное общество. Высокая стоимость, проблемы безопасности, связанные с использованием лекарств и материалов, а также проблемы, характерные для гидрогелей, такие как отсутствие механической стабильности, препятствуют реализации многих новых материалов. Для удовлетворения клинических потребностей была бы желательна разработка новых гидрогелевых повязок, которые преодолевали бы эти недостатки.

Повязки на рану также должны демонстрировать механическую стабильность (под давлением и натяжением) во время нанесения, ношения и снятия, действуя в качестве барьера для внешних угроз, таких как микробы, инородные тела. Одновременно должна быть сохранена эластичная текстура, позволяющая повязке адаптироваться к конкретному профилю раны, и поддерживать высокую степень гибкости при движении пациента. Кроме того, покрытия должны обладать влагосвязывающей способностью для сорбции экссудата из раны, демонстрировать низкую адгезию к ране, чтобы защитить новообразованную ткань от разрушения во время повторных покрытий повязки.

Влажная среда, создаваемая гидрогелями, улучшает процесс рассасывания раны и обеспечивает эффективную очистку, т.е. удаление некротической ткани и инородного материала, благодаря сорбционной способности гидрогеля. Фактически было показано, что повязки на основе гидрогеля поглощают до 1000 грамм экссудата на грамм повязки в зависимости от состава гидрогеля. Проницаемые структуры гидрогеля дополнительно обеспечивают беспрепятственный обмен газообразных CO_2 , O_2 и H_2O , позволяя ткани «дышать» (Kozyrovska et al., 2014).

Они в основном используются для сушки ран до умеренного дренирования, для ускорения аутолитической обработки некротических ран и

гранулирующих ран. Полностью набухшие гидрогели обладают рядом общих физических свойств в живых тканях, таких как упругость, эластичность и низкое межфазное натяжение. Эластичные свойства гидрогеля могут уменьшить раздражение окружающих тканей. Низкое межфазное натяжение между поверхностью гидрогеля и жидкостью тела может снизить абсорбцию белков и клеточную адгезию до максимума, тем самым уменьшая вероятность отрицательного иммунного ответа.

В качестве основы для гидрогеля весьма перспективно использовать бактериальную целлюлозу. Благодаря своим уникальным свойствам БЦ стала очень популярным биоматериалом для медицинских применений. Она не аллергенна и безопасна, а кроме того легко стерилизуется. Это идеальный материал для заживления ран, поскольку сочетает в себе прозрачность с отличной адгезией к раневым участкам. Благодаря высокой абсорбции жидкости, хорошей проницаемости, прочности на разрыв, устойчивости к деградации и низкой растворимости БЦ может применяться в качестве искусственной кожи при лечении обширных ожогов (Koehler et al., 2014).

Некоторые примеры коммерчески доступных композитных гелей приведены в таблице 6 (Koehler et al., 2014).

Таблица 6 – Гидрогелиевые композиты на основе целлюлозы (Koehler et al., 2014)

Гидрогель	Состав композита
IntraSite™ Gel (Smith and Nephew)	КМЦ натриевая соль (CMCNa), пропиленгликоль, вода
GranuGel™ (ConvaTec)	КМЦ натриевая соль (CMCNa), пропиленгликоль, пектин вода
Purilon Gel™ (Coloplast)	КМЦ (CMC), альгинат натрия, вода
Aquacel Ag™ (ConvaTec)	КМЦ натриевая соль (CMCNa), ионы серебра (1,2 %)
Silvercel™ (Johnson and Johnson)	КМЦ (CMC), альгинат натрия, ионы серебра (8 %)

Благодаря наличию обильных гидроксильных групп в молекуле целлюлозы, целлюлозу можно использовать для получения гидрогелей с различной структурой и свойствами, чтобы выступать в качестве матрицы для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Материалы на основе целлюлозы представляют собой природный «наноматериал» и привлекают внимание исследователей во всем мире. Однако для разработки и применения гидрогелей на основе целлюлозы необходимы дальнейшие исследования (Dutta et al., 2019).

В области фармацевтической и биомедицинской инженерии гидрогели на основе целлюлозы привлекают большое внимание исследователей благодаря своим набухающим свойствам *in vivo*, механической прочности и совместимости с биологическими тканями, облегчая связывание (рис. 14) (Dutta et al., 2019).

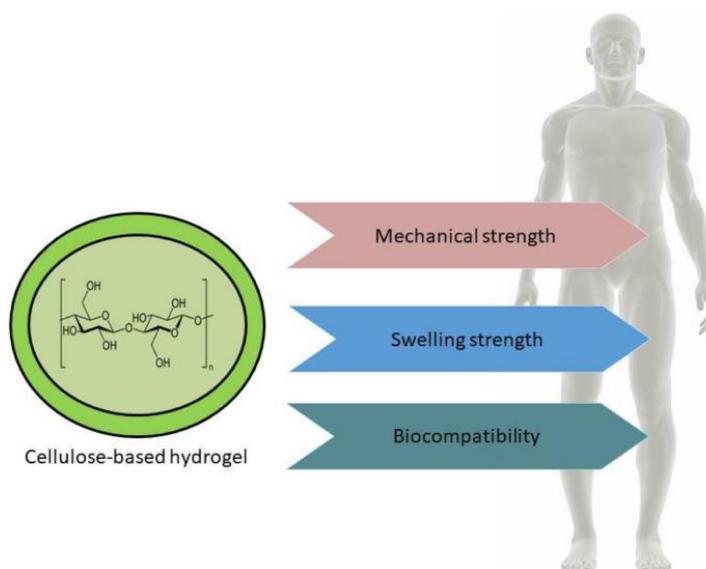


Рисунок 14 – Преимущества использования гидрогелей на основе целлюлозы для тканевой инженерии (Dutta et al., 2019)

Механические свойства гидрогелей значимы как с фармацевтической, так и с биомедицинской точки зрения. Оптимальная механическая прочность гидрогеля является необходимым условием для его успешной реализации в качестве системы доставки лекарственных средств. Превосходные

механические свойства гидрогелей позволяют поддерживать их физическую целостность до тех пор, пока молекулы груза не высвобождаются с заданной скоростью в течение заданного времени (Dutta et al., 2019).

Повязки на рану также должны демонстрировать механическую стабильность (под давлением и натяжением) во время нанесения, ношения и снятия, действуя в качестве барьера для внешних угроз, таких как микробы, инородные тела. Одновременно должна быть сохранена эластичная текстура, чтобы повязка адаптировалась к конкретному профилю раны и поддержала высокую степень гибкости при движении пациента. Кроме того, покрытия должны обладать влагосвязывающей способностью для сорбции экссудата из раны. Повязки должны демонстрировать низкую адгезию к ране, чтобы защитить новообразованную ткань от разрушения во время повторных покрытий повязки (Koehler et al., 2014).

Оптимальная степень сшивания может привести к получению гидрогеля с подходящей механической прочностью. Однако, увеличивая степень сшивания, можно получить более прочную форму гидрогеля, такую как хрупкий гидрогель, который проявляет уменьшенный процент растяжения (Dutta et al., 2019).

Когда гидрогели подвергаются воздействию воды, они могут поглощать воду или жидкости, не растворяясь. Это набухание продолжается до тех пор, пока не будет установлено равновесие между водой и полимером. С другой стороны, эластичность этого биоматериала обусловлена взаимодействиями полимер-полимер, которые препятствуют потоку воды внутри гидрогеля, приводя к состоянию, известному как «равновесное набухание».

В случае тканевой инженерии и регенеративной медицины гидрогели должны быть совместимыми и нетоксичными. Биобезопасность и биофункциональность являются двумя ключевыми факторами, регулируемыми биосовместимостью. Гидрогели на основе полисахаридов занимают важное место среди полимерных гидрогелей благодаря разнообразию химических структур и функциональных свойств. Широкое использование гидрогелей в

биомедицинской области является прямым результатом их способности удерживать большое количество воды, эластичности, биосовместимости и нетоксичности. Набухающие свойства гидрогелей обусловлены наличием гидрофильных групп, таких как, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$ и $-\text{SO}_3\text{H}$ в полимерных цепях. Набухание является важнейшим свойством гидрогелей для использования в биомедицине, например, в качестве перевязочных материалов для лечения ран (Dutta et al., 2019).

Смешивание или сшивание различных полимеров, таких как целлюлозно-полимерный композит, является удобным, недорогим и выгодным методом получения новых конструкционных материалов. Целлюлоза (или ее производные) смешивается с природными биоразлагаемыми полимерами, такими как хитин, хитозан, крахмал, альгинаты и гиалуроновая кислота. Некоторые примеры включают смешивание целлюлозно-полимерного композита с хитозаном для удаления тяжелых металлов, с крахмалом для пищевой промышленности и с альгинатами для тканевой инженерии (Dutta et al., 2019).

1.5.2 Антимикробные агенты, применяемые в композитах

В настоящее время известно большое разнообразие антибактериальных агентов. Использование природных или синтетических полимерных антибактериальных веществ считается одним из наиболее перспективных подходов для ингибирования роста микроорганизмов и борьбы с инфекцией.

Одним из наиболее распространённых антимикробных веществ, используемых в композитах на основе БЦ являются наночастицы серебра. Данные композиты описаны во многих научных работах для придания повязкам БЦ бактериостатического и бактерицидного эффектов. Данные композиты проявляют активность против *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* и *P.aeruginosa* (Kozyrovska et al., 2014).

Многочисленные исследования показали антимикробную, противоопухолевую, противодиабетическую и ранозаживляющую активность наночастиц ZnO (Alavi and Nokhodchi, 2019).

В работе Мосану с соавторами исследовали синергетический эффект наночастиц оксида цинка и экстрактов прополиса, нанесенных на пленку БЦ. Наночастицы ZnO генерировались при воздействии ультразвука непосредственно на поверхности БЦ. Композиты были дополнительно пропитаны спиртовыми экстрактами прополиса с различными концентрациями. Противомикробный синергетический эффект композита оценивали в отношении *E. coli*, *B. subtilis* и *Candida albicans*. Результаты эксперимента показали, что композит БЦ-ZnO не оказывал влияния на грамотрицательные и эукариотические клетки (Mosanu et al., 2019).

Кроме того, известно об иммобилизации лизоцима на нановолокнах бактериальной целлюлозы путем физической абсорбции. Изучены антимикробная активность и другие свойства иммобилизованного лизоцима, а также морфологические характеристики композита. После иммобилизации активность лизоцима была снижена примерно на 12 %. Антимикробная активность лизоцима в отношении *S. aureus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aspergillus niger* и *Saccharomyces serviseae* была увеличена после иммобилизации на волокнах целлюлозы (Bayazidi et al., 2017).

1.5.2.1 Фузидин натрия

При ожоговых травмах используются различные методы лечения. С вопросом смертности от ожоговых травм тесно связана проблема с бактериальными инфекциями (75 %). Смертность от ожоговых ран, контаминированных MRSA (метициллин-устойчивый золотистый стафилококк), имеет тенденцию к возрастанию. Наиболее распространенными патогенами, связанными с инфекциями ожоговой раны, является так же синегнойная палочка (*P. aeruginosa*) (Jyoti et al., 2020).

Широкое распространение множественнорезистентных Грам положительных возбудителей, особенно метициллинорезистентных

стафилококков, заставляет пересмотреть отношение к такому «старому» препарату, как фузидиевая кислота, и обратить внимание на возможность ее применения в терапии инфекций, вызванных этими микроорганизмами.

Интерес к фузидиевой кислоте привлекает также и тот факт, что число резистентных к ней штаммов не увеличивается. По данным зарубежных исследователей, частота резистентности к ФК у метициллиночувствительных штаммов *S. aureus* составляет 1 % – 3 %, аналогичные показатели для метициллинорезистентных штаммов несколько выше – 2 % – 5,7 % (Полунина и др., 2011).

Фузидиновая кислота является активным соединением, полученным из мицелия *Fusidium coccineum*, и она была использована в качестве лекарственного средства при лечении стафилококковых инфекций в начале 1960-х годов (Marian et al., 2020).

Фузидиевая кислота подавляет синтез белка в Грам положительных бактериях. Клинически фузидиевая кислота оказывает бактериостатическое действие; однако в высоких концентрациях она также действует бактерицидно. Данный антибиотик был выделен в 1960-е из культуры гриба *Fusidium coccineum* sp. (Jyoti et al., 2020).

Спектр антимикробной активности ФК уникален, так как в пределах одного рода различные виды микроорганизмов могут обладать различной чувствительностью к препаратам. Наибольшей активностью ФК обладает против *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*, включая метициллинорезистентные штаммы. На большинство других видов стафилококков и на стрептококки она действует умеренно, высокоактивна против коринебактерий, менингококков. ФК обладает высокой активностью против Грам (+) анаэробов, включая клостридии, пептококки, пептострептококки, значительно менее активна против Грам (+) анаэробов, таких как бактероиды и фузобактерии, и некоторой активностью против ряда простейших, включая *Ciardia lamblia* и *Plasmodium falciparum* (Полунина и др., 2011). Почти все грамотрицательные бактерии не чувствительны к фузидовой

кислоте, за исключением видов *Neisseria* и *Moraxella*, а также штамма группы *Bacteroides fragilis* (Williamson et al., 2017).

Фузидиевая кислота прочно связывается с прокариотическим фактором элонгации G (EF-G), тем самым замедляя стадию элонгации синтеза бактериального белка.

С инструментальной точки зрения фузидиевая кислота действует через четыре фазы, то есть инициирование, удлинение, транслокацию и высвобождение (рис. 15). Все четыре фазы участвуют в синтезе белка и активируются четырьмя белками (IF-2; фактор инициации-2; EF-Tu; фактор элонгации, термостабильный EF-G; фактор элонгации-G и RRF; фактор рециклинга рибосом). Более того, все четыре белка обладают активностью ГТФазы, и если какой-либо белок подавляется, он автоматически блокирует синтез белка. Кроме того, фузидиевая кислота соединяется с EF – G-GDP, который, в конечном итоге препятствует синтезу белка, подавляя транслокацию развивающегося полипептида, идентичную репроцессингу субъединиц рибосомы (достижение стоп-кодона на мРНК).

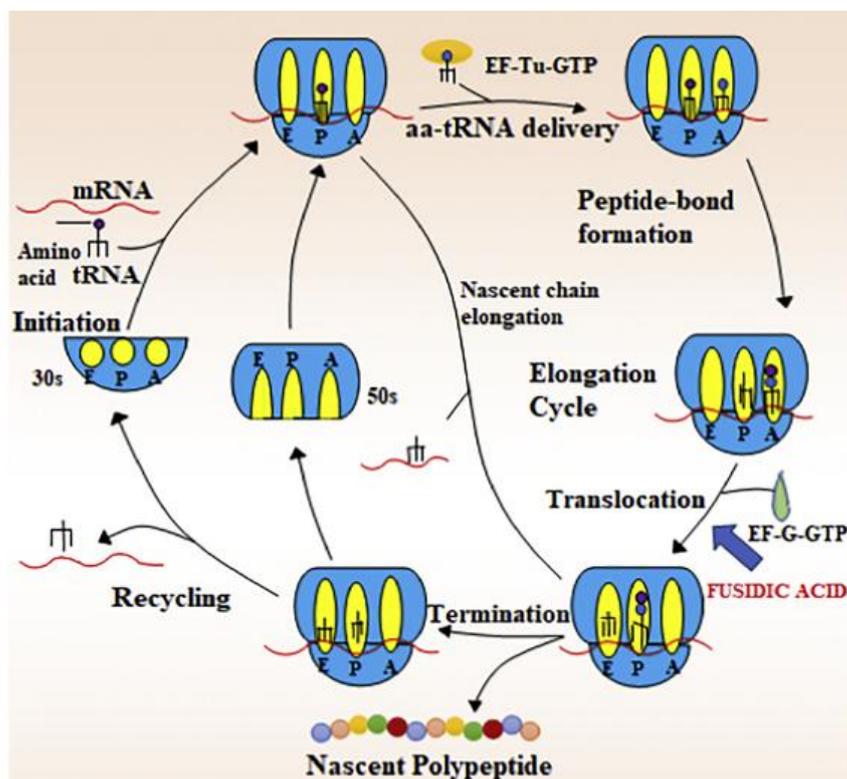


Рисунок 15 – Механизм действия фузидовой кислоты (Jyoti et al., 2020)

По химическому составу фузидиевая кислота представляет собой тетрациклический тритерпеноид (рис. 16), используемый при лечении контактного импетиго, эритразмы (первичные инфекции), повреждений, травм и ожогов (вторичные инфекции) (Jyoti et al., 2020).

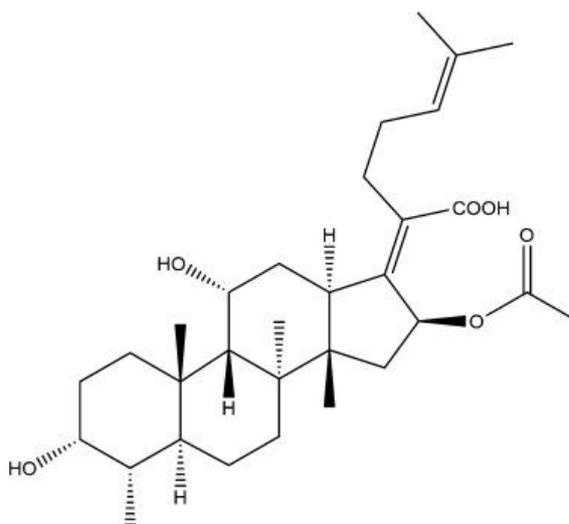


Рисунок 16 – Химическая структура фузидовой кислоты (Guo et al., 2017)

Она является единственным, используемым в клинической практике, представителем класса фузиданов (Полунина и др., 2011).

Фузидовая кислота относится к классу стероидов, но не обладает кортикостероидными (противовоспалительными или иммуносупрессивными) свойствами, так как имеет значительные отличия от стероидных гормонов в строении боковой цепи и в самом стероидном ядре (Хоменко, Шадурская, 2002).

Фузидиевая кислота (α , β -ненасыщенная карбоновая кислота) состоит из одной ацетоксильной и двух гидроксильных групп с $\log P$, равным 4,42. Фузидиевая кислота представляет собой слабую кислоту со значением pK_a 5,7, которая преимущественно ионизируется в плазме, а также в тканях при $pH \sim 7,4$.

Это белый гигроскопичный порошок, практически не растворимый в эфире и гексане, но эффективно растворимый в 96 % этаноле, хлороформе, ацетоне, диоксане, пиридине и ацетонитриле. Оценка параметров, указывающих на стабильность дермального крема с фузидиевой кислотой, показала, что фузидиевая кислота была наиболее стабильной в условиях фотолиза, и 30,10 % препарата разлагалось в кислых условиях (0,01 М НСl) за 24 часа, 35,20 % разлагалось в щелочных условиях (0,001 М NaOH) через 1 час, 27,70 % разложилось в нейтральных условиях (сверхчистая вода) через 72 часа и 95,84 % разложилось в присутствии 3 % H₂O₂ за 5 часов.

Кроме того, фузидиевая кислота хорошо известна своими характеристиками полиморфизма с четырьмя кристаллическими структурами.

Сообщается, что фузидиевая кислота существует в аморфной и четырех кристаллических формах, обозначенных как IV. Форма III является предпочтительной полиморфной модификацией в фармацевтических продуктах, поскольку она представляет собой термодинамически более стабильную полиморфную форму, но все же возможны твердотельные превращения во время любой стадии производственных операций (Guo et al., 2017).

Несмотря на то, что фузидин эффективен по отношению к различным патогенам, таким как *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) и *Corynebacterium diphtheria* (*C. diphtheria*), официально разрешен по рецепту в странах Европы и Азии, препарат не одобрен для продажи в США. Более того, с появлением новых мощных антибиотиков интерес к фузидиевой кислоте в конечном итоге снизился. Однако интерес к фузидиевой кислоте снова возрос, когда появились штаммы бактерий, устойчивых к другим препаратам, такие как MRSA (Jyoti et al., 2020).

ФК выпускается в различных составах для перорального, внутривенного и местного применения. После перорального приема 500 мг C_{max} находятся в диапазоне от 14,5 до 3,3 мг/л, а период полувыведения составляет 8,9–11,0 ч.

В настоящее время фузидовая кислота широко назначается врачами для лечения кожных инфекций. Наиболее частыми показаниями являются фурункулы, сибирская язва или карбункул, эритема, фолликулит, акне, абсцессы, гидраденит и раневые инфекции из-за ожогов и импетиго (Aksu et al., 2019).

Фузидин натрия показывает положительные терапевтические эффекты при ожоговой ране. В исследовании Ulkur и соавторами на поверхности экспериментальных ожоговых ран животных MRSA был устранен в ожоговых струпах, которые лечили местно с помощью состава, содержащего 2 % фузидовой кислоты, тогда как лечение повязкой с серебром и хлоргексидином привело лишь к незначительному снижению бактериальной нагрузки (Ulkur et al., 2005). Vingsbo и исследователи отметили значительное логарифмическое снижение количества MRSA при экспериментальных кожных инфекциях, в данном случае происходило местное применение фузидовой кислоты (Vingsbo and Frimodt-Moller, 2013).

Vanangamudi и соавторы запатентовали кремы для местного применения, содержащие фузидиевую кислоту, которые можно использовать на поверхности кожи, пораженной бактериями и при инфекциях ожоговых ран. Кроме того, запатентованные кремы для местного применения могут также содержать противовоспалительное стероидное лекарственное средство в дополнение к хитозану в качестве биополимера и противогрибковое средство для усиления противомикробной активности (Vanangamudi et al., 2011).

Фузидиевая кислота ограничивает способность проникать через кожу из-за высокой молекулярной массы 516,709 Да. Терапевтические препараты с более низкой молекулярной массой (<500 Да) имеют высокий коэффициент диффузии, свободно растворяются в маслах и воде, достигая повышенного градиента концентрации и, наконец, увеличивая силу диффузии по коже. Однако более высокий коэффициент распределения может задерживать выведение лекарственного средства из кожи и, в конечном итоге, увеличивает поглощение лекарственного средства. В связи с этим фузидиевая кислота имеет

коэффициент октанол / вода при > 4 , высокий метаболический оборот, низкую растворимость, а также обладает недостаточным всасыванием при пероральном введении.

Температура плавления фузидиевой кислоты ($192,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) способствует проникновению, поскольку соединения с низкой температурой плавления ($< 200\text{ }^{\circ}\text{C}$) с большей вероятностью будут хорошо всасываться при местном применении. Фракция, абсорбированная для лекарств с высокой температурой плавления, уступает в значительной степени по сравнению с соединениями с низкой температурой плавления. Таким образом, физико-химические свойства фузидиевой кислоты требуют разработки эффективной, стабильной и защитной системы местной доставки лекарств в лечение ожоговой раневой инфекции (Jyoti et al., 2020).

Однако доступные в настоящее время составы для местного применения, содержащие фузидовую кислоту проникают в рану не интенсивно, что приводит к неоптимальной терапевтической эффективности. Кроме того, препарат должен применяться 2 – 3 раза в день в течение нескольких дней, что ведет к плохому соблюдению пациентом режима (Thakur et al., 2018).

В последнее время многие исследователи анализировали устойчивость стафилококков из разных уголков мира к фузидовой кислоте. Полученные экспериментальные данные доказали, что на эффективность препарата влияет режим его введения. В этом контексте высокая эффективность и безопасность введения могут быть оптимизированы за счет использования различных молекулярных структур в качестве носителей лекарственных средств.

В рамках фармацевтических и клинических проблем доставки лекарств фузидиевой кислоты при инфекциях ожоговой раны идеальная система доставки лекарств должна доставлять лекарство в глубокие слои кожи, защищая терапевтический объект от факторов окружающей среды, таких как pH, влажность и т. д. Доклинических и клинических успехов достигли несколько разработок по наноразмерной местной доставке лекарств. Сюда относят такие системы, как наноконструкции, наноэмульсии, микроэмульсии,

твердые липидные наночастицы и липосомы, благодаря высокой эффективности проницаемости, стабильности, высокой эффективности инкапсуляции, низкой стоимости и простоте масштабирования (рис. 17). Среди другого подхода можно рассмотреть включение фузидовой кислоты во влажный устойчивый гелевый композит (Jyoti et al., 2020).

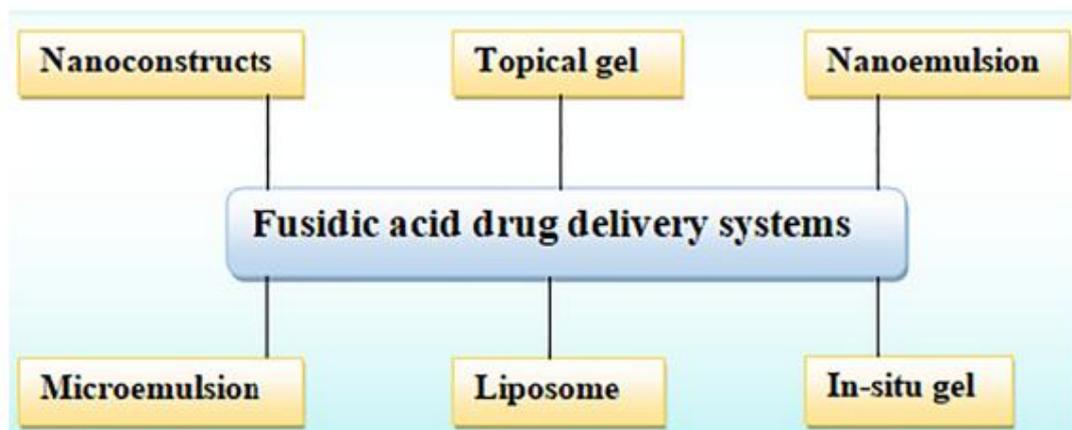


Рисунок 17 – Наноразмерные системы доставки лекарств для местного применения, такие как наноконструкции, наноэмульсии, микроэмульсии, гель *in situ* и липосомы, которые используются для местной доставки фузидовой кислоты через кожу (Jyoti et al., 2020)

1.5.2.2 Характеристика хитозана

Хитозан – это природный полисахарид, обладающий гемостатическими, бактериостатическими и фунгистатическими свойствами. Данное вещество было признано пригодным и подходящим для медицинского применения. В исследованиях на животных и клинических испытаниях на людях раны, обработанные хитозаном, заживали быстрее, чем раны, обработанные повязками без хитозана. Кроме того, присутствие хитозана на раневой поверхности способствует пролиферации клеток, а также образованию коллагена и гиалуроновой кислоты (Koehler et al., 2014).

Хитин был открыт во Франции более 200 лет назад в 1811 г. Анри Браконно при работе с высшими грибами в ботаническом саду г. Нанси. Позже, в 1859 г. исследователем Роже было показано, что при обработке хитина

концентрированной щелочью можно получить так называемый модифицированный хитин, растворимый в органических кислотах – хитозан. С тех пор к этому уникальному биополимеру проявляется большой интерес, он стал предметом исследований, удостоенных Нобелевской премии (Варламов, Мысякина, 2018).

Хитин по химической природе очень похож на целлюлозу, которая является наиболее часто встречающимся природным полимером. Однако воспроизводство хитина в биосфере составляет до $2,3 \times 10^9$ т в год, что почти в два раза больше воспроизводства в биосфере целлюлозы ($1,3 \times 10^9$ т в год). Хитин превращается в хитозан – поли-(1-4)-2-амино-2-дезоксид- β -D-глюкан при высокой температуре в 45 % – 50%-м растворе гидроксида натрия. Структурные формулы хитина и хитозана представлены на рисунке 18 (Самуйленко, 2018).

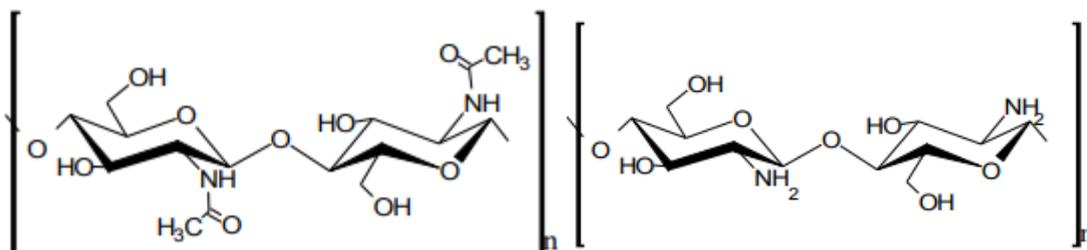


Рисунок 18 – Структурная формула хитина и хитозана (Самуйленко, 2018)

Хитин и хитозан являются линейными полисахаридами, состоящими из различного количества 2-амино-2-дезоксид- β -D-глюкозы (глюкозамин) и его N-ацетилированного производного в пиранозной форме, связанных β -(1 \rightarrow 4) гликозидными связями.

В выделенном из природных источников хитине, как правило, содержится 5 % – 10% остатков 2-амино-2-дезоксид- β -D-глюкозы. Дезацетилирование хитина обычно осуществляют в жестких щелочных условиях, при этом происходит его частичная деполимеризация.

Проведение дезацетилирования в мягких условиях (с помощью ферментов или при низких температурах) позволяет получать хитозан с более высокой молекулярной массой (Варламов, Мысякина, 2018).

Структура хитина представляет собой кристаллическую решетку, в связи с чем степень растворимости и набухания хитина в различных средах довольно низки. С помощью рентгеновской спектроскопии было установлено, что хитин существует в трех кристаллических формах (α -, β - и γ -хитин), отличающихся пространственной ориентацией молекулярных цепей и количеством связанной воды. Так, в α -хитине цепи расположены в противоположных направлениях по отношению друг к другу, в β -хитине – параллельно друг другу и направлены в одну сторону, а в γ -хитине две параллельные цепи расположены в одну сторону относительно друг друга, а следующая цепь – в противоположном направлении (Самуйленко, 2018).

Рентгенографические исследования хитозана показывают, что он имеет ту же кристаллическую решетку, что и хитин, но меньшую упорядоченность макромолекул, т. е. дезацетилирование хитина приводит к уменьшению «жесткости» структуры (степень кристалличности снижается до 40 % – 50 %). Хитозан, в отличие от хитина, растворяется в разбавленных растворах органических и минеральных кислот, буферных системах, поэтому легко может быть охарактеризован по величине вязкости и степени полидисперсности с помощью различных физико-химических методов. Свободные аминогруппы хитозана активны и участвуют в образовании хелатных комплексов с ионами металлов. Взаимодействие хитозана со сложными органическими молекулами, такими как белки, липиды, красители обусловлено не только наличием высокого положительного заряда, но и, в большей степени, вторичной и третичной структурой полимера.

Химические свойства хитина определяются наличием двух гидроксальных групп в его элементарном звене. Многочисленные реакционноспособные аминогруппы хитозана дают возможность осуществлять большее количество, по сравнению с хитином, химических реакций.

Хитозан в результате дезацетилирования хитина приобретает дополнительную реакционноспособную функциональную группу – первичную аминогруппу у второго атома углерода. Поэтому кроме простых и сложных эфиров по гидроксильным группам у третьего и шестого атома углерода возможно получение N-производных хитозана (Самуйленко, 2018).

Хитозан привлекает внимание широкого круга исследователей и практиков благодаря комплексу химических, физико-химических и биологических свойств и наличия неограниченной воспроизводимой сырьевой базе. Полисахаридная природа хитозана обуславливает его сродство с живым организмом, а наличие реакционноспособных функциональных групп обеспечивает возможность разнообразных химических модификаций, позволяющих усиливать присущие ему свойства или придавать новые в соответствии с предъявленными требованиями (Самуйленко, 2018).

Существует несколько коммерческих повязок, содержащих хитозан, например, KytoCel® (MasterCare Medical GmbH), аэрогель хитозана, и Chitoderm® plus (Trusetal Verbandstoffwerk GmbH), повязка с хитозановым покрытием.

Впечатляющее несоответствие между научным интересом к хитозановым повязкам и их коммерческим использованием может объясняться животным происхождением хитозана. Это производное хитина, найденное в раковинах ракообразных. Как и в случае любого натурального продукта, он также несет в себе высокий риск изменений свойств в зависимости от партии, таких как средняя молекулярная масса, активность и т.д.

Хитозан обладает сильным антимикробным действием и безопасен для организма человека. Существует множество работ, в которых обсуждается антимикробная активность хитозана в различных условиях, однако данные исследования показывают противоречивые результаты (Koehler et al., 2014).

Успешному изучению и применению хитозана способствуют не только широта практического применения в различных сферах, но и его уникальные свойства, которые особенно полезны для медицинского и косметического

применения: биосовместимость и биodeградеability с образованием безопасных для организма человека веществ – N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина. Следует отметить также низкую токсичность хитозана, его иммуномодулирующее, антибактериальное и фунгицидное действие, адьювантные свойства, противовоспалительное и противоопухолевое действие, радиопротекторные свойства, сорбционную способность, липотропное действие, ранозаживляющие свойства, антихолестерическое, гемостатическое, антибиопленочное действие и др. (Варламов, Мысякина, 2018).

Биodeградация хитозана объясняется главным образом способностью подвергаться ферментативному гидролизу лизоцимом, неспецифическими протеолитическими ферментами, представленными во всех тканях животного организма, хотя, похоже, что они также являются объектами гидролитической активности других протеолитических ферментов, таких как пепсин, трипсин или панкреатин. Деградация хитозана лизоцимом зависит от степени деацетилирования (СД) (DD, отношение N-ацетил-D-глюкозамина к структурным единицам D-глюкозамина) (75 % – 95 %). Полностью деацетилированный хитозан нечувствителен к действию этого фермента, тогда как хитин и частично деацетилированный хитозан восприимчивы к его действию.

Биосовместимость – одно из привлекательных качеств хитозана. Однако биологическая реакция *in vivo* зависит от конкретных параметров этого полимера: источника и метода получения, молекулярной массы (ММ), степени деацетилирования, полидисперсности и т. д. Хитозан при внутреннем потреблении имеет низкую токсичность на уровне соли и сахара. Согласно опытам, проведенным на мышах, была установлена величина его $LD_{50} = 16$ г/кг, хотя известно, что токсичность снижается, по мере снижения молекулярной массы и степени N-ацетилирования и зависит от типа противоионов, присутствующих в структуре хитозана (Самуйленко, 2018).

Биологическая активность хитозана зависит от молекулярной массы составляющих его макромолекул. Дополнительные недостатки включают в

себя низкую эластичность материалов на основе хитозана и связанные с этим трудности при изготовлении волокнистых повязок на рану (Koehler et al., 2014).

Если в качестве микроорганизма использовали *Staphylococcus aureus*, результаты показали, что антимикробный эффект выше для хитозана с более низкой молекулярной массой. Другое исследование продемонстрировало, что антимикробный эффект на кишечную палочку уменьшается по мере увеличения массы хитозана.

Известно, что хитозан с молекулярной массой 40 кДа может ингибировать 90 % роста *S. aureus* и *E. coli* при концентрации 0,5 %, а хитозан с молекулярной массой 180 кДа может почти полностью ингибировать рост экспериментальной кишечной палочки и *S. aureus* в концентрации 0,05 %.

В другом исследовании Jeon, Park и Kim было показано, что хитоолигосахариды с молекулярной массой более 10 кДа обладают более эффективной активностью в отношении патогенов.

Возможными механизмами антимикробной активности хитозана считают:

– хитозан на поверхности клетки может образовывать полимерную мембрану, которая препятствует проникновению питательных веществ в клетку.

– хитозан с более низкой молекулярной массой проникает в клетку. Поскольку хитозан может адсорбировать электроотрицательные вещества в клетке и флокулировать их, он нарушает физиологическую активность бактерий и убивает их.

Предположительно, для *S. aureus* доминирующим механизмом является первый, в то время как для *E. coli* – последний механизм (Zheng and Zhu, 2003).

Различные составы гидрогелевых повязок на основе хитозана могут способствовать заживлению ран в разные периоды и уменьшать действие неблагоприятных факторов, влияющих на заживление ран. Из-за способности ускорять заживление, гидрогели на основе хитозана рассматриваются как окклюзионные повязки для заживления ран. Имеющиеся в продаже перевязочные материалы из хитозана имеют форму нетканых материалов,

гидрогелей, пленок и губок. Краткое изложение некоторых торговых марок перевязочных материалов на основе хитозана, которые уже имеются в продаже, представлено в таблице 7.

Таблица 7 – Некоторые коммерческие повязки на основе хитина и хитозана

Торговая марка	Характеристики
Chitipack P® Eisai Co	Материал на основе хитина. Набухший хитин диспергируют в полиэтилентерефталате. Способствует раннему образованию грануляционной ткани. Подходит для труднодоступных ран и больших дефектах кожи.
Chitipack S® Eisai Co	Материал на основе хитина. Представляет собой губчатый материал. Способствует раннему образованию грануляционной ткани, не образует ретроактивных рубцов. Подходит для травматических ран и хирургических дефектов тканей
Tegasorb® 3M	На основе хитозана. Содержащиеся частицы хитозана будут набухать, впитывая экссудат и образуя мягкий гель. Слой водонепроницаемой пленочной повязки Tegaderm® покрывает гидроколлоид. Подходит для язв на ногах, хронических ран.
Chitoflex® HemCon	Антибактериальный и биосовместимый композит на основе хитозана. Он прочно сцепляется с тканевыми поверхностями и образует гибкий барьер, который может герметизировать и стабилизировать рану. Для использования при глубоких ранах, для остановки сильного кровотечения
Chitopack C® Eisai	На основе хитозана. Обеспечивает полное восстановление тканей, восстановление нормальной подкожной клетчатки и восстановление кожи
Chitopoly® Fuji spinning	Композит на основе хитозана. Хитозан и полиакрилат объединяют для получения антимикробных композитов. Используются для профилактики дерматита
Chitoseal® Abbott	Композит на основе хитозана, характеризуется хорошей биосовместимостью и гемостатической функцией. Используется при кровоточащих ранах.

Гидрогели на основе хитозана можно классифицировать как химические и физические гидрогели. Ковалентно сшитые гидрогели называют химическими гидрогелями, в то время как физические гидрогели образуются за счет ионных взаимодействий.

Глутаральдегид (ГА) и эпиклоргидрин могут использоваться в качестве химических сшивающих агентов, а, анионы и анионные молекулы также могут использоваться для ионного сшивания хитозана.

Среди сшивающих агентов, глутаральдегид, который является бифункциональным и водорастворимым сшивающим агентом, является высокоэффективным и экономичным. Реакция сшивания ГА с хитозаном происходит через реакцию основания Шиффа через иминную ковалентную связь $-C = N$ между аминогруппами хитозана и альдегидной группой ГА, и реакция сопровождается образованием цвета. Цвет гидрогеля хитозана, сшитого с помощью ГА, варьируется от белого до красно-кирпичного, а после высыхания гидрогеля он становится желтым или темно-красным.

1.5.3 Композиты бактериальная целлюлоза – хитозан

Антимикробный композит БЦ / хитозан был получен путем погружения влажной пленки БЦ в раствор хитозана. Полученные композитные пленки являются биологически активными и пригодными для клеточной адгезии и, следовательно, могут использоваться для получения раневых покрытий или каркасов для тканевой инженерии (Kozyrovska et al., 2014).

Как уже было сказано ранее, нативные пленки БЦ не проявляют антимикробной активности. Кроме того, БЦ не способна улавливать, удерживать и контролировать высвобождение небольших молекул, таких как антибиотики. Для разработки устройств с контролируемым высвобождением БЦ необходимо модифицировать с помощью полимеров, способных изменять размер пор и межцепочечную прочность. В этом смысле композиты БЦ-хитозан, могут усилить способность улавливать и поддерживать высвобождение антибиотика.

Тогда как, широкое применение чистого гидрогеля хитозана ограничено из-за его слабой механической прочности. Это ограничение может быть преодолено с помощью подходящего армирующего агента в матрице хитозана (Patel et al., 2021).

Для контролируемого высвобождения ципрофлоксацина разработаны биополимерные смеси на основе пленок бактериальной целлюлозы,

модифицированных низкомолекулярным хитозаном. Пленки БЦ модифицировали *ex situ* с помощью хитозана с образованием гомогенных и стабильных гелей. Присутствие хитозана в пленке позволяло контролировать высвобождение антибиотика с более медленной скоростью, чем при использовании чистой пленки БЦ. Определяли антимикробную активность пленок с ципрофлосацином и без него. Композиты без антибиотика показали ореолы локального и периферического ингибирования. Между тем, присутствие антибиотика эффективно оказывало более сильное ингибирующее действие на обе тестируемые бактерии (Cacicedo et al., 2020).

Lin с соавторами сформировали пленку БЦ-хитозан с антибактериальными свойствами для перевязки и ран путем погружения пленки БЦ в раствор хитозана с последующей сублимационной сушкой. Результаты показали, что образцы обладали значительной влагоудерживающей способностью и антибактериальной активностью (Lin et al., 2013).

В другом исследовании были получены гидрогели на основе БЦ и хитозана путем поперечной сшивки глутаровым альдегидом. Было доказано, что антибактериальная активность semi-IPN была значимой и коррелировала с содержанием хитозана (Wahid et al., 2019). Кроме того, предыдущие исследования показали, что БЦ, окисленная NaIO_4 , может быть привита к хитозану через базовую реакцию Шиффа (Liu, Wang, et al., 2019). Этот метод модификации может сделать связывание БЦ и хитозана более стабильным.

Глава 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования являлся продуцент бактериальной целлюлозы – штамм *Komagataeibacter sucrofermentans* Н – 110 (ВКПМ В-11267), выделенный из чайного гриба с последующей селекцией на основе естественного отбора в ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» (Патент № 2523606). А также бактериальная целлюлоза, полученная при культивировании продуцента в динамических условиях. И гидрогели на основе БЦ, хитозана и фузидина натрия.

2.2. Методы исследования

2.2.1 Условия культивирования продуцента бактериальной целлюлозы

Исходным посевным материалом являлась культура на скошенной агаризованной среде следующего состава, г/л: глюкоза – 10,0; дрожжевой экстракт – 10,0; пептон – 7,0; агар – 15,0; лимонная кислота – 0,2; уксусная кислота – 0,1; этанол – 10,0. рН 5,0 – 6,0. Режим стерилизации: 121 °С в течение 15 минут без этанола в автоклаве MLS-3781L (Sanyo, Япония).

Для получения инокулята бактерии выращивали на среде NS следующего состава, г/л: глюкоза – 20,0; пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 5,0; гидрофосфат натрия – 2,7; лимонная кислота – 1,15 в колбах объемом 250 мл, содержащих 100 мл среды, на шейкере – инкубаторе ES –20/60 (Biosan, Латвия) при 250 об/мин в течение 24 часов при температуре 28±1°С. Полученным инокулятом, в количестве 10 % от объема среды, засеивали опытные колбы, содержащие 100 мл среды культивирование осуществляли в

шейкере – инкубаторе при 250 об/мин при температуре $28\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 3-6 суток. Режим стерилизации: 121°C в течение 20 минут.

Также культивирование осуществляли в биореакторах Biostat A , B и C plus объемом 1, 6 и 30 литров при температуре $28\pm 1^\circ\text{C}$ при различных режимах перемешивания и аэрации в течении 3 суток.

В качестве основы экспериментальных сред выступали отходы биотехнологических производств: меласса и барда, с различными добавками.

2.2.2 Очистка и определение количества бактериальной целлюлозы

Полученную БЦ трехкратно обрабатывали 0,1 Н раствором NaOH при 80°C в течение 30 минут для удаления клеток и компонентов среды. От раствора щелочи целлюлозу отмывали 0,5 % раствором уксусной кислоты и дистиллированной водой до нейтральной реакции.

Количество полисахарида определяли весовым методом, путем высушивания до постоянной массы при температуре 60°C на весах II класса точности.

2.2.3 Определение pH

Определение pH культуральной жидкости проводили потенциометрическим способом на pH-метре S220 SevenCompact (Mettler Toledo, Швейцария).

2.2.4 Определение концентрации сахаров в среде

Определение содержания сахаров проводили при помощи высокоэффективного жидкостного хроматографа LC-20A (Shimadzu, Япония) с УФ-детектированием (254 нм). Хроматографическая колонка 250×4.6 мм Supelcosil LC-NH₂, 5 мкм (США). Анализ проводили в градиентном режиме при

расходе элюента 1 мл/мин и температуре термостата колонки 40 °С. В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил в концентрации 75 %. Для отделения целлюлозы проводили центрифугирование культуральной жидкости на высокоскоростной центрифуг Sorvall RC-6 Plus (Thermo Fisher, США) при 10 000 об/мин в течение 15 минут. Полученные образцы разводили в 5 раз дистиллированной водой и полученный раствор повторно центрифугировали при тех же условиях. Супернатант смешивали с ацетонитрилом в соотношении 1:3 и центрифугировали на лабораторной центрифуге CM-50 (ELMI, Латвия) при 10 000 об/ мин в течение 5 минут.

Содержание редуцирующих сахаров определяли с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты (Miller, 1959).

2.2.5 Определение показателей кристалличности

Для определения показателей кристалличности использовали два метода.

2.2.5.1 ИК-спектроскопия

ИК-Фурье-спектры регистрировали на ИК-спектрометре IRPrestige-21 (Shimadzu, Япония) в средней инфракрасной области 4000-400 см⁻¹. В качестве образцов использовали очищенную и лиофильно высушенную на установке FreeZone (Labconco, США) целлюлозу.

Для приготовления образцов, целлюлозу растирали с KBr (2 мг БЦ на 100 мг KBr) и прессовали в таблетки. Спектр чистого KBr вычитали из полученных спектров.

Индекс кристалличности бактериальной целлюлозы рассчитывался согласно формуле 1 (Ciolacu et al., 2011):

$$\text{ИК} = \frac{A_{1430}}{A_{893}} \quad (1)$$

Содержание α и β фазы высчитывали по формуле 2 (Szymańska-Chargot et al., 2011):

$$\%I_{\beta} = \frac{A_{710}}{A_{710} + A_{750}} \quad (2)$$

2.2.5.2 Рентгеноструктурный анализ

Степень кристалличности определяли методом рентгеноструктурного анализа на рентгеновском дифрактометре EMPYREAN (PANalytical, Netherlands) с детектором PIXcel3D на отражение в фильтрованном излучении медного анода. Лиофильно высушенные образцы, представляли собой квадратные пластины размером 30×30 мм.

Для исключения дополнительного рассеяния от подложки использовался стандартный держатель для прочных пленок. Таким образом, вклад в общее рассеяние определялся только рассеянием воздухом.

Измерения проводились с использованием двухкоординатного детектора PIXcel 3D, работающего в режиме линейного сканирования (255 пикселей на стрип) с разрешением 0,013 град/стрип. Общее время съемки 1 образца не превышало 100 минут.

Качественный фазовый анализ проводился с использованием программы HighScore Plus и базы данных PDF-2.

Степень кристалличности БЦ рассчитывали по формуле 3:

$$X = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \% \quad (3)$$

где I_{002} – суммарная интенсивность кристаллического пика 002;

$(I_{002} - I_{am})$ – интенсивность кристаллического пика 002 за вычетом фонового сигнала.

2.2.6 Определение ширины волокон бактериальной целлюлозы

Ширину волокон БЦ определяли на сканирующем зондовом микроскопе SPM9600 (Shimadzu, Япония). Образец размером 2,5×2,5 мм при помощи

клеякой ленты закрепляли на предметном стекле, помещали образец в аппарат и производили измерение.

2.2.7 Получение гидрогелей на основе бактериальной целлюлозы и хитозана

Полученную БЦ тщательно гомогенизировали до получения однородной суспензии (суспензию получали путем разведения целлюлозы водой в соотношении 1:3 по массе).

Гидрогели БЦ-хитозан получали путем смешения 2 %-го раствора хитозана в 1 %-ой уксусной кислоте, суспензии БЦ и 25 %-го глутарового альдегида (2 % и 1 %, об./об.). Глутаровый альдегид использовали в качестве сшивающего агента. Полученную смесь нагревали при 80 °С в течение 1 часа. Полученный гидрогель несколько раз промывали деионизированной водой для удаления свободных полимеров. Полученные гидрогели имели стабильную и однородную консистенцию и желтовато-коричневый цвет. Гидрогели хранили при температуре 4 °С – 5 °С для дальнейшего исследования (Wahid et al., 2018).

Соотношение БЦ/хитозан может составлять 0/100; 20/80; 50/50; 80/20 соответственно).

2.2.8 Изучение содержания гелевой фракции

Гелевая фракция (GF) гидрогеля указывает на степень сшивания, поскольку сшивание предотвращает солюбилизацию гидрогеля и позволяет гидрогелю только расширяться в воде во время экспозиции (Pandey et al., 2014). Для определения GF свежеприготовленные гидрогели вырезали в форме диска с использованием формы диаметром 1 см и высушивали при 60 °С до постоянного веса (G_0).

Сухой образец известного веса (G_0) был погружен в деионизированную воду на 5 дней при комнатной температуре для извлечения

непрореагировавших реагентов (БЦ и хитозан). Затем гидрогели извлекали и сушили до постоянного веса (G_1) при 60 °С. Процент гелевой фракции (GF, %) определяли по формуле 4:

$$GF = \frac{G_1}{G_0} \times 100\% \quad (4)$$

2.2.9 Определение влагосвязывающей способности материалов

Образцы гидрогелей с известной массой m_0 помещали в чашки Петри с 20 мл исследуемого раствора (дистиллированная вода, CaCl_2 , NaCl). Определяли изменение массы гидрогеля m_1 , через заданные промежутки. Влагосвязывающую способность рассчитывали по формуле 5:

$$BCC = (m_1 - m_0 / m_0) \times 100\% \quad (5)$$

2.2.10 Определение структуры гидрогелей

2.2.10.1 Сканирующая электронная микроскопия

Морфологию поперечного сечения лиофилизированных гидрогелей БЦ-хитозан оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Образцы композитов размером 5×5мм фиксировали на железной пластине и производили исследование микроструктуры при помощи многофункционального растрового электронного микроскопа с интегрированной системой фокусированного ионного пучка Quanta 200 i 3D «FEI» (США).

2.2.10.2 Микротомография образцов гидрогелей

Для морфологического анализа полученных биокompозитов использовали микрорентгеновский томограф Skyscan 1172 «Bruker» (Бельгия). Разрешающая способность: рентгеновского микротомографа от 0,8 до 30 мкм; размер объекта: диаметр сканирования – 50 мм, длина объекта до 70 мм. Размер исследуемых образцов гидрогелей – 50×20×10.

2.2.11 Определение антибактериальной активности гидрогелей

Антибактериальная активность гидрогелей была протестирована против грамположительных (*S. aureus*, *Bacillus licheniformis*) и грамотрицательных (*E. coli*) бактерий методом диффузии на поверхности агара и методом колониеобразующих единиц (КОЕ) для качественного и количественного анализа соответственно. Бактериальные клетки культивировали в течение ночи в среде Лурия-Бертани (LB) при 37 °С.

2.2.11.1 Метод диффузии

Метод выполняли с использованием твердой агаризованной среды ГРМ агар №1. Изучаемые гидрогели помещали на поверхность предварительно засеянных чашек. При исследовании контрольных образцов антибиотика и хитозана лунки формировали в чашках с агаром с помощью металлического бурава (диаметр 10 мм) и в лунки помещали свежеприготовленные стерилизованные растворы. Чашки Петри инкубировали при 37 °С в течение 24 ч и измеряли образовавшиеся зоны ингибирования с помощью штангенциркуля.

2.2.11.2 Метод подсчета КОЕ

В методе КОЕ стерилизованные образцы гидрогелей массой 0,5 г помещали в 20 мл бактериальной суспензии. Затем раствор инкубировали в шейкере-инкубаторе при 37 °С в течение 24 часов. В исследуемое время отбирали 0,1 мл раствора и проводили серийное разведение. Затем 0,1 мл раствора разведения наносили на чашки с агаром в трех экземплярах и инкубировали при 37 °С для образования колоний. Через 24 ч подсчитывали жизнеспособные колонии. Эксперимент повторяли трижды для каждого штамма и регистрировали средние значения.

Процент снижения жизнеспособности клеток рассчитывали по формуле 6:

$$X = \frac{КОЕ_{t_0} - КОЕ_{t_x}}{КОЕ_{t_0}} \times 100 \quad (6)$$

где t_0 – время 0 ч,

t_x – время, в которое процент снижения жизнеспособности рассчитывается.

2.2.12 Статистическая обработка данных

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Excel.

Опыты проводили в 3 – 4 кратных повторностях. При статистической обработке данных использовался непараметрический критерий Стьюдента. Обсуждаются статистически достоверные различия при $p < 0,05$. В таблицах цифры представляют средние величины из трех определений; разброс данных не превышал 10 % – 15 %.

Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Изучение биосинтеза бактериальной целлюлозы на стандартной среде NS

3.1.1 Исследование влияния источников углерода на образование целлюлозы

Для изучения особенностей метаболизма *K. sacrofermentans* B-11267, а именно продуктивности биосинтеза целлюлозы, потребления сахаров, а также образования побочных продуктов использовали стандартную среду NS.

Исследовали образование БЦ в динамических условиях на среде NS с различными источниками углерода в концентрации 20 г/л. Полученные данные представлены на рисунке 19.

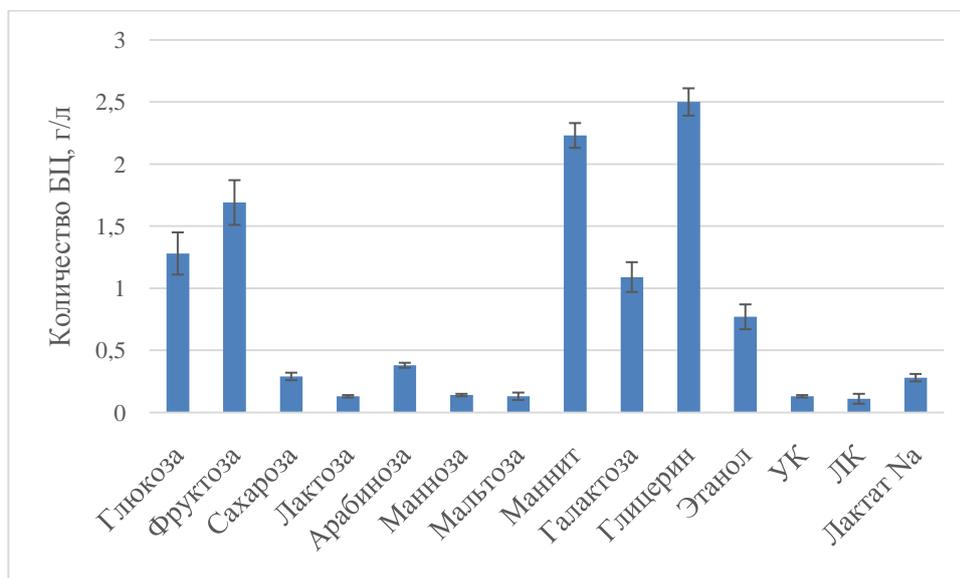


Рисунок 19 – Количество БЦ, образуемое *K. sacrofermentans* B-11267 на среде NS с различными источниками углерода на 3 сутки культивирования

Из полученных данных видно, что максимальное количество БЦ образуется на среде с глицерином $2,50 \pm 0,11$ г/л. Кроме того, значительное

количество целлюлозы обнаружено при культивировании бактерии на среде с маннитом – $2,23 \pm 0,10$ г/л и фруктозой – $1,69 \pm 0,18$ г/л. При использовании в качестве источника углерода глюкозы БЦ образуется в меньшем количестве – $1,28 \pm 0,17$ г/л. Снижение уровня образования полисахарида вероятно связано с образованием побочных продуктов окисления глюкозы, в частности глюконовой кислоты. Согласно представленным данным, органические кислоты не могут быть использованы в качестве единственного источника углерода в связи с отсутствием продуктивности штамма.

Также определяли рН культуральной жидкости после 3 суток культивирования *K. sacrofermentans* В-11267 на среде NS с различными источниками углерода. Данные представлены в таблице 8.

Можно заметить, что при использовании в качестве источника углерода глюкозы наблюдается снижение значения рН с начального 5,82 до 3,21, что вероятно вызвано образованием органических кислот в ходе жизнедеятельности микроорганизма. При использовании фруктозы наблюдается незначительное снижение значения рН с начального 5,82 до 5,48. При использовании в качестве источника углерода маннита и глицерина также наблюдается незначительное снижение значений рН от начального 5,82 до 5,55 и 4,98, соответственно. Это может свидетельствовать о том, что при использовании данных источников углерода не происходит образования глюконовой кислоты. Также известно, что субстратом для глюкозодегидрогеназы помимо глюкозы может выступать и галактоза, где так же наблюдается значительное снижение рН с начального 5,82 до 3,20 на 3 сутки культивирования.

Изучали динамику потребления сахаров в ходе культивирования *K. sacrofermentans* В-11267 на среде NS с различными источниками углерода, а именно глюкозой, фруктозой и сахарозой методом ВЭЖХ. Полученные данные представлены на рисунке 20.

Таблица 8 – Изменение pH культуральной жидкости *K. sucrofermentans* В-11267 с различными источниками углерода в динамических условиях за трое суток культивирования

Время культивирования, сутки	pH		
	После стерилизации	3 сутки	
		M±m	V
Глюкоза	5,82±0,27	3,24 3,17 3,22	3,21±0,03
Фруктоза	5,89±0,28	5,69 5,61 5,13	5,48±0,25
Сахароза	5,95±0,31	6,39 5,78 5,79	5,99±0,28
Лактоза	5,82	5,93 5,84 5,20	5,66±0,32
Арабиноза	5,83	4,62 4,63 4,42	4,56±0,10
Манноза	5,86	4,53 4,51 4,63	4,56±0,05
Мальтоза	5,83	5,75 6,37 5,57	5,90±0,34
Маннит	5,86±0,21	5,47 5,59 5,58	5,55±0,05
Галактоза	5,85	3,17 3,19 3,25	3,20±0,03
Глицерин	5,93	5,16 5,36 4,43	4,98±0,40
Этанол	5,93	4,02 4,04 3,62	3,89±0,19
Уксусная кислота	5,97	4,09 4,32 4,25	4,22±0,46
Лимонная кислота	5,87	5,50 5,53 5,61	5,55±0,05
Лактат Na	5,93	7,00 6,25 6,52	6,59±0,31

Здесь и далее V – данные; M – среднее арифметическое; m – ошибка репрезентативности.

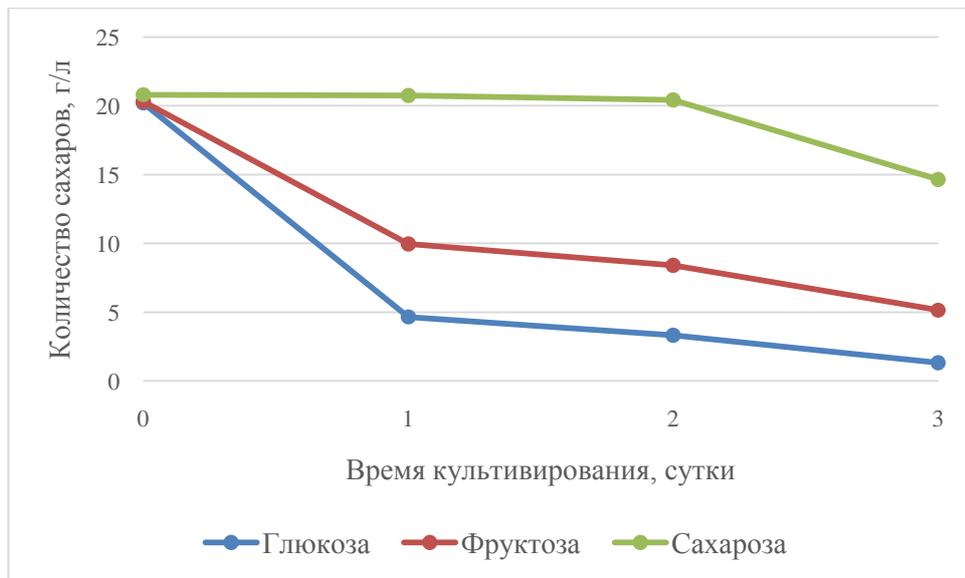


Рисунок 20 – Динамика потребления сахаров *K. sacrofermentans* B-11267 за 3 суток культивирования (ВЭЖХ)

Согласно представленным данным, при использовании в качестве источника углерода сахарозы происходит незначительное ее потребление. Концентрация сахарозы в среде снижается с начального значения 20 г/л до $14,64 \pm 0,13$ г/л на 3 сутки культивирования. При использовании в качестве сахара в среде фруктозы наблюдается значительное снижение ее концентрации с начального значения 20 г/л до $5,14 \pm 0,02$ г/л. При использовании глюкозы наблюдается максимальное снижение ее концентрации с начального значения 20 г/л до $1,32 \pm 0,05$ г/л. При этом более низкий выход БЦ чем на среде с фруктозой можно объяснить вероятно, тем, что глюкоза используется не только на образование целевого продукта, но и на образование глюконовой кислоты.

Для оценки влияния источника углерода на структуру БЦ использовали метод ИК-спектроскопии и атомно-силовой микроскопии (АСМ). ИК-спектры полученной БЦ представлены на рисунке 21.

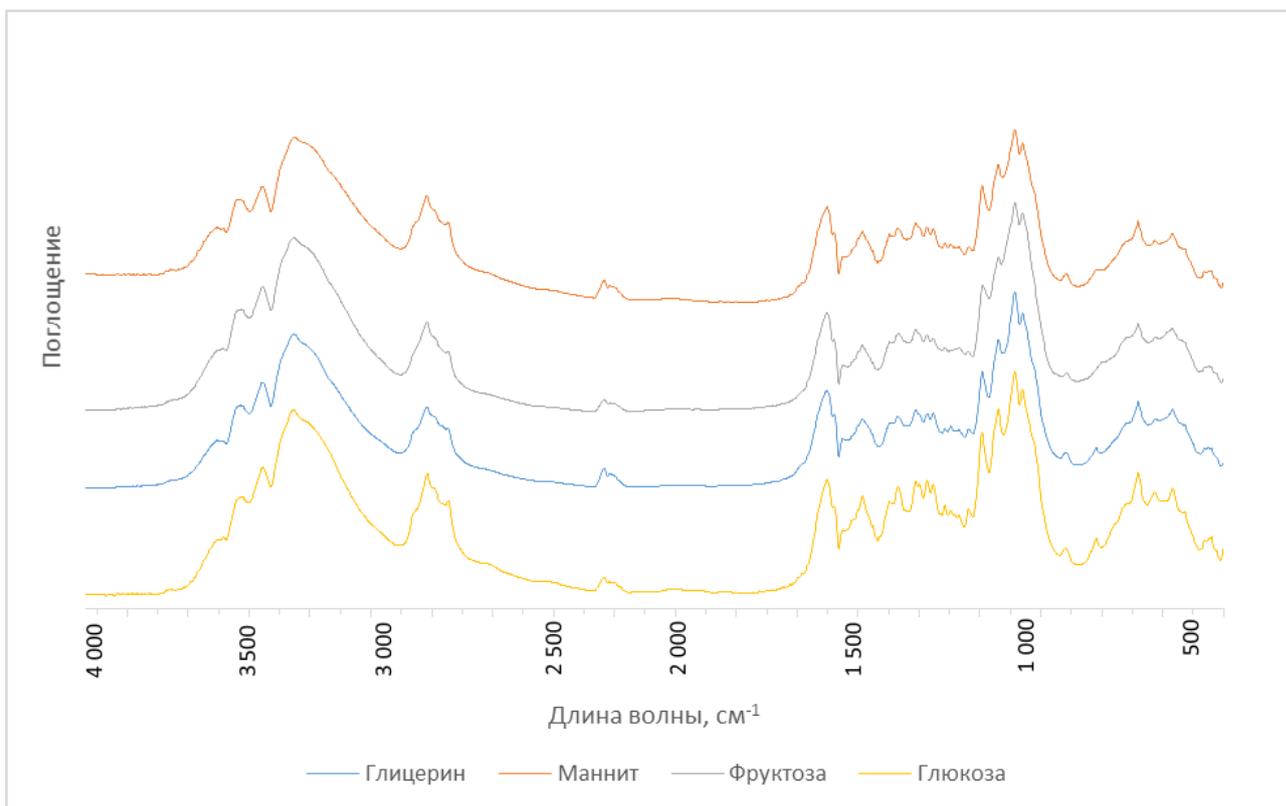


Рисунок 21 – ИК-спектры БЦ, полученной на средах с различными источниками углерода

В ИК-спектре БЦ можно выделить область поглощения при $3200\text{-}3500\text{ см}^{-1}$ с пиком при 3360 см^{-1} , которая соответствует валентным колебаниям гидроксильных групп, связанных межмолекулярными и внутримолекулярными водородными связями. Поглощение в областях 1168 и 1061 см^{-1} вызвано ассиметричными колебаниями С-О-С группы и вибрациями С-С, С-ОН, С-Н групп пиранозного кольца глюкозы, соответственно. Характерные полосы при 1430 , 1163 , 1112 и 896 см^{-1} указывают на целлюлозу I в качестве основного компонента (Casaburi et al., 2017). Полученные ИК-спектры согласуются с литературными данными и соответствуют целлюлозе I (Гладышева, 2015б).

Также определили индекс кристалличности и содержание α и β фазы целлюлозы в данных образцах, основываясь на соотношении интенсивности пиков (табл. 9).

Таблица 9 – Индекс кристалличности, содержание α и β фаз у БЦ, полученной на среде NS с различными источниками углерода

БЦ	I α , %	I β , %	Индекс кристалличности
Глюкоза	45,4 \pm 1,01	54,6 \pm 1,01	1,55 \pm 0,06
Фруктоза	44,1 \pm 0,49	55,9 \pm 0,49	1,81 \pm 0,08
Глицерин	44,6 \pm 0,53	55,4 \pm 0,53	1,80 \pm 0,05
Маннит	44,5 \pm 1,21	55,5 \pm 1,21	1,81 \pm 0,09

Полученные результаты соответствуют литературным данным, согласно которым при использовании различных источников углерода ИК-спектры и индексы кристалличности БЦ были похожими (Vazquez et al., 2013). Тем не менее, при использовании глюкозы наблюдается чуть меньший индекс кристалличности БЦ.

Ширину волокон целлюлозы определяли с помощью атомно-силовой микроскопии. Полученные данные представлены на рисунке 22.

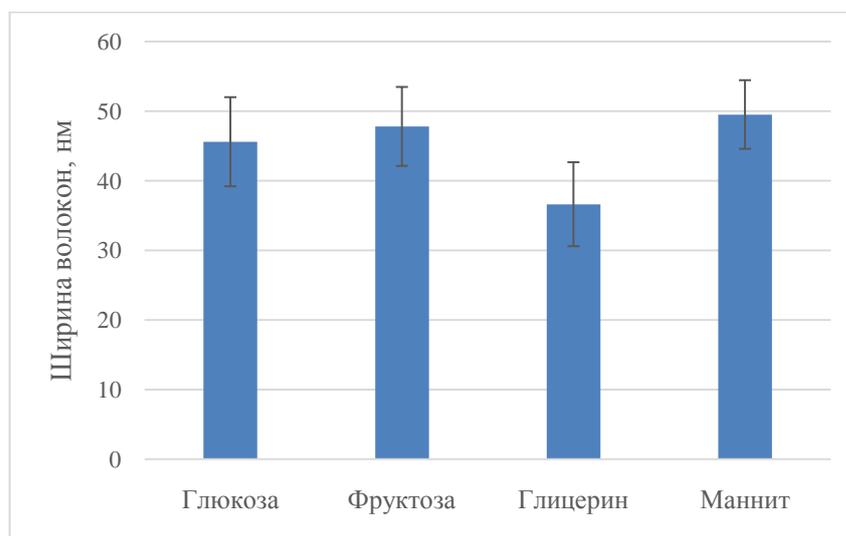


Рисунок 22 – Ширина волокон БЦ, полученной на средах с различными сахарами (АСМ)

Из полученных данных видно, что значения ширины волокон отличаются незначительно. Однако обнаружено, что наименьшая ширина волокна $36,61 \pm 6,033$ нм наблюдается при культивировании продуцента на среде с глицерином. При культивировании *K. sacrofermentans* В-11267 на среде с глюкозой обнаружены волокна шириной от 35 до 60 нм, на среде с фруктозой – от 40 до 60 нм, с маннитом от 40 до 65 нм.

Изображения волокон представлены на рисунке 23.

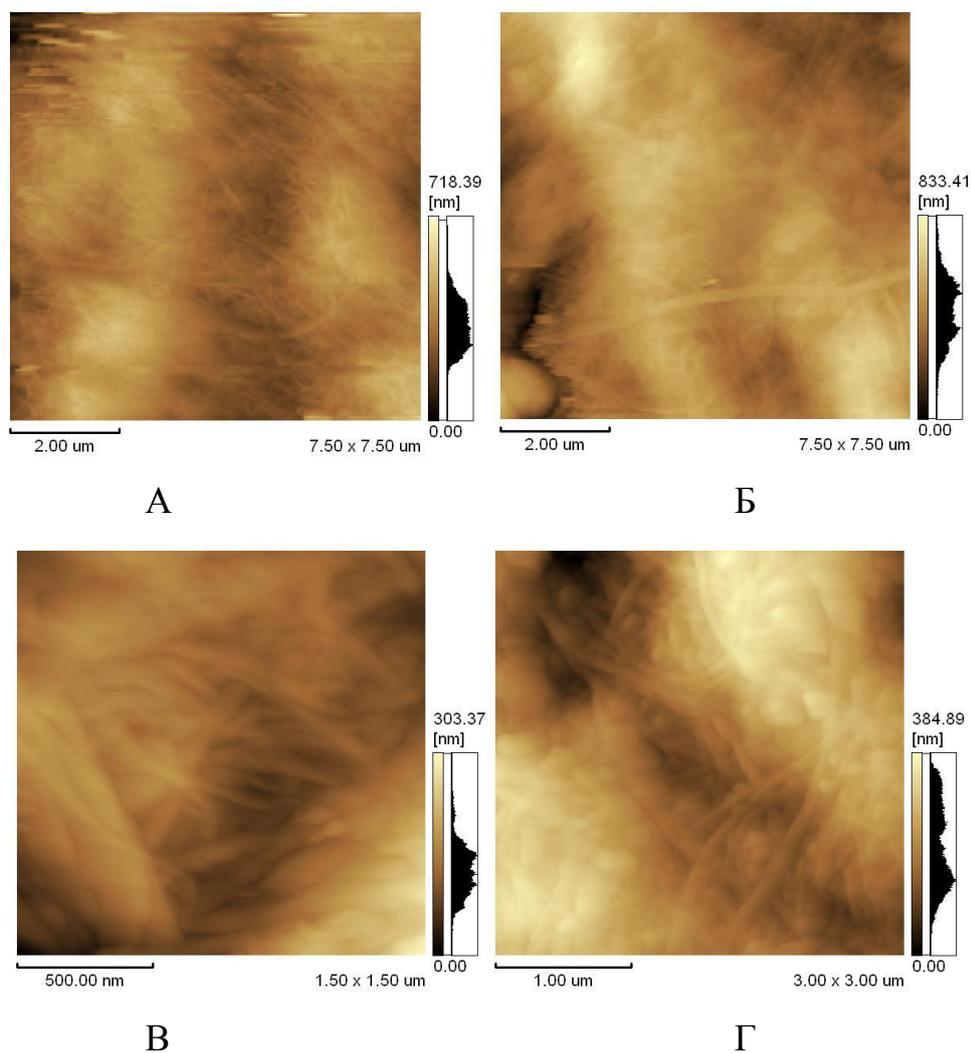


Рисунок 23 – АСМ-изображения БЦ, полученной на средах с разными источниками углерода: А – глюкоза, Б – фруктозы, В – глицерин, Г – маннит

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что максимальное количество БЦ образуется *K. sacrofermentans* В-11267 на среде

НС с глицерином. Значительное количество целлюлозы обнаружено также при культивировании бактерии на среде с маннитом и фруктозой. При использовании в качестве источника углерода глюкозы в количестве 20 г/л БЦ образуется в меньшем количестве, возможно по причине ее неподходящей концентрации. Поэтому следующей задачей был подбор оптимальной концентрации источников углерода в среде НС.

3.1.2 Подбор оптимальной концентрации сахаров

Из литературных данных известно, что для получения БЦ широко используется глюкоза, которая под действием фермента дегидрогеназы превращается в глюконовую кислоту. Образование глюконовой кислоты как побочного продукта снижает рН и, как результат, синтез целлюлозы (Kuo et al., 2016). Поэтому важным фактором при получении БЦ на средах с глюкозой является её концентрация.

Влияние концентрации глюкозы на образование БЦ штаммом *Acetobacter* sp. V6 в динамических условиях исследовали Son с соавторами (Son et al., 2003). Учеными показано, что максимальное количество БЦ образуется на синтетической среде с глюкозой в концентрации 1,5 % – 4,16 г/л после 8 дней культивирования на качалке при 200 об/мин.

Согласно данным Keshk и Sameshina оптимальным является использование глюкозы в концентрации 1 %, более высокие концентрации глюкозы – 2 % и 3 % приводят к снижению уровня образования БЦ (Keshk and Sameshima, 2006).

Поскольку в ряде литературных источников и в наших экспериментах показано, что происходит значительное снижение рН при использовании в качестве единственного источника углерода глюкозы в концентрации 2 %, то было предложено уменьшить количество глюкозы до 1 % и 0,5 %. Полученные данные представлены на рисунке 24.

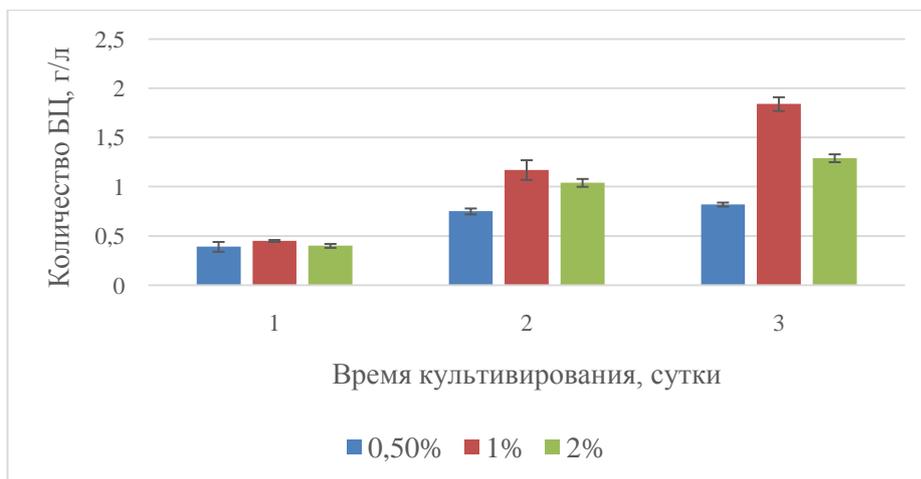


Рисунок 24 – Динамика образования БЦ на среде NS с различной концентрацией глюкозы

Из полученных данных видно, что наибольшее количество БЦ – $1,84 \pm 0,07$ г/л образуется при использовании глюкозы в концентрации 1%. При уменьшении концентрации глюкозы до 0,5 % не наблюдается значительного увеличения выхода после 2 суток культивирования, что может говорить о недостаточной концентрации сахара в среде. При использовании глюкозы в концентрации 2 % наблюдается снижение выхода продукта до $1,29 \pm 0,04$ г/л.

Также исследовали динамику изменения рН культуральной жидкости. Полученные данные представлены на рисунке 25.

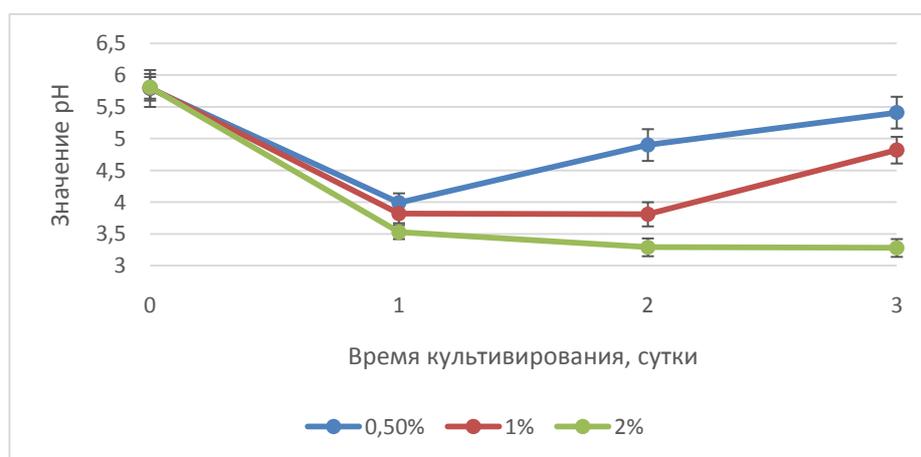


Рисунок 25 – Динамика изменения рН культуральной жидкости при культивировании *K. sacrofermentans* В-11267 на среде NS с различной концентрацией глюкозы

Из полученных данных видно, что на первые сутки происходит снижение значений рН во всех средах, причем чем больше концентрация глюкозы, тем ниже значение рН. Это вероятно вызвано образованием органических кислот. При концентрации сахаров 2 % наблюдается дальнейшее незначительное снижение рН до 3 суток культивирования. Вероятно, значительного повышения продуктивности не происходит вследствие снижения значения рН ниже оптимального.

При использовании среды HS с более низкой концентрацией сахаров – 0,5 % после первых суток культивирования происходит увеличение значения рН и не происходит увеличение выхода полимера. Это может говорить о потреблении образующихся органических кислот вследствие недостатка источников углерода в среде. При использовании среды HS с концентрацией глюкозы 1 % с первых по вторые сутки культивирования значение рН остается на постоянном уровне и его увеличение происходит на третьи сутки роста продуцента, вероятно вследствие потребления образующихся органических кислот.

Также изучали динамику изменения количества глюкозы в питательной среде в ходе культивирования (рис. 26).

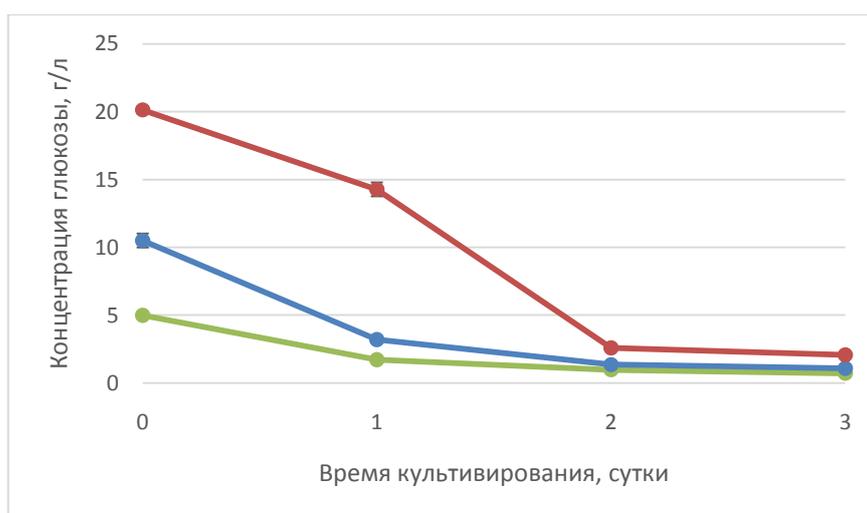


Рисунок 26 – Динамика изменения концентрации глюкозы в среде культивирования *K. sacrofermentans* В-11267 в течение 3 суток

Из полученных данных видно, что при использовании в качестве источника углерода глюкозу в количестве 0,5 % происходит активное потребление сахаров на 1 сутки культивирования до $1,71 \pm 0,12$ г/л. При дальнейшем культивировании не происходит значительное снижение количества сахаров. На 3 сутки содержание сахаров в среде составляет $0,71 \pm 0,02$ г/л.

При культивировании на среде с 1 % глюкозы наиболее активное потребление сахаров также происходит на первые сутки. Концентрация составляет $3,2 \pm 0,14$ г/л, и снижается до $1,07 \pm 0,05$ г/л к 3 суткам культивирования.

При дальнейшем увеличении концентрации сахаров до 2 % на первые сутки происходит снижение количества сахаров до $14,27 \pm 0,26$ г/л и до $2,06 \pm 0,12$ на 3 сутки.

Кроме того, изучалось влияние концентрации глицерина на образование БЦ. Данные по выходу полисахарида представлены на рисунке 27.

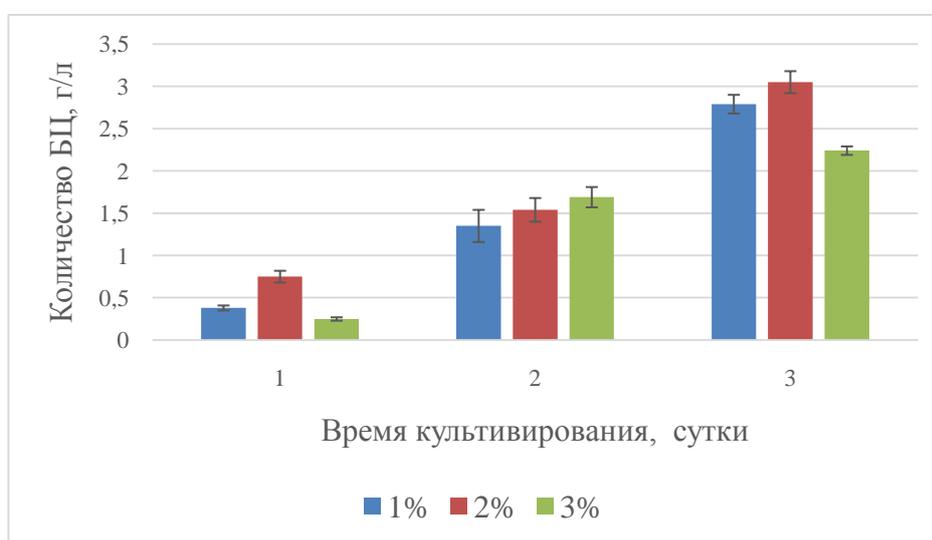


Рисунок 27 – Динамика образования целлюлозы на среде с разной концентрацией глицерина

Из полученных данных видно, что наибольший выход образуется на 3 сутки при использовании 2 % глицерина, и составляет $3,05 \pm 0,13$ г/л. При

увеличении концентрации глицерина не происходит увеличения образования полимера. На 3 сутки выход составил $2,24 \pm 0,05$ г/л. При уменьшении концентрации глицерина происходит незначительное снижение выхода конечного продукта до $2,79 \pm 0,11$ г/л на 3 сутки культивирования.

Кроме того, исследовали динамику изменения pH культуральной жидкости бактерий. Данные представлены на рисунке 28.

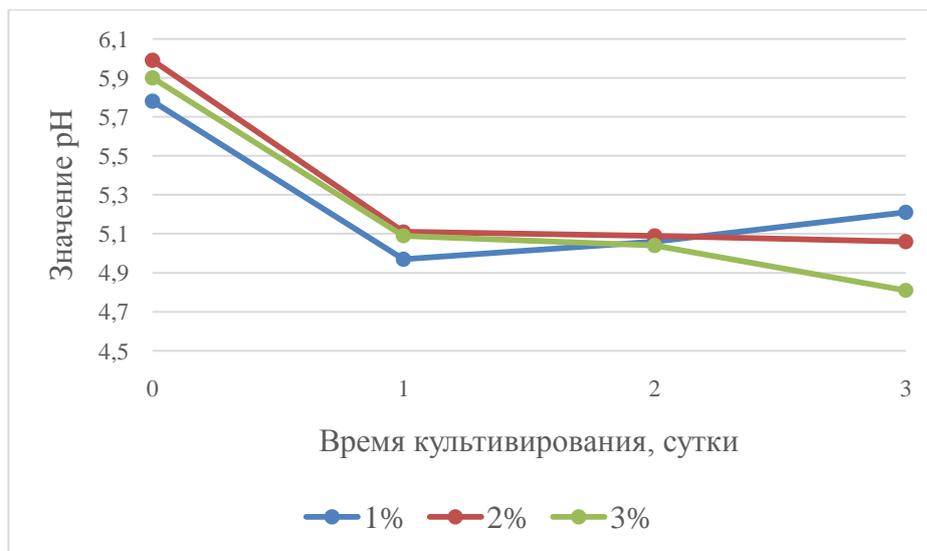


Рисунок 28 – Динамика изменения pH культуральной жидкости при культивировании на среде HS с различной концентрацией глицерина

Из полученных данных видно, что на первые сутки происходит резкое снижение значения pH до 5,09 – 4,97 на первые сутки культивирования. При дальнейшем культивировании до 3 суток происходит незначительное повышение значения pH.

Таким образом, можно сделать вывод что при использовании глюкозы наибольший выход образуется при концентрации сахара 1 %. А при использовании глицерина выход превышает выход на среде с глюкозой в 2 раза.

3.1.3 Изучение влияния органических кислот на выход бактериальной целлюлозы

Поскольку известно о положительном влиянии органических кислот на биосинтез целлюлозы, исследовали влияние органических кислот в количестве 0,5 % на образование БЦ. Кислоты ускоряют энергетический обмен, снижая образование глюконовой кислоты, а также выступают в роли дополнительного источника углерода (Keshk, 2014).

Данные представлены на рисунке 29. В качестве основы для среды использовали среду HS, среду HS с 10 г/л глюкозы и среду с дрожжевым экстрактом.

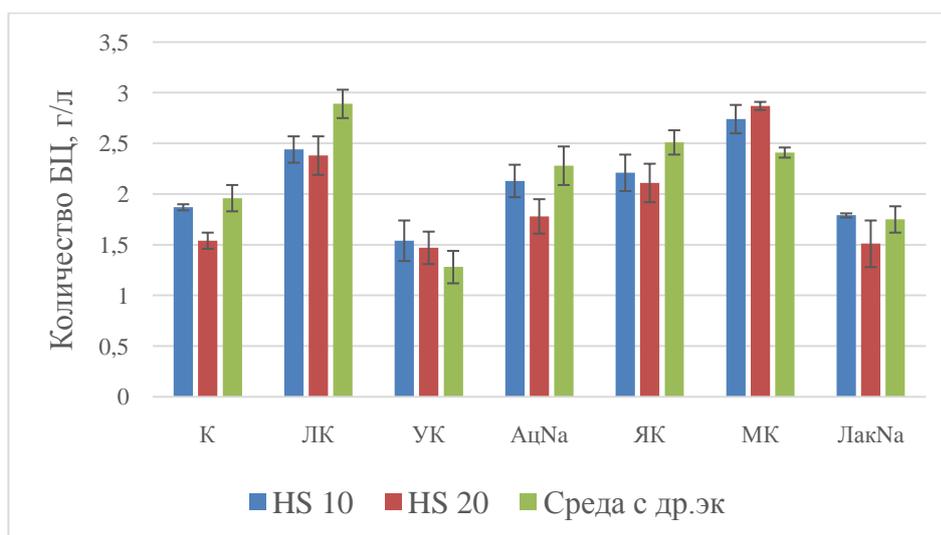


Рисунок 29 – Количество БЦ, образуемое на средах с органическими кислотами (0,5%) на 3 сутки культивирования

Из полученных данных видно, что наибольший выход на всех средах наблюдается при добавлении лимонной и молочной кислот, причем максимальный выход наблюдается при культивировании на среде с дрожжевым экстрактом. Максимальный выход достигает $2,41 \pm 0,05$ г/л при добавлении в среду 0,5 % лимонной кислоты.

Кроме того, определяли рН культуральной жидкости после 3 суток культивирования. Данные представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Изменение рН культуральной жидкости при культивировании бактерий *K. sucrofermentans* на средах с органическими кислотами за трое суток культивирования

Время культивирования, сутки	рН		
	После стерилизации	3 сут	
	V	V	M±m
1	2	3	4
HS 20 г/л			
Контроль	5,83	3,26 3,23 3,39	3,29±0,32
Лимонная	5,85	4,62 4,52 4,13	4,42±0,21
Уксусная	5,86	5,39 4,78 4,99	5,05±0,25
Ацетат Na	5,95	4,64 4,68 4,66	4,66±0,02
Янтарная	5,84	4,91 4,65 5,24	4,93±0,24
Молочная	5,94	4,35 4,58 4,63	4,52±0,12
Лактат Na	5,85	5,13 5,12 5,37	5,21±0,12
HS 10 г/л			
Контроль	5,84	5,30 5,46 5,58	5,45±0,15
Лимонная	5,93	6,12 6,13 5,53	5,93±0,28
Уксусная	5,85	5,54 5,47 6,14	5,72±0,30
Ацетат Na	5,84	6,59 6,62 6,38	6,53±0,11

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4
Янтарная	5,94	5,80 5,83 6,25	5,96±0,20
Молочная	5,85	5,77 6,16 6,03	5,99±0,16
Лактат Na	5,87	5,43 5,41 5,65	5,50±0,11
Среда с дрожжевым экстрактом			
Контроль	5,84	5,30 5,55 5,50	5,45±0,11
Лимонная	5,93	6,28 6,37 6,16	6,27±0,09
Уксусная	5,95	5,68 5,36 5,43	5,49±0,14
Ацетат Na	5,84	5,20 5,04 5,62	5,29±0,24
Янтарная	5,84	5,70 5,58 6,25	5,84±0,29
Молочная	5,95	6,35 6,57 6,61	6,51±0,11
Лактат Na	5,87	6,00 5,98 5,52	5,83±0,22
Лактат Na	5,87	5,43 5,41 5,65	5,50±0,11
Среда с дрожжевым экстрактом			
Контроль	5,84	5,30 5,55 5,50	5,45±0,11
Лимонная	5,93	6,28 6,37 6,16	6,27±0,09
Уксусная	5,95	5,68 5,36 5,43	5,49±0,14
Ацетат Na	5,84	5,20 5,04 5,62	5,29±0,24

Окончание таблицы 10

1	2	3	4
Янтарная	5,84	5,70 5,58 6,25	5,84±0,29
Молочная	5,95	6,35 6,57 6,61	6,51±0,11
Лактат Na	5,87	6,00 5,98 5,52	5,83±0,22

Из полученных данных видно, что при добавлении в среду органических кислот наблюдается заметное увеличение рН культуральной жидкости после культивирования, что может свидетельствовать о том, что при потреблении кислот из питательной среды микроорганизмы в меньшей степени образуют побочные продукты, в виде органических кислот.

Так же можно заметить, снижение конечного рН до 5,45 в модифицированных средах с содержанием глюкозы 10 г/л, относительно 3,29 в контрольной среде. Это подтверждает литературные и опытные данные, что повышенная концентрация глюкозы, негативно влияет на выход продукта в следствии снижения рН ниже оптимального значения.

Кроме того, исследовали влияние органических кислот при добавлении в среду содержащую различные источники углерода в концентрации 20 г/л. А именно, глюкозы, фруктозы, сахарозы и маннита. Данные представлены на рисунке 30.

Из графика видно, что наибольший выход наблюдается при культивировании на среде с глицерином при добавлении янтарной кислоты – 3,16±0,04 г/л.

Можно заметить, что органические кислоты, а именно: молочная, лимонная и янтарная положительно влияют на биосинтез бактериальной целлюлозы. В целом выход при использовании 0,5 % органических кислот увеличивается в 1,5 раза.

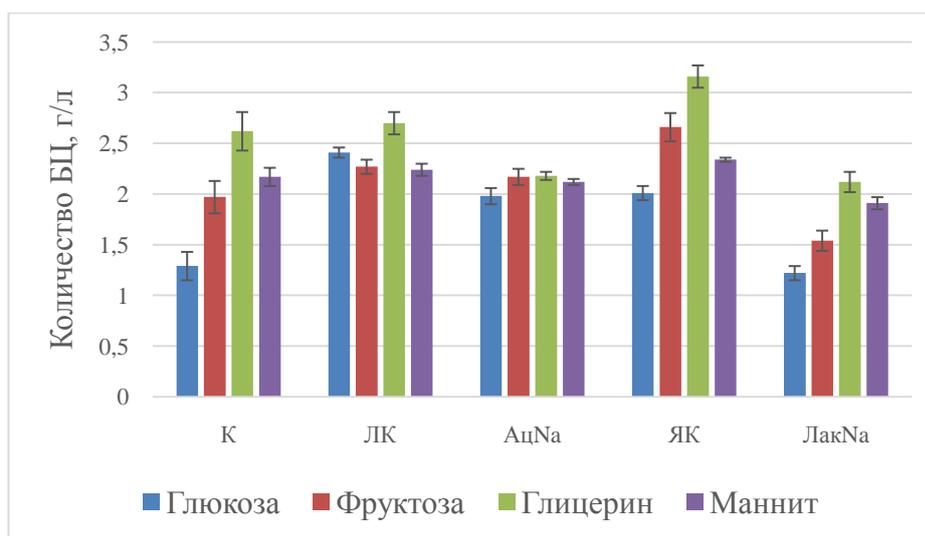


Рисунок 30 – Количество БЦ, образуемое на средах с органическими кислотами (0,5 %) на 3 сутки культивирования

Таким образом, в ходе проведенных исследований установили, что наилучшим источником углерода для образования целлюлозы является глицерин, выход увеличивается на 95 % относительно контроля. Кроме того, наименьшая ширина волокна $36,61 \pm 6,033$ нм также наблюдается при использовании глицерина. Кроме того, определили, что при дополнительном внесении в данную среду 0,5 % янтарной кислоты наблюдается наибольший выход 3,16 г/л, что выше на 57 % относительно контрольной среды.

3.2 Использование отходов для получения бактериальной целлюлозы

3.2.1 Сравнение образования бактериальной целлюлозы на стандартной среде и средах на основе мелассы и барды

В настоящее время внимание исследователей направлено на использовании вторичных материальных ресурсов в качестве основы питательных сред для получения БЦ. Эти среды не только позволяют увеличить выход продукта, но и существенно снизить себестоимость продукта.

Для исследования были выбраны два отхода – меласса и послеспиртовая барда. Данные по образованию целлюлозы представлены на рисунке 31.

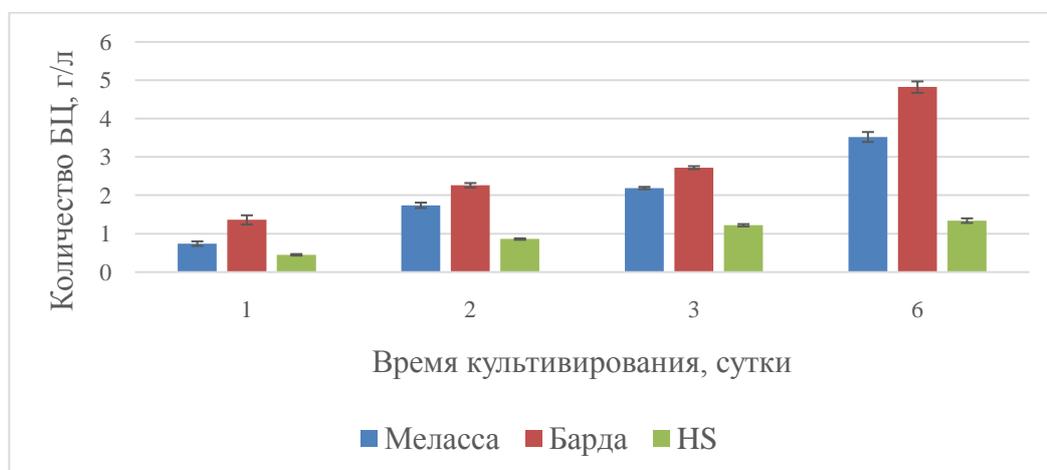


Рисунок 31 – Динамика образования целлюлозы на различных средах

Изучалась динамика изменения pH культуральной жидкости (рис. 32).

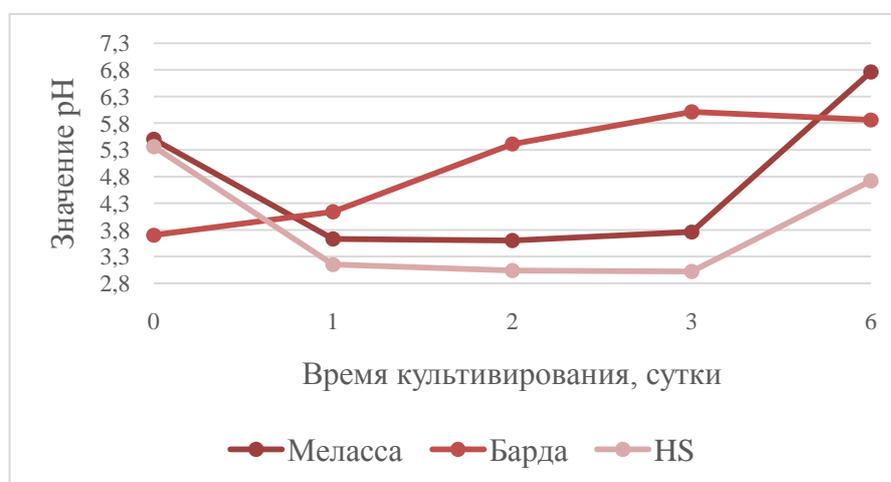


Рисунок 32 – Динамика изменения pH при культивировании продуцента на различных средах

Из полученных данных видно, что при культивировании на среде HS происходит значительное понижение значения pH, что вероятно вызвано образованием глюконовой кислоты. Значение pH снижается с 5,36 до 3,02 на 3 сутки культивирования. Дальнейшее повышение pH может быть вызвано потреблением органических кислот из среды. При культивировании на среде с

бардой наблюдается повышение рН, что связано с потреблением органических кислот из питательной среды. При культивировании на среде, содержащей мелассу происходят процессы сходные со средой HS, что связано с тем что при использовании сахаров мелассы также образуются органические кислоты.

Для определения потребления веществ в процессе культивирования проводили ВЭЖХ-анализ образцов культуральной среды на основе барды (табл. 11).

Таблица 11 – Сахара, монокарбоновые кислоты и декстрины, содержащиеся в барде и динамика их изменения при культивировании

Время культивирования, сутки	Концентрация сахаров в среде, г/л			
	Монокарбоновые кислоты	Пентозы	Гексозы	Декстрины
0	1,55±0,25	1,30±0,15	0,60±0,13	0,84±0,12
1	0,78±0,12	1,01±0,14	0,47±0,11	0,63±0,10
2	0,24±0,10	0,29±0,11	0,33±0,11	0,54±0,10
3	0,11±0,10	0,15±0,10	0,15±0,10	0,40±0,10

Из полученных данных видно, что за три дня культивирования продуцента на послеспиртовой барде содержание пентоз уменьшилось с 1,3±0,15 мг / мл до 0,15±0,11 мг / мл. Содержание гексоз в исходной среде составляло 0,6±0,13 мг/мл, и уменьшилось в ходе культивирования до 0,15±0,10 мг / мл, а содержание декстринов изменилось с 0,84±0,12 мг / мл до 0,4±0,10 мг / мл. Кроме того, можно заметить снижение концентрации монокарбоновых кислот в культуральной жидкости с 1,55±0,25 мг / мл до 0,11±0,10 мг / мл.

В ходе исследования определяли состав питательной среды на основе мелассы концентрацией 5 % при начальном рН 4,5 (табл. 12).

Из полученных данных видно, что при данном значении рН сахара мелассы частично гидролизуются на глюкозу и фруктозу. В ходе культивирования практически не происходит потребление сахарозы. Ее

количество уменьшается с $15,13 \pm 0,15$ г/л до $14,01 \pm 0,05$ г/л на 3 сутки культивирования. При этом происходит активное потребление глюкозы и фруктозы, концентрация которых снижается до $1,81 \pm 0,15$ и $3,13 \pm 0,15$ г/л соответственно.

Таблица 12 – Динамика изменения количества сахаров в среде с мелассой

Время культивирования, сутки	Концентрация сахаров в среде, г/л			
	Сахароза	Глюкоза	Фруктоза	Общее количество сахаров
0	$15,13 \pm 0,15$	$6,02 \pm 0,23$	$8,04 \pm 0,02$	$29,19 \pm 0,40$
1	$14,68 \pm 0,06$	$2,51 \pm 0,19$	$5,69 \pm 0,14$	$22,88 \pm 0,39$
2	$14,05 \pm 0,15$	$2,15 \pm 0,15$	$4,36 \pm 0,09$	$20,56 \pm 0,39$
3	$14,01 \pm 0,05$	$1,81 \pm 0,15$	$3,13 \pm 0,15$	$18,95 \pm 0,35$

В среде HS единственным источником углерода является глюкоза в концентрации 20 г/л. Динамика изменения концентрации глюкозы приведена в таблице 13.

Таблица 13 – Динамика изменения количества глюкозы в среде HS

Время культивирования, сутки	Концентрация глюкозы в среде, г/л
0	$20,13 \pm 0,15$
1	$14,27 \pm 0,13$
2	$2,58 \pm 0,07$
3	$2,06 \pm 0,05$

Можно заметить, что концентрация глюкозы снижается до $2,06 \pm 0,12$ г/л за 3 суток культивирования. Наибольшее потребление глюкозы наблюдается на 2 сутки культивирования с $14,27$ до $2,58$ г/л.

Известно, что состав среды влияет не только на выход целлюлозы, но и на ее структуру. Изучали структуру целлюлозы методом ИК и рентгеноструктурного анализа.

Определяли содержание α и β , а также индекс кристалличности по ИК спектрам целлюлозы. Данные представлены в таблице 14. Согласно полученным данным наименьший индекс кристалличности наблюдается на среде HS – $1,54 \pm 0,06$.

Таблица 14 – Индекс кристалличности, содержание α и β фаз и степень кристалличности у БЦ, полученной на различных средах

БЦ	I α , %	I β , %	Индекс кристалличности	Степень кристалличности, %
Меласса	$43,9 \pm 0,9$	$56,1 \pm 0,9$	$1,69 \pm 0,1$	83,0
Барда	$44,4 \pm 0,4$	$55,6 \pm 0,4$	$1,65 \pm 0,1$	82,3
HS	$44,9 \pm 0,7$	$55,1 \pm 0,7$	$1,54 \pm 0,1$	79,7

Содержание α фазы практически не изменяется в изученных образцах с учетом погрешности. Однако оно незначительно меньше у целлюлозы, полученной на среде с мелассой. Это может быть связано с наличием дополнительных веществ в мелассе, влияющих на сборку молекулы целлюлозы.

Полученные XRD-спектры бактериальной целлюлозы представлены на рисунке 33.

На всех полученных спектрах выделяются 3 основных кристаллических пика около $14,4^\circ$, $16,7^\circ$ и $22,4^\circ$, что согласуется с литературными данными.

Показано, что на среде с мелассой и бардой наблюдается большая степень кристалличности БЦ (83,02 и 82,3 соответственно) чем на стандартной среде HS (79,7 %) (табл. 14). Расчетные межплоскостные расстояния кристалла (d -расстояния) и размеры кристаллитов также приведены в таблице 15.

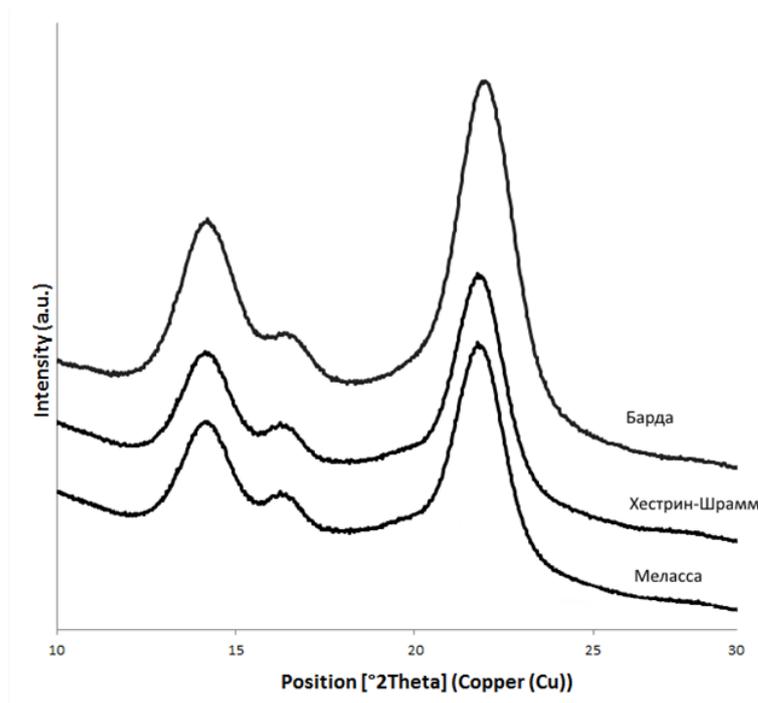


Рисунок 33 – Спектры рентгеновской дифракции (режим отражения) БЦ, полученной на среде с мелассой, бардой и стандартной среде HS

Таблица 15 – d-расстояния (d) и размер кристаллитов (ACS) в целлюлозе, полученной на различных средах

	(100)		(010)		(110)	
	(nm)	CS (nm)	(nm)	CS (nm)	(nm)	CS (nm)
Меласса	0,60	4,6	0,52	2,9	0,39	3,6
Барда	0,61	4,2	0,53	3,4	0,40	3,6
HS	0,61	4,4	0,53	4,0	0,40	3,9

Расстояние d_{100} , d_{010} и d_{110} на среде с мелассой и размеры кристаллитов на мелассе несколько ниже чем на среде HS и барде. Wada с соавторами показали, что расстояния d_{100} и d_{110} у α целлюлозы были больше, чем у β , тогда как d_{010} был меньшим (Wada and Okano, 1997). Следовательно, у образца, полученного на мелассе, несколько меньшее количество α целлюлозы, что также подтверждают данные ИК-спектроскопии. Различия в d-расстояниях связаны с различиями в размерах поперечного сечения кристаллитов целлюлозы. Размер кристаллитов целлюлозы мал, как правило, около 5 нм. На

мелассе наблюдается меньший размер кристаллитов. Разница в этих параметрах может быть связана с веществами в культуральной среде, которые могут влиять на сбор цепей внутри кристаллита (Tokoh et al., 2002). Такие вещества могут присутствовать в агропромышленных отходах.

Исследовали структуру БЦ, полученной на среде с мелассой, бардой и HS с помощью АСМ. Изображение представлено на рисунке 34.

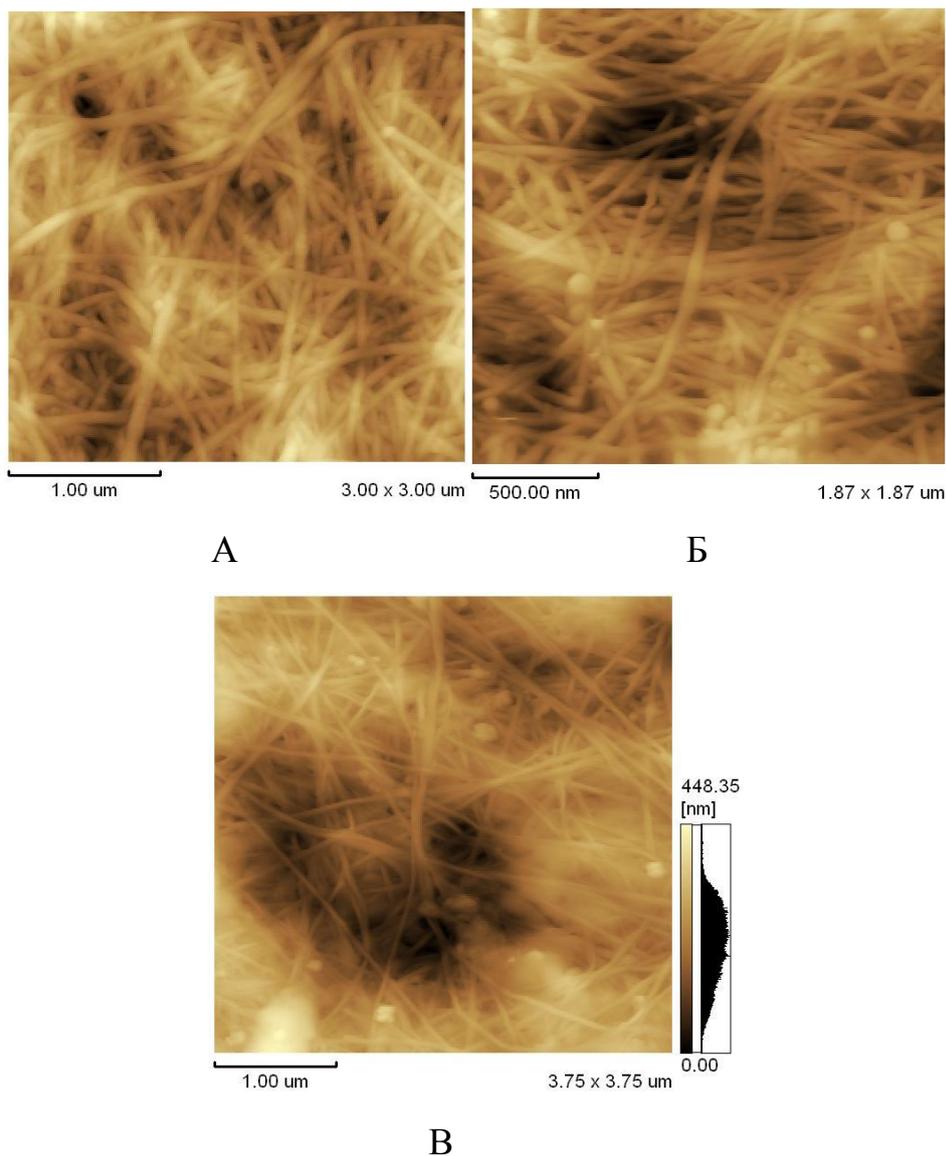


Рисунок 34 – АСМ-изображения БЦ, полученной на различных средах: А – меласса, Б – послеспиртовая барда, В – HS

Ширина волокон представлена на рисунке 35. Более тонкие волокна образуются на среде с бардой, и составляют в среднем $36 \pm 6,0$ нм. При

культивировании на среде с мелассой, были обнаружены волокна толщиной $56 \pm 8,2$ нм. Толщина фибрилл бактериальной целлюлозы, сформированных на стандартной среде HS, составляла в среднем $54 \pm 5,5$ нм.

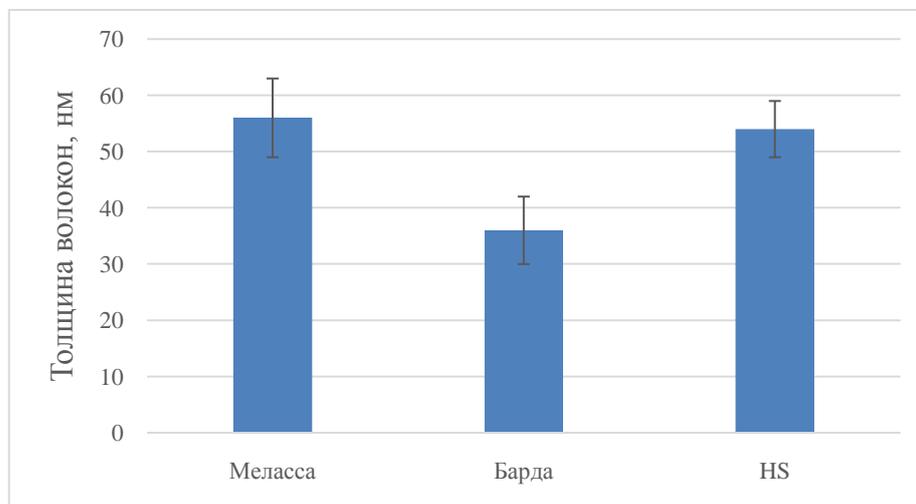


Рисунок 35 – Толщина волокон БЦ, полученной на различных средах

Из полученных результатов можно отметить, что при использовании отходов биотехнологических производств, а именно мелассы и барды образуется значительно большее количество бактериальной целлюлозы, чем на стандартной среде HS. При этом наибольший выход отмечается на среде с послеспиртовой бардой – $4,82 \pm 0,15$ г/л. Кроме того, при использовании этих сред не происходит изменения структуры полимера.

3.2.2 Изучение образования бактериальной целлюлозы на послеспиртовой барде

3.2.2.1 Изучение влияния органических кислот

Согласно литературным данным положительное влияние на биосинтез БЦ оказывают органические кислоты: уксусная, молочная, аскорбиновая и т.д (Keshk, 2014).

Исследовалась динамика образования БЦ при культивировании продуцента в шейкере-инкубаторе при перемешивании со скоростью

250 об/мин и температуре 28 °С на барде с добавлением органических кислот в концентрации 0,5 % (рис. 36).

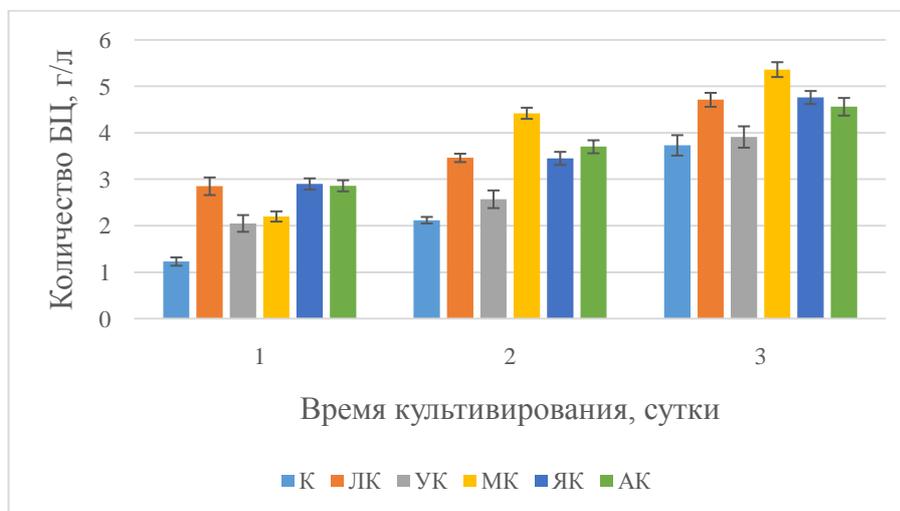


Рисунок 36 – Динамика образования бактериальной целлюлозы

K. sucrofermentans В-11267 на среде с органическими кислотами:

К – контроль без добавок; ЛК – с добавлением лимонной кислоты; УК – с добавлением уксусной кислоты; МК – с добавлением молочной кислоты; ЯК – с добавлением янтарной кислоты; АК – с добавлением аскорбиновой кислоты

Показано, что наибольшее количество полисахарида образуется на 3 сутки культивирования на барде с добавлением молочной кислоты – $5,36 \pm 0,13$ г/л, что значительно выше по сравнению с контролем без добавок ($3,73 \pm 0,14$ г/л). При добавлении лимонной и янтарной кислот также наблюдается увеличение выхода полимера до $4,71 \pm 0,14$ и $4,76 \pm 0,07$ г/л соответственно.

Динамика изменения рН в ходе культивирования представлена на рисунке 37. Из полученных данных видно, что при добавлении органических кислот происходит более интенсивное защелачивание среды. Значение рН изменяется в контроле за 3 суток культивирования с 3,92 до 5,18. При добавлении молочной кислоты, рН повышается до 5,62, что может говорить, об активном поглощении кислот бактериями. Наибольшее значение рН наблюдается при внесении в среду 0,5 % янтарной кислоты.

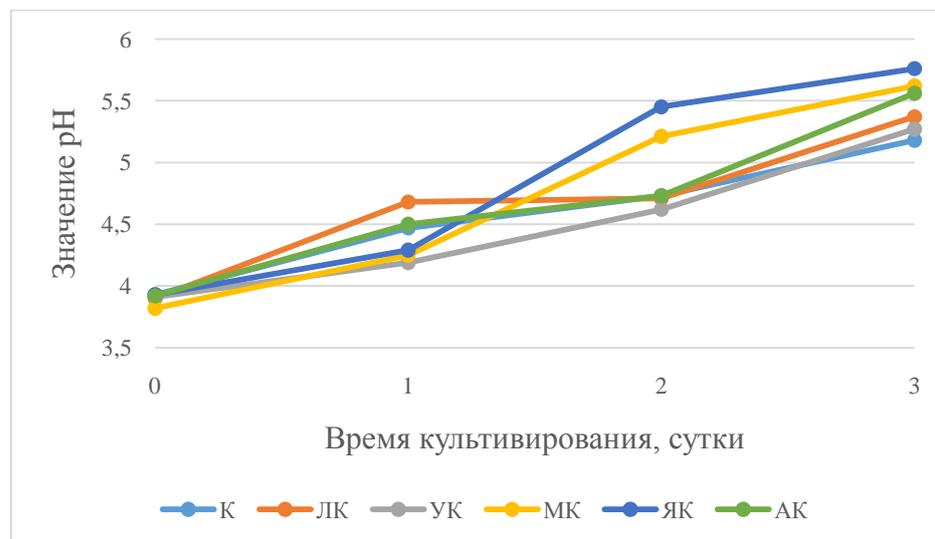


Рисунок 37 – Динамика изменения рН культуральной жидкости *K. sacrofermentans* на средах с органическими кислотами

Как и на стандартной среде при добавлении дополнительных органических кислот в послеспиртовую барду наблюдается повышение уровня биосинтеза продукта. Наибольший выход наблюдается при использовании молочной кислоты.

3.2.2.2 Изучение влияния глицерина

Из литературных источников так же известно о положительном влиянии глицерина на образование БЦ. Корейские ученые Jung с сотрудниками исследовали влияние глицерина на образование БЦ бактерией *Acetobacter* sp. V6 при динамическом культивировании в колбах (Jung et al., 2010).

Поэтому нами исследовалось влияние добавок глицерина в послеспиртовую барду в концентрации 0,5 %, 1 %, 2 % и 3 %. Контролем служит послеспиртовая барда без добавок. Полученные данные представлены на рисунке 38.

Из полученных данных видно, что наибольшее количество бактериальной целлюлозы образуется на среде с 1 % глицерина на 3 сутки культивирования: $4,17 \pm 0,19$ г/л. При увеличении концентрации добавляемого глицерина выход продукта снижается. При использовании добавок глицерина в концентрации 2 % и 3 % выход БЦ составил $3,32 \pm 0,03$ г/л и $2,98 \pm 0,09$ г/л на третьи сутки

культивирования, соответственно. Возможно, это связано с тем, что избыточное содержание источников углерода может ингибировать рост клеток и производство целлюлозы.

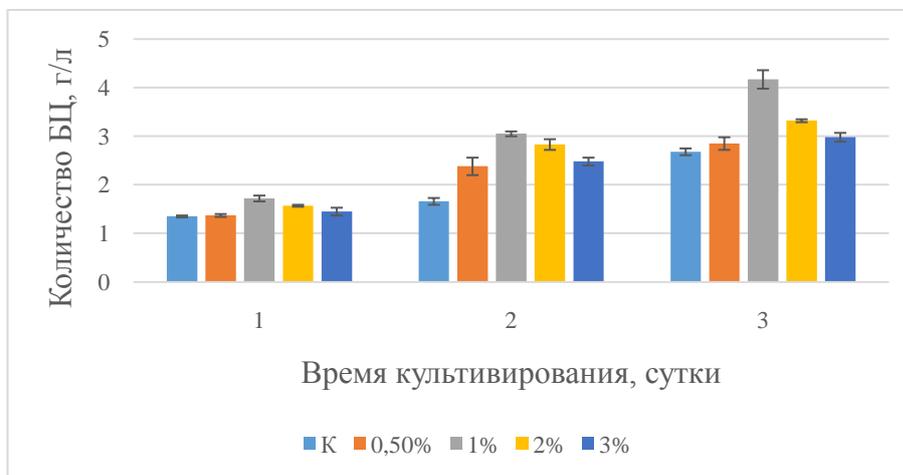


Рисунок 38 – Динамика образования бактериальной целлюлозы *K. sacrofermentans* В-11267 на среде с глицерином

Таким образом, глицерин в концентрации 1 % положительно влияет на образование БЦ и способствует максимальному выходу полисахарида.

Исследовалась также динамика изменения рН культуральной жидкости бактерий *K. sacrofermentans* в процессе культивирования. Полученные данные представлены на рисунке 39.

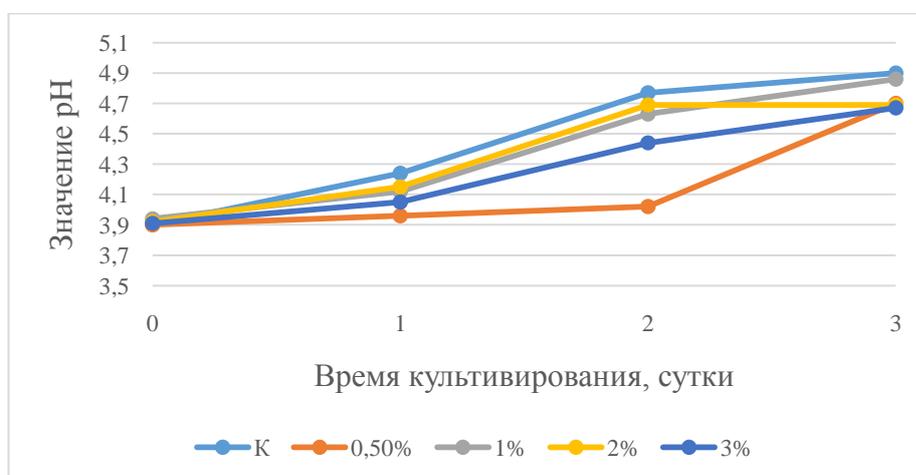


Рисунок 39 – Динамика изменения рН культуральной жидкости при культивировании *K. sacrofermentans* В-11267 на среде с глицерином

Из полученных данных видно, что при культивировании происходит увеличение значения рН, что вызвано потреблением органических кислот из среды. Причем при добавлении глицерина можно заметить более низкое значение рН, чем в контрольной среде, что может говорить о менее активном потреблении кислот из среды при наличии доступного источника углерода в виде глицерина.

Таким образом, можно сделать вывод о положительном влиянии глицерина в концентрации 1 % на образование БЦ.

3.2.2.3 Исследование влияния сахаров на образование бактериальной целлюлозы

Исследовалось образование бактериальной целлюлозы на барде с добавлением сахаров – глюкозы, сахарозы, фруктозы и лактозы в количестве 20 г/л. Полученные данные представлены на рисунке 40.

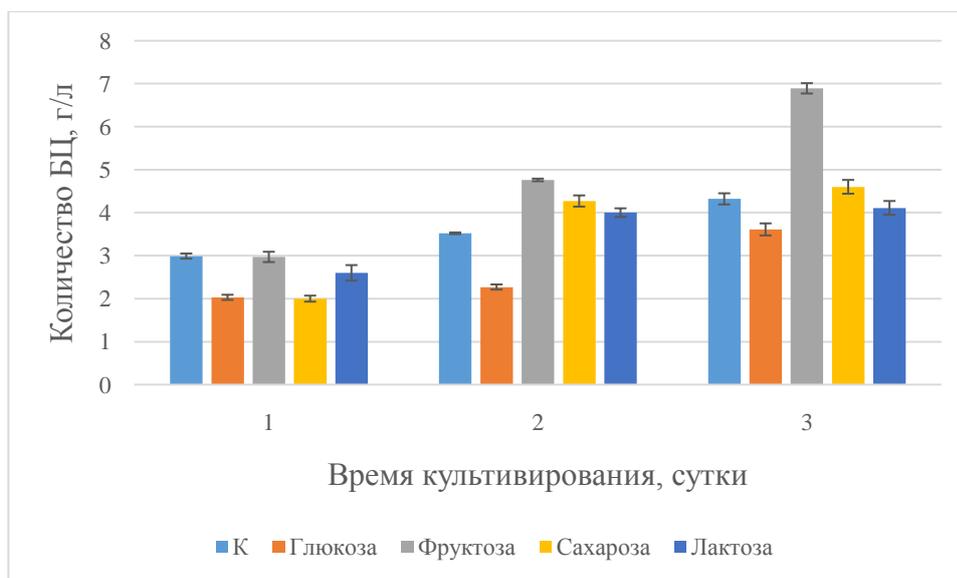


Рисунок 40 – Динамика образования бактериальной целлюлозы *K. sacrofermentans* В-11267 на среде с сахарами в количестве 2 %

Из полученных данных видно, что наибольшее количество БЦ образуется на барде на 3 сутки культивирования на среде с добавлением фруктозы – $6,89 \pm 0,12$ г/л, относительно контроля – $4,32 \pm 0,13$ г/л. Незначительное увеличение выхода наблюдается на 3 сутки при добавлении сахарозы –

4,61±0,16 г/л. При добавлении глюкозы снижается количество БЦ относительно контроля до 3,61 г/л. При добавлении лактозы не наблюдается повышения образования целлюлозы. Количество полисахарида на среде с лактозой практически не отличалось от значения в контроле.

Исследовалась также динамика рН культуральной жидкости *K. sacrofermentans*. Полученные данные представлены на рисунке 41.

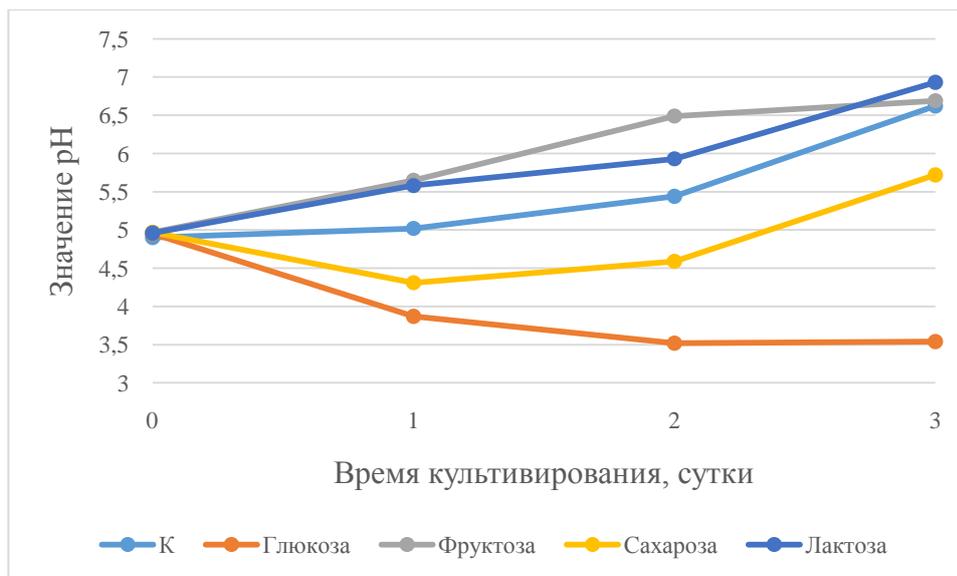


Рисунок 41 – Динамика изменения рН культуральной жидкости на среде с сахарами в количестве 2 %

Согласно представленным данным, в контроле рН повышается за 3 сутки до 6,62; при добавлении фруктозы и сахарозы также повышается до 6,49 и 5,72 соответственно. При добавлении лактозы динамика изменения рН среды носит сходный характер и не отличается от контроля – увеличивается с 4,21 до 6,93.

При добавлении глюкозы рН уменьшается с 4,22 до 3,54. Такое снижение рН возможно возникло из-за образования в процессе жизнедеятельности бактерий глюконовой кислоты. Следствием чего является низкий выход БЦ.

Послеспиртовая барда содержит в своем составе большое количество питательных веществ, в частности органических кислот. Однако, дополнительное внесение источников углерода, а именно фруктозы,

положительно влияет на процессы биосинтеза и повышает выход продукта в 1,6 раза на 3 сутки культивирования относительно контрольной среды.

3.2.2.4 Изучение образования бактериальной целлюлозы на барде с мелассой

Из литературных источников известно о положительном влиянии мелассы на выход БЦ. Меласса содержит около 80 % сухих веществ, из которых около 48 % представлено сахарозой. В нашем исследовании использовалась среда с мелассой в количествах 1 %, 2 % и 3 %. Полученные результаты представлены на рисунке 42.

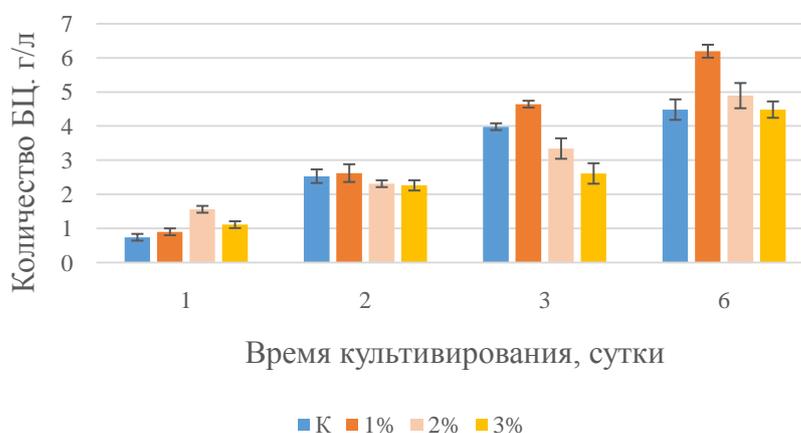


Рисунок 42 – Динамика образования бактериальной целлюлозы *K. sucrofermentans* В-11267 на барде с добавлением мелассы

Из представленных данных видно, что наибольший выход БЦ наблюдается на среде с добавлением мелассы в количестве 1 % – $6,19 \pm 0,06$ г/л на 6 сутки культивирования. При концентрации мелассы в среде 2 % наибольшее количество БЦ также образуется на 6 сутки и составляет $4,89 \pm 0,15$ г/л. При этом выход в контрольной среде составил $4,48 \pm 0,17$ г/л.

Уменьшение выхода целлюлозы при увеличении концентрации мелассы также вероятно связано с образованием глюконовой кислоты, в связи с чем определяли рН культуральной жидкости в ходе культивирования, данные представлены на рисунке 43.

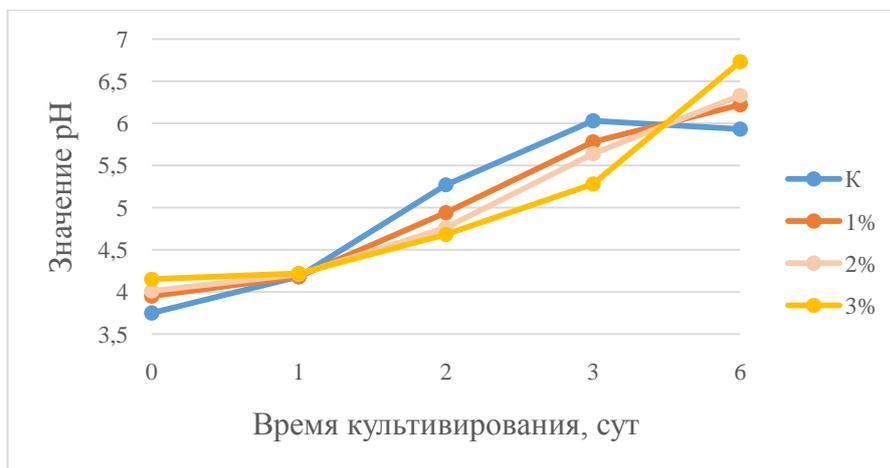


Рисунок 43 – Динамика изменения pH культуральной жидкости на барде с добавлением мелассы

Из представленных данных видно, что pH культуральной жидкости возрастает в ходе культивирования, что может свидетельствовать о потреблении органических кислот из среды.

Таким образом, в ходе проведенных исследований показано, что при добавлении к среде на основе барды мелассы наибольший выход наблюдается при использовании 1 % мелассы.

3.2.2.5 Изучение влияния полисахаридов на синтез бактериальной целлюлозы

Из литературных данных известно о влиянии различных полисахаридов на образование БЦ. В частности, водорастворимого полисахарида ацетана, который синтезируется помимо БЦ бактериями рода *Acetobacter*, а также агара. Структура ацетана сходна со структурой ксантана. Положительное влияние, объяснено, меньшим повреждением клеток в процессе перемешивания и меньшей коагуляцией клеток продуцента (Ishida et al., 2003).

В опыте использовались желатин, крахмал, ксантан, кукурузная мука, агар в количестве 0,1 %. Исследовалась динамика образования бактериальной целлюлозы, данные представлены на рисунке 44.

Как видно из графика, при добавлении загустителей происходит незначительное повышение выхода. Наибольший выход наблюдается на 3 сутки

при добавлении желатина и кукурузной муки – $4,89 \pm 0,17$ и $5,02 \pm 0,08$ г/л. Что на 0,77 и 0,9 больше чем в контроле.

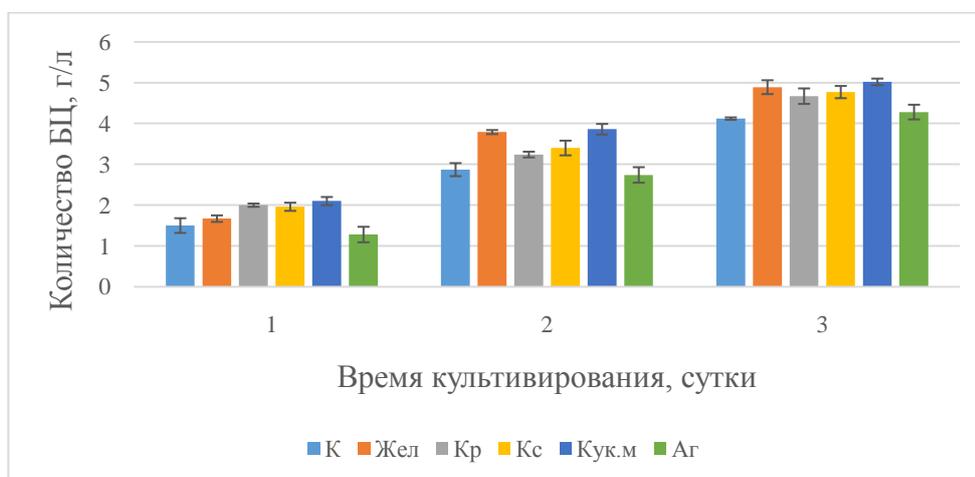


Рисунок 44 – Динамика образования бактериальной целлюлозы *K. sucrofermentans* В-11267 на среде с загустителями

Как видно из графика, при добавлении загустителей происходит не значительное повышение выхода. Наибольший выход наблюдается на 3 сутки при добавлении желатина и кукурузной муки – $4,89 \pm 0,17$ и $5,02 \pm 0,08$ г/л. Что на 0,77 и 0,9 больше чем в контроле.

Исследовалась также динамика изменения рН (рис. 45).

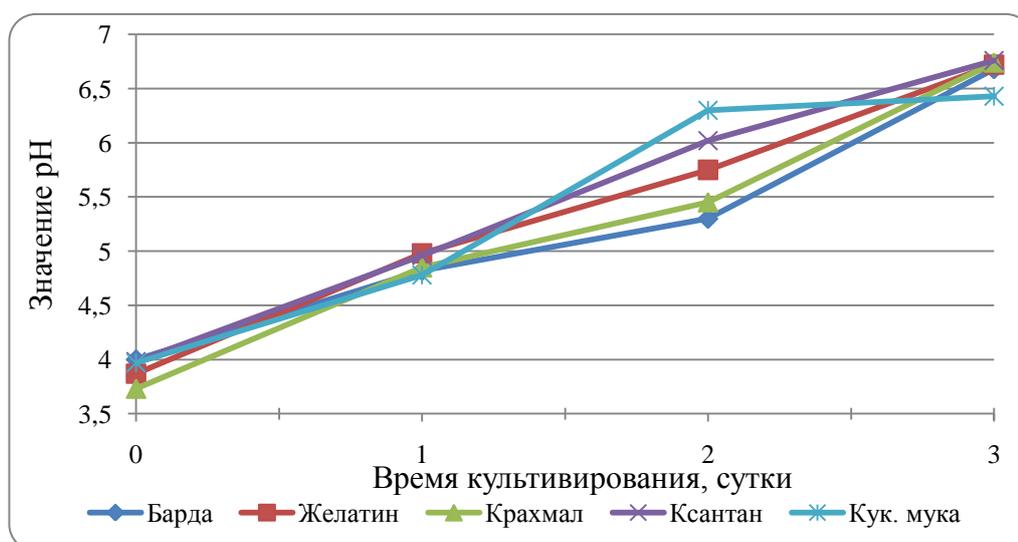


Рисунок 45 – Динамика изменения рН на средах с добавлением различных загустителей

Исследовалась динамика образования бактериальной целлюлозы при добавлении МКЦ и КМЦ. Концентрация добавляемой целлюлозы 0,1 %. Данные представлены на рисунке 46.

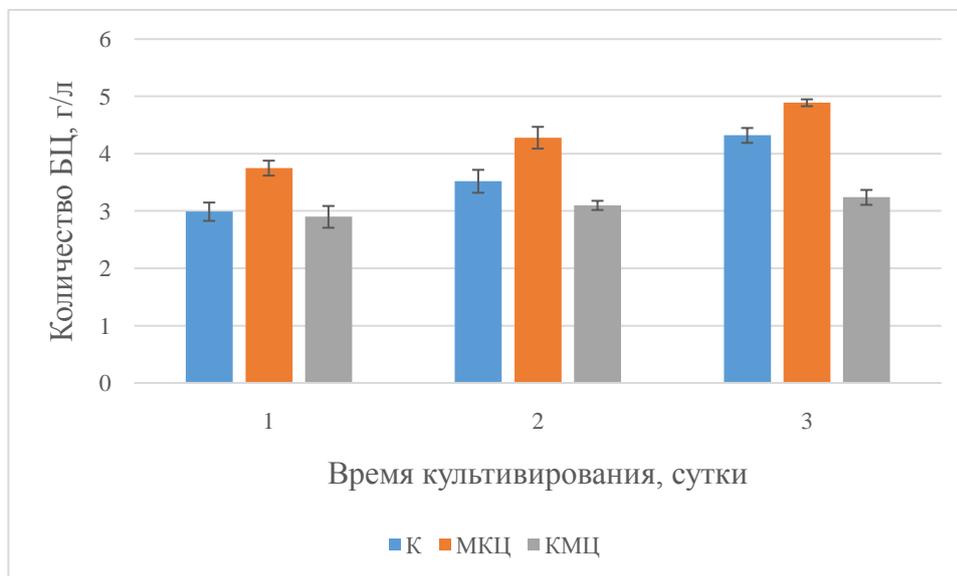


Рисунок 46 – Динамика образования БЦ на барде с добавлением МКЦ и КМЦ

Исследовалась динамика изменения рН. Данные представлены на рисунке 47.

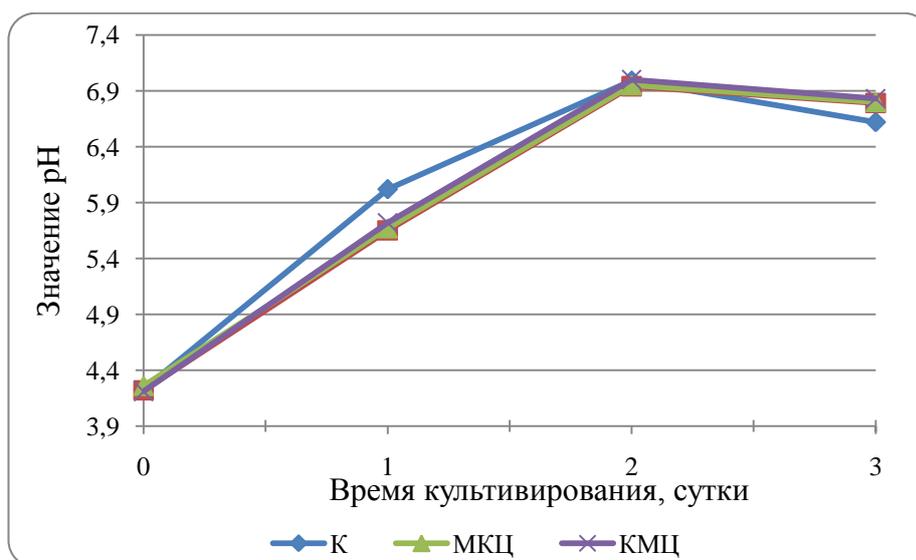


Рисунок 47 – Динамика изменения рН на средах с добавлением МКЦ и КМЦ.

Наблюдается повышение значения рН на всех средах в ходе культивирования.

Таким образом, можно заметить, что добавление в среду полисахаридов приводит к незначительному увеличению выхода продукта. Что вероятно связано с положительным воздействием более густой среды на клетки продуцента.

3.2.2.6 Изучение влияния источников азота на образование бактериальной целлюлозы

В нашем опыте были выбраны следующие источники азота: пептон и дрожжевой экстракт, а также соли аммония: азотнокислый, сернокислый и лимоннокислый аммоний, как добавка к послеспиртовой барде в количестве 0,5 %. Данные по образованию целлюлозы представлены на рисунке 48.

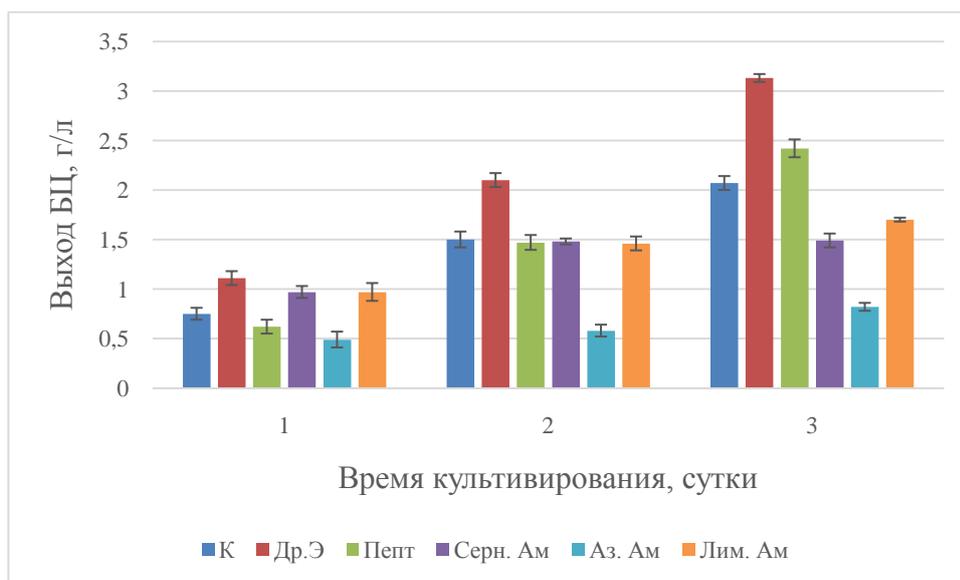


Рисунок 48 – Динамика образования бактериальной целлюлозы *K. sacrofermentans* В-11267 на средах с различными источниками азота в количестве 0,5 %.

Из данного графика видно, что наилучшими источниками азота являются пептон и дрожжевой экстракт. При добавлении дрожжевого экстракта выход превышает контроль на всех сутках культивирования, и достигает 3,13 г/л на третьи сутки культивирования. При добавлении пептона на третьи сутки

культивирования выход достигает 2,43 г/л. Существенное снижение биосинтеза полимера наблюдается при добавлении азотнокислого аммония, вероятно, из-за ингибирующего воздействия нитратов.

Исследовалась также динамика изменения рН культуральной жидкости *K. sacrofermentans*. Полученные данные представлены на рисунке 49.

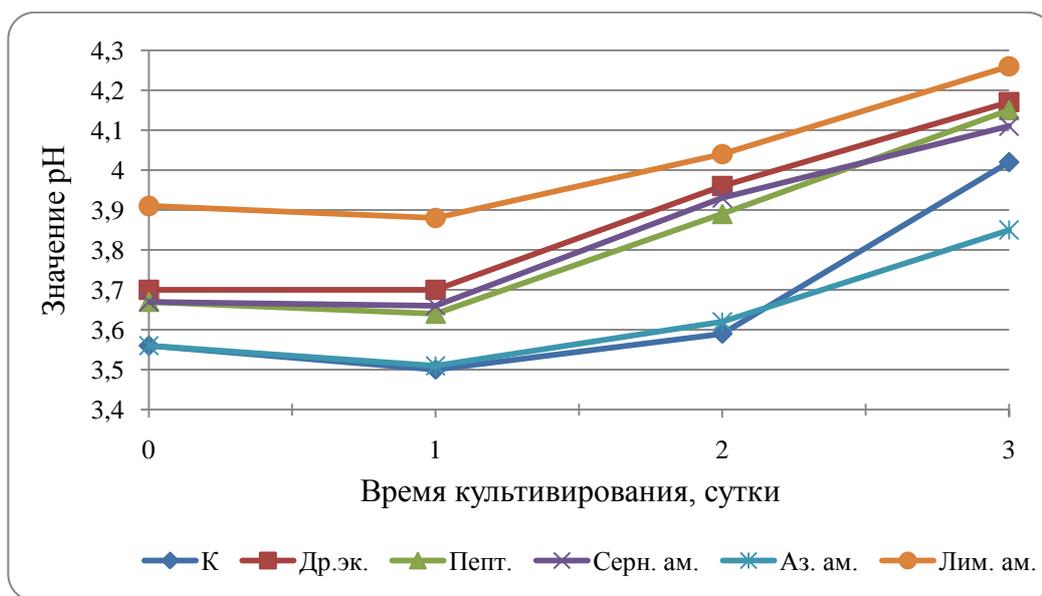


Рисунок 49 – Динамика изменения рН культуральной жидкости *K. sacrofermentans* В-11267 на средах с различными источниками азота в количестве 0,5 %

Из этих данных видно, что в ходе культивирования происходит увеличение значения рН вследствие поглощения органических кислот среды. Наименьшее значение рН наблюдается на среде с добавлением азотнокислого аммония, где и наблюдается наименьший выход продукта, что свидетельствует о наименьшей активности продуцента на данной среде.

Таким образом, можно заметить, что добавление дрожжевого экстракта как источника азота и витаминов приводит к увеличению образования продукта в 1,5 раза относительно контроля на 3 сутки культивирования.

3.2.2.7 Изучение влияния значения рН при культивировании на послеспиртовой барде

В ходе эксперимента было обнаружено, что рН барды достигает 3,90, условно принятая нами за 4. В связи с чем, мы исследовали следующие значения рН, которые мы доводили, используя 1 Н раствор серной кислоты и гидроксида натрия – 3, 5 и 6. Данные по образованию целлюлозы представлены на рисунке 50.

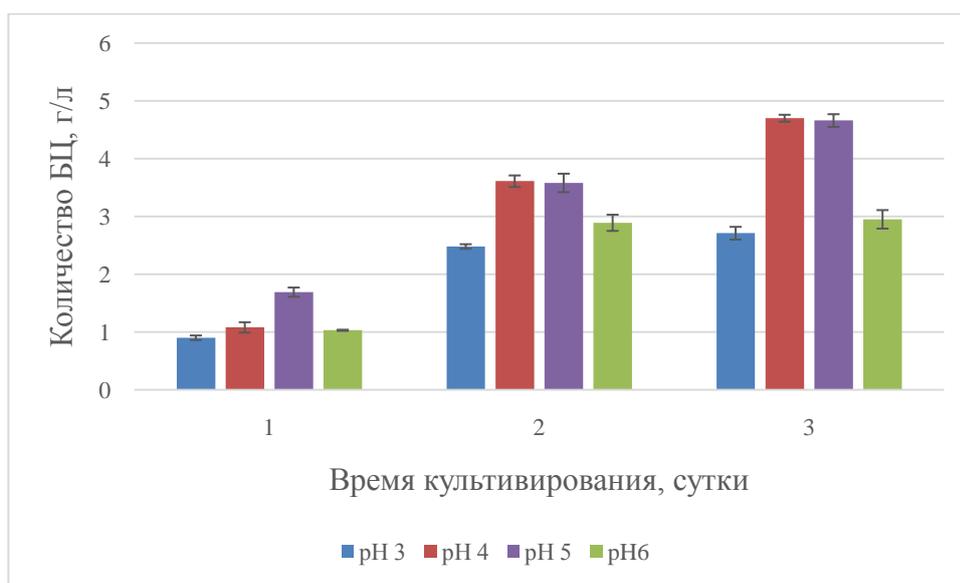


Рисунок 50 – Образование бактериальной целлюлозы

K. sacrofermentans В-11267 на барде с различными значениями рН

Из полученных данных видно, что при изменении рН в кислую сторону происходит снижение образования целлюлозы. Выход на 3 сутки составляет $2,71 \pm 0,11$ г/л, относительно контроля – $4,67 \pm 0,06$ г/л. При изменении начального значения рН в щелочную сторону происходит незначительное снижение выхода продукта. Причем чем выше начальное значение рН, тем ниже выход целлюлозы. Таким образом, наилучшим значением рН является 4,0.

Исследовалась динамика изменения рН. Данные представлены на рисунке 51.

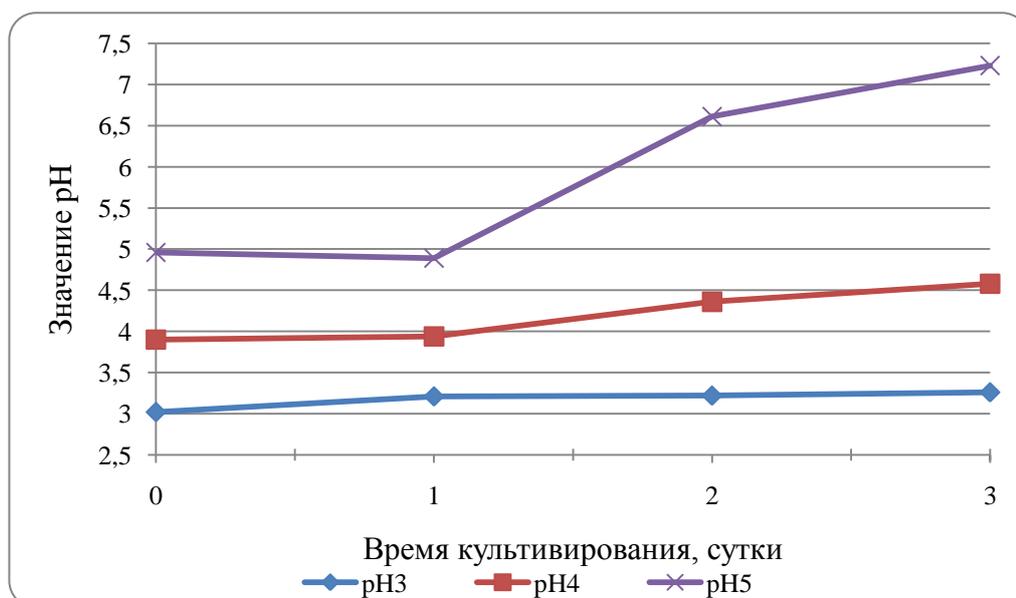


Рисунок 51 – Динамика изменения рН культуральной жидкости *K. sacrofermentans* В-11267 на барде с различными значениями рН

Таким образом, наилучшим начальным рН для культивирования продуцента бактериальной целлюлозы является рН – 3,9 – 4,0.

Изучив образование БЦ на среде с бардой, и влияния индукторов, доказали положительное влияние органических кислот, глицерина и дополнительных источников углерода на образование БЦ. Для дальнейшей оптимизации использовали среду на основе мелассы.

3.2.3 Изучение образования бактериальной целлюлозы на среде с мелассой

3.2.3.1 Изучение влияния начального значения рН

Важное значение для биосинтеза оказывает начальное рН среды. Исследовали образование БЦ на среде с мелассой в количестве 5 % при различных значениях рН.

Исследовалась динамика образования бактериальной целлюлозы. Данные представлены на рисунке 52.

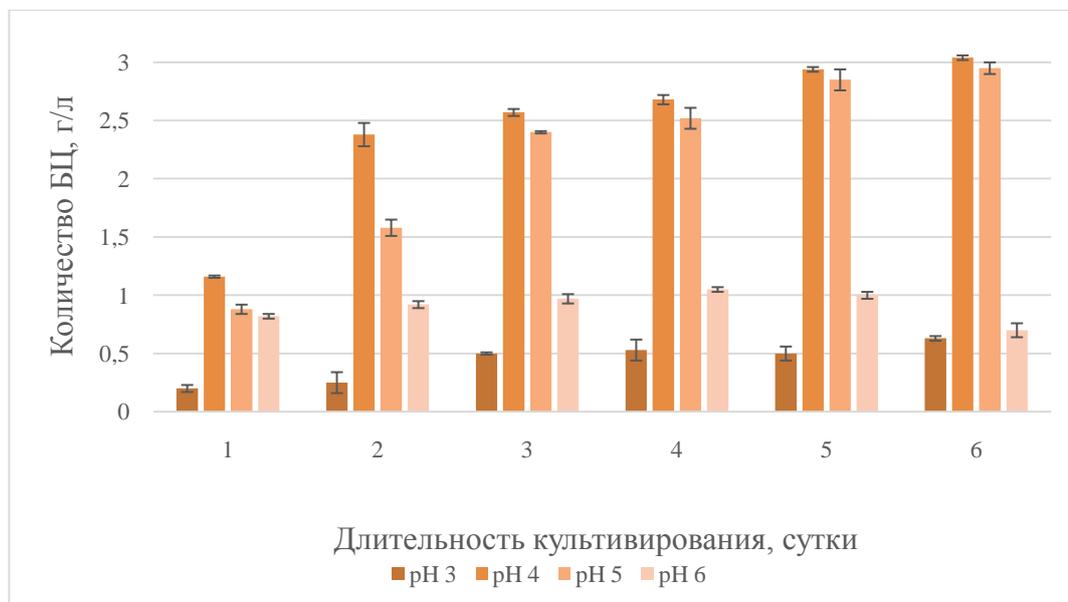


Рисунок 52 – Динамика образования бактериальной целлюлозы *K. sacrofermentans* В-11267 на среде с мелассой при различных начальных значениях рН

Из этих данных также видно, что наибольший выход наблюдается при значении рН 4 на 6 сутки культивирования 3,04 г/л. Однако, следует заметить, что на 2 и 3 сутки выход в данной среде составил 2,38 г/л и 2,57 г/л соответственно. В связи с тем, что наибольший прирост полимера наблюдается на вторые сутки, а затем хоть и продолжает увеличиваться, но в меньшей степени, целесообразнее остановить процесс культивирования во 2 – 3 сутки.

При уменьшении значения рН наблюдается значительное уменьшение рН, что подтверждает, что низкие значения рН негативно влияют на биосинтез целлюлозы. При повышении значения рН выше 5 также наблюдается снижение образования целлюлозы и составило на 2 сутки 1,58 г/л и 0,92 г/л при рН 5 и 6 соответственно.

Исследовалась также динамика изменения рН культуральной жидкости бактерий *K. sacrofermentans*. Полученные данные представлены на рисунке 53.

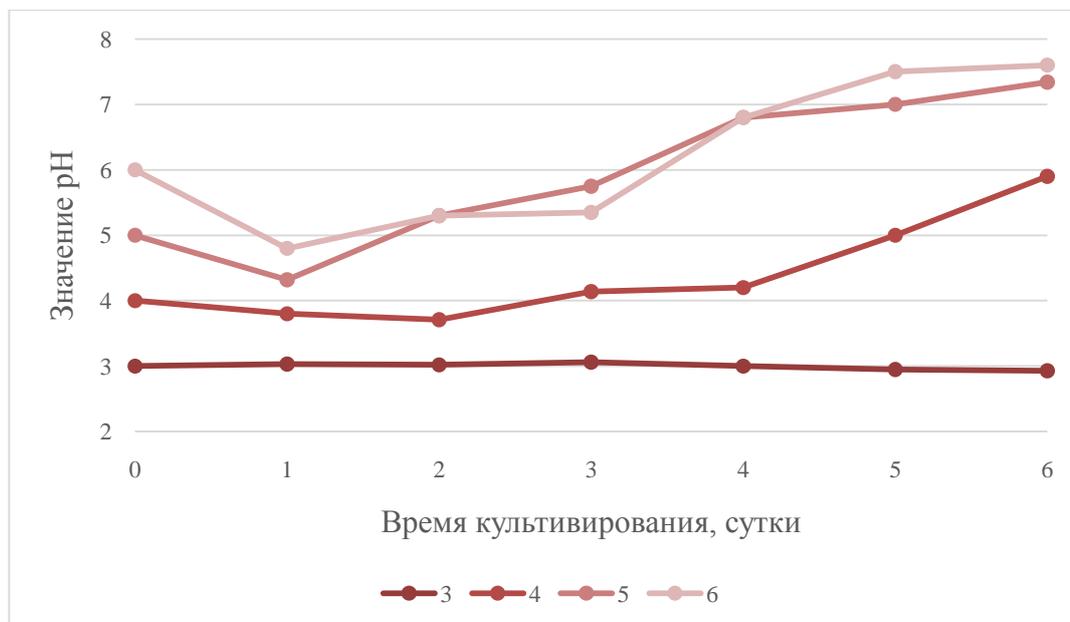


Рисунок 53 – Динамика изменения рН культуральной жидкости на мелассе с различными значениями рН

Как можно увидеть на рисунке 53, при рН 4 значение повышается в ходе культивирования с 4,2 до 5,9, тогда как при 5 и 6 наблюдается значительное увеличение рН до 7,34 и 7,6 соответственно. При значении рН равном 3 не наблюдается значительного изменения рН, что может говорить об отсутствии значительного роста и образования целлюлозы.

В предыдущих исследованиях изучали влияние значения рН на образование БЦ на среде с мелассой. Определили, что наибольший выход наблюдается при рН 4,0 – $2,57 \pm 0,06$ г/л на 3 сутки культивирования при концентрации мелассы 50 г/л. Согласно литературным данным оптимальным значением рН для культивирования продуцента целлюлозы является рН 4,0 – 6,0. Однако, в наших исследованиях при культивировании продуцента на мелассе с начальным значением рН 6,0 выход БЦ составил $1,05 \pm 0,05$ г/л на 3 сутки культивирования. Основываясь на этих данных, и на статье Вае и Shoda, мы предположили, что в процессе доведения рН до оптимального значения 4,0 – 4,5 с последующей стерилизацией среды происходит частичный гидролиз сахарозы.

Так как, при рН 3 происходит более активный гидролиз, нами было сделано предположение о двойной температурной обработке среды. Первоначально рН доводится до 3 для гидролиза сахарозы, а затем доводится до оптимального значения рН 4,5 и 6. Поскольку из эксперимента по подбору рН известно, что при рН 3 наблюдается заметное снижение образования целлюлозы. Данные по образованию целлюлозы представлены на рисунке 54.

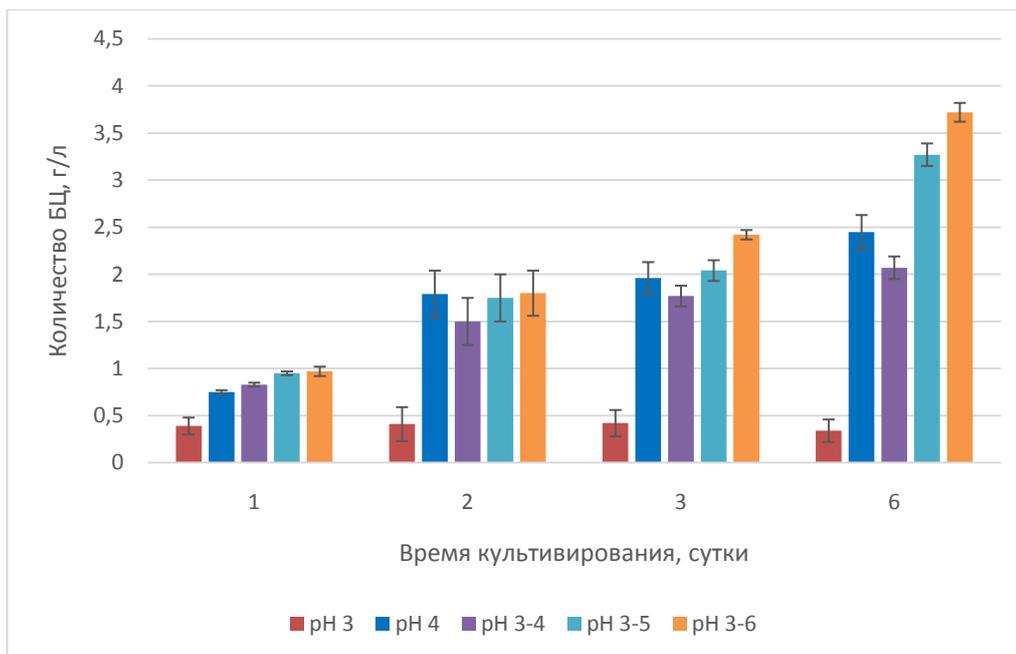


Рисунок 54 – Динамика образования целлюлозы при различных значениях рН

При начальном значении рН равном 3 не происходит интенсивное образование целлюлозы, однако при доведении рН до 3 с последующей стерилизацией для проведения гидролиза наблюдается повышение выхода целлюлозы. Наибольший выход образуется при рН 3-6 – 3,72 г/л на 6 сутки культивирования. При доведении рН после гидролиза до 4 наблюдается даже более низкий выход чем в контроле. Вероятно, это связано с тем, что при этом увеличивается количество глюкозы и при этом происходит повышенное образование глюконовой кислоты и как следствие более интенсивное снижение рН, что видно на рисунке 55.

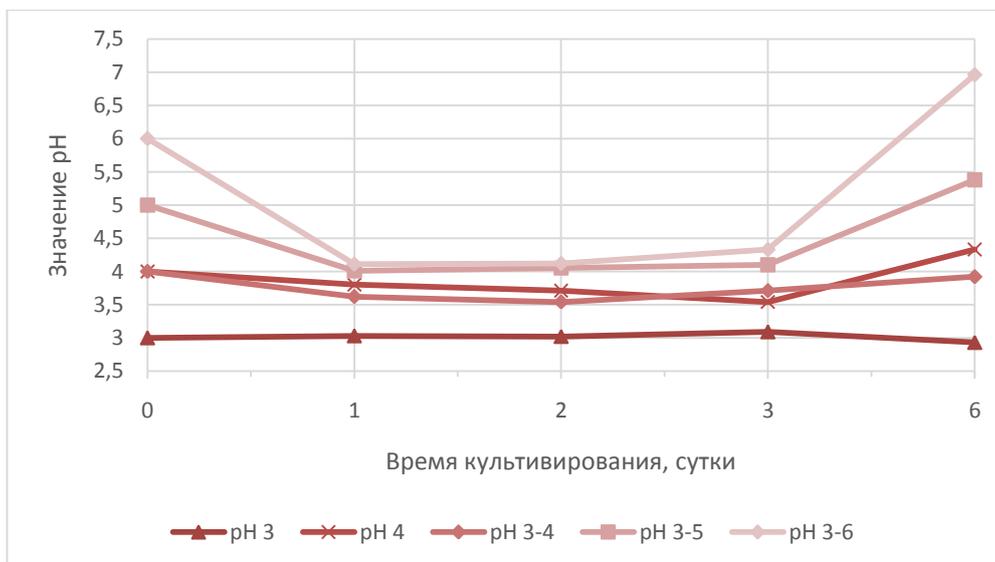
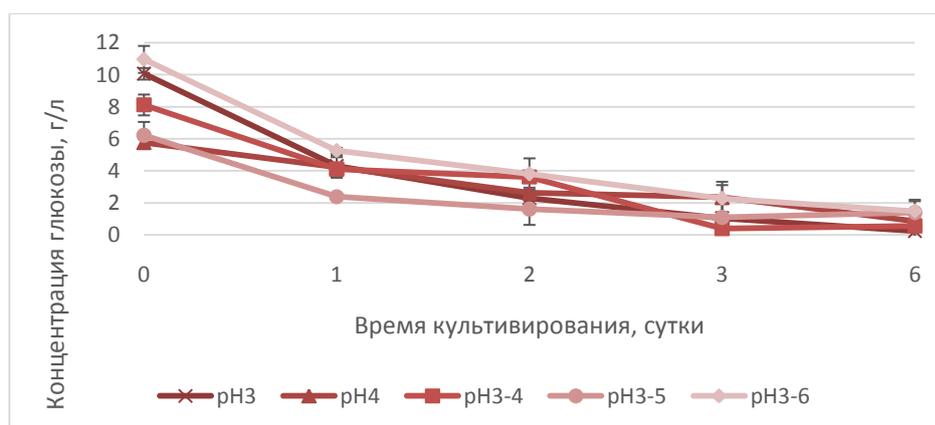
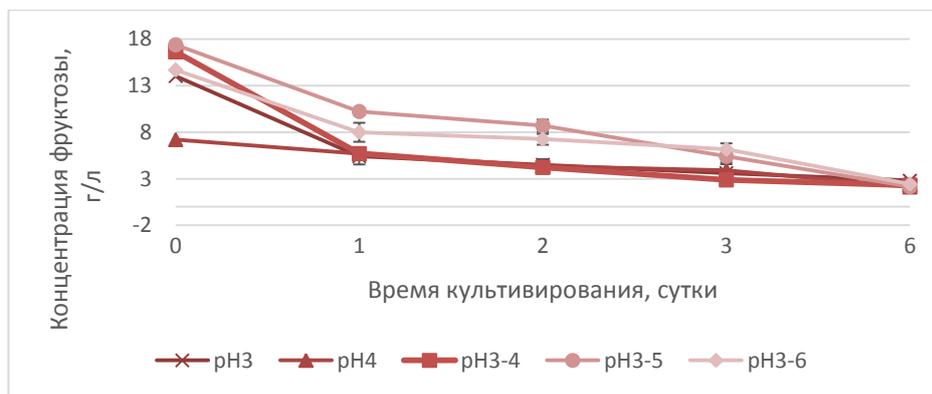


Рисунок 55 – Динамика изменения рН культуральной жидкости при различных значениях рН

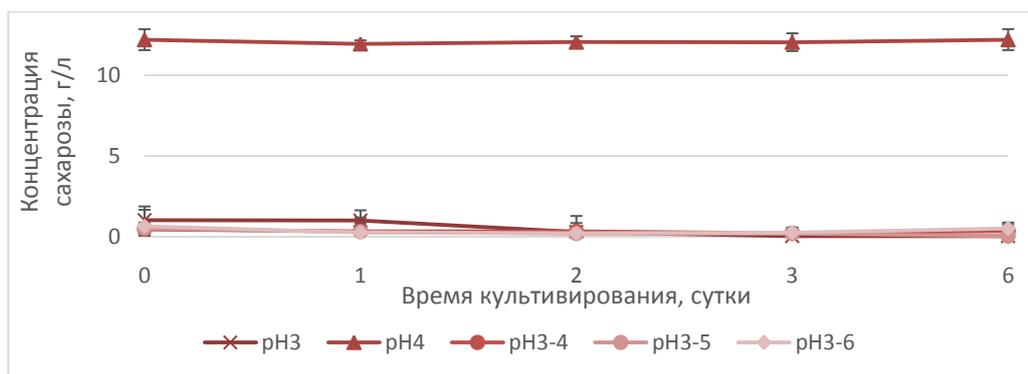
Методом ВЭЖХ исследовали содержание сахаров в средах данные представлены на рисунке 56. Определили, что при рН 3 происходит существенное снижение количества сахарозы до 1,02 г/л, а при последующем доведении до 4, 5 и 6 ее содержание уменьшилось до 0,46 г/л, 0,52 г/л и 0,64 г/л соответственно. Таким образом такая обработка среды более благоприятна вследствие увеличения концентрации редуцирующих сахаров.



А



Б



В

Рисунок 56 – Динамика изменения количества глюкозы (А), фруктозы (Б) и сахарозы (В) в ходе культивирования

Во всех вариантах с термокислотной обработкой к 6 суткам культивирования общее количество сахаров снижается до 3 – 4 г/л. Тогда как из-за того, что в контрольной мелассной среде с начальным рН 4 не происходит полного разложения сахарозы в среде остается 12 г/л сахарозы.

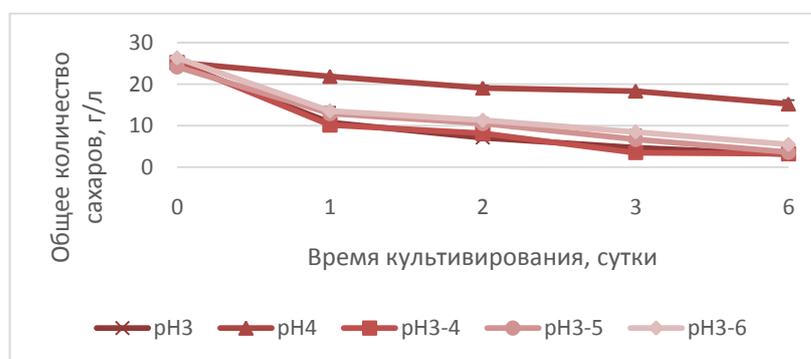


Рисунок 57 – Динамика изменения общего количества сахаров в ходе культивирования

2.3.2.2 Изучение влияния количества мелассы на образование целлюлозы

Важной задачей являлся подбор оптимального количества мелассы для биосинтеза целлюлозы. В ходе исследования мы использовали питательные среды с концентрацией мелассы 50 г/л (M1), 70 г/л (M2), 90 г/л (M3) и 110 г/л (M4). Концентрацию сахаров определяли в среде до стерилизации, после стерилизации при значениях pH 6,0 и 4,5 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (таблица 16).

Таблица 16 – Количество сахаров в среде с различной концентрацией мелассы после стерилизации при значениях pH 6,0 и 4,5 (ВЭЖХ)

Среда	Концентрация мелассы в среде, г/л	pH среды	Концентрация сахаров в среде после стерилизации, г/л			
			Сахароза	Глюкоза	Фруктоза	Общее количество сахаров
M ₁	50	6,0	25,38±	4,22±	-	29,60±0,4
		4,5	15,13±	6,02±	8,04±	29,19±0,4
M ₂	70	6,0	35,2±	4,75±	-	39,95±1,1
		4,5	16,68±	13,89±	7,56±	38,13±1,2
M ₃	90	6,0	43,0±	7,71±	-	50,71±0,5
		4,5	18,4±	20,76±	11,84±	51,0±0,5
M ₄	110	6,0	55,44±	8,55±	-	63,99±3,2
		4,5	16,65±	25,6±	17,05±	59,3±2,5

Согласно представленным данным, при стерилизации питательной среды без доведения значения pH (pH 6,0) в среде содержится значительное количество сахарозы (25,38; 35,2; 43 и 55,44 г/л на средах с 50, 70, 90 и 110г/л мелассы, соответственно) и небольшое количество глюкозы (4,22; 4,75; 7,71 и 8,55 г/л).

При доведении pH питательной среды до значения 4,5, после стерилизации наблюдается уменьшение количества сахарозы (15,13 г/л; 16,68 г/л; 18,4 г/л и 16,65 г/л) с одновременным увеличением содержания глюкозы (6,02 г/л; 13,89 г/л; 20,76 г/л и 25,6 г/л) и появлением в среде фруктозы (8,04 г/л; 7,56 г/л; 11,84 г/л и 17,05 г/л). Изменение соотношения отдельных видов сахаров при кислотнo-термической обработке в процессе стерилизации

вероятно вызвано частичным гидролизом сахарозы с образованием более усвояемых редуцирующих сахаров.

В средах с различными концентрациями мелассы после термокислотной обработки остается примерно одинаковое количество сахарозы, однако при этом увеличивается количество глюкозы и фруктозы. При этом общее содержание сахаров в средах M_1 , M_2 , M_3 и M_4 составило – 29,19 г/л; 38,13 г/л; 51,00 г/л и 59,3 г/л, соответственно.

В следующей серии опытов была изучена динамика образования БЦ на средах с различной концентрацией мелассы после термо-кислотного гидролиза. Полученные данные представлены на рисунке 58.

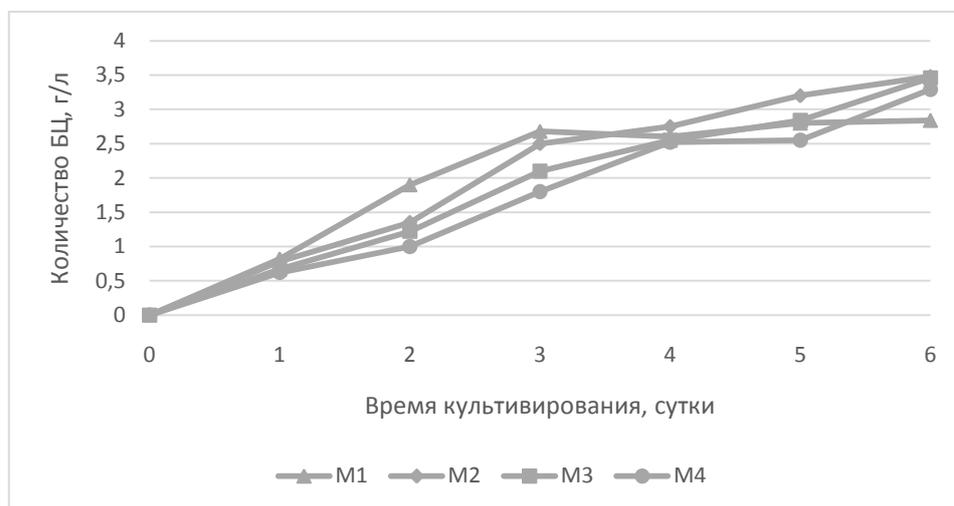


Рисунок 58 – Динамика образования БЦ на средах с разным содержанием мелассы

Согласно представленным данным, наибольшее количество бактериальной целлюлозы образуется на 6 сутки культивирования на средах M_3 и M_4 с концентрацией мелассы 90 и 110 г/л и общим содержанием сахаров 51 г/л и 59 г/л – $3,88 \pm 0,08$ г/л и $3,95 \pm 0,16$ г/л, соответственно. Однако, на 1-3 сутки культивирования наибольшее количество полисахарида образуется на среде M_1 с концентрацией мелассы 50 г/л и общим содержанием сахаров 29 г/л ($2,68 \pm 0,04$ г/л на 3 сутки). Это, вероятно, связано с тем, что высокое содержание сахаров и других элементов, содержащихся в мелассе на начальных

этапах подавляют образование целлюлозы. На 5 сутки культивирования максимальный выход БЦ наблюдается на среде M_2 с концентрацией мелассы 70 г/л и общим содержанием сахаров 38 г/л – 3,15 г/л. Хотя на 6 сутки наблюдается максимальный выход БЦ, продолжительность культивирования при этом увеличивается в 2 раза, что в промышленном масштабе приведет к значительным затратам. Поэтому наиболее целесообразным представляется осуществлять культивирование продуцента в течение 3 суток, где при общем содержании сахаров 29 г/л образуется $2,68 \pm 0,04$ г/л БЦ.

Для оценки жизнедеятельности бактерий и образования ими побочных продуктов, в частности органических кислот (уксусная, глюконовая) в дальнейших экспериментах изучали динамику изменения рН культуральной жидкости. Данные представлены на рисунке 59.

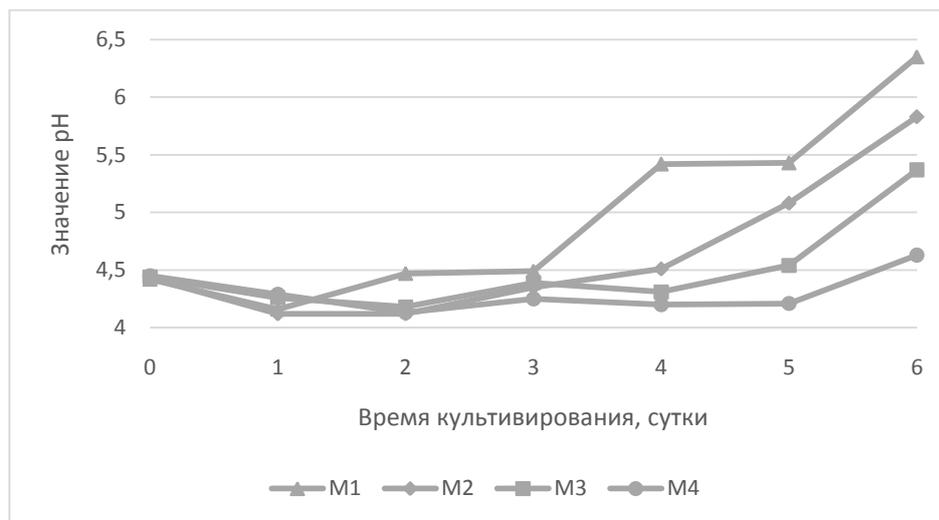


Рисунок 59 – Динамика изменения рН культуральной жидкости *K. sacrofermentans* В-11267 при различной концентрации мелассы

В ходе культивирования на 1 сутки наблюдается незначительное понижение значений рН, что вероятно связано с активным ростом бактерий, потреблением сахаров и образованием органических кислот. На 2 сутки во всех средах, кроме среды M_1 , происходит дальнейшее снижение значений рН. С 3 по 6 сутки культивирования происходит изменение значений рН в щелочную сторону, что, вероятно, связано с процессом потребления органических кислот.

При увеличении концентрации мелассы защелачивание происходит в меньшей степени. Так, в среде M_1 с минимальным содержанием сахаров происходит сильное защелачивание среды к 6 суткам культивирования, что вероятно свидетельствует о процессе лизиса клеток вследствие нехватки питательных веществ, что и приводит к отсутствию дальнейшего роста образования полимера.

В средах M_3 и M_4 с максимальным количеством сахаров выход целлюлозы увеличивается вплоть до 6 суток, при этом значение pH находится в кислой области и достигает значений 5,37 и 4,63, соответственно. Полученные нами результаты согласуются с литературными данными, в которых показано, что оптимальным значением pH для культивирования продуцента целлюлозы является pH 4,0 – 6,0 (20, 25).

В ходе культивирования продуцента *K. sacrofermentans* В-11267 также исследовали изменение концентрации сахаров в среде. Основным компонентом мелассы является сахароза, которая в процессе обработки разрушается с образованием редуцирующих сахаров – глюкозы и фруктозы. На рисунках 60 и 61 представлены данные по изменению концентрации сахаров в средах с различной концентрацией мелассы.

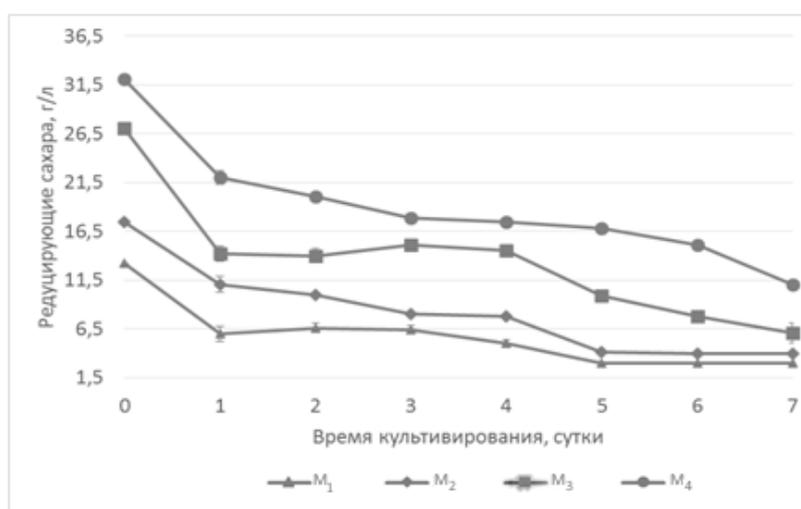


Рисунок 60 – Динамика изменения количества редуцирующих сахаров при культивировании *K. sacrofermentans* В-11267 на средах с различной концентрацией мелассы

Было обнаружено, что в средах M_1 , M_2 , M_3 и M_4 с общим количеством сахаров 29 г/л, 38 г/л, 51 г/л и 59 г/л начальное содержание редуцирующих сахаров составило – 13,68 г/л; 17,4 г/л; 27,36 г/л и 32,34 г/л, соответственно.

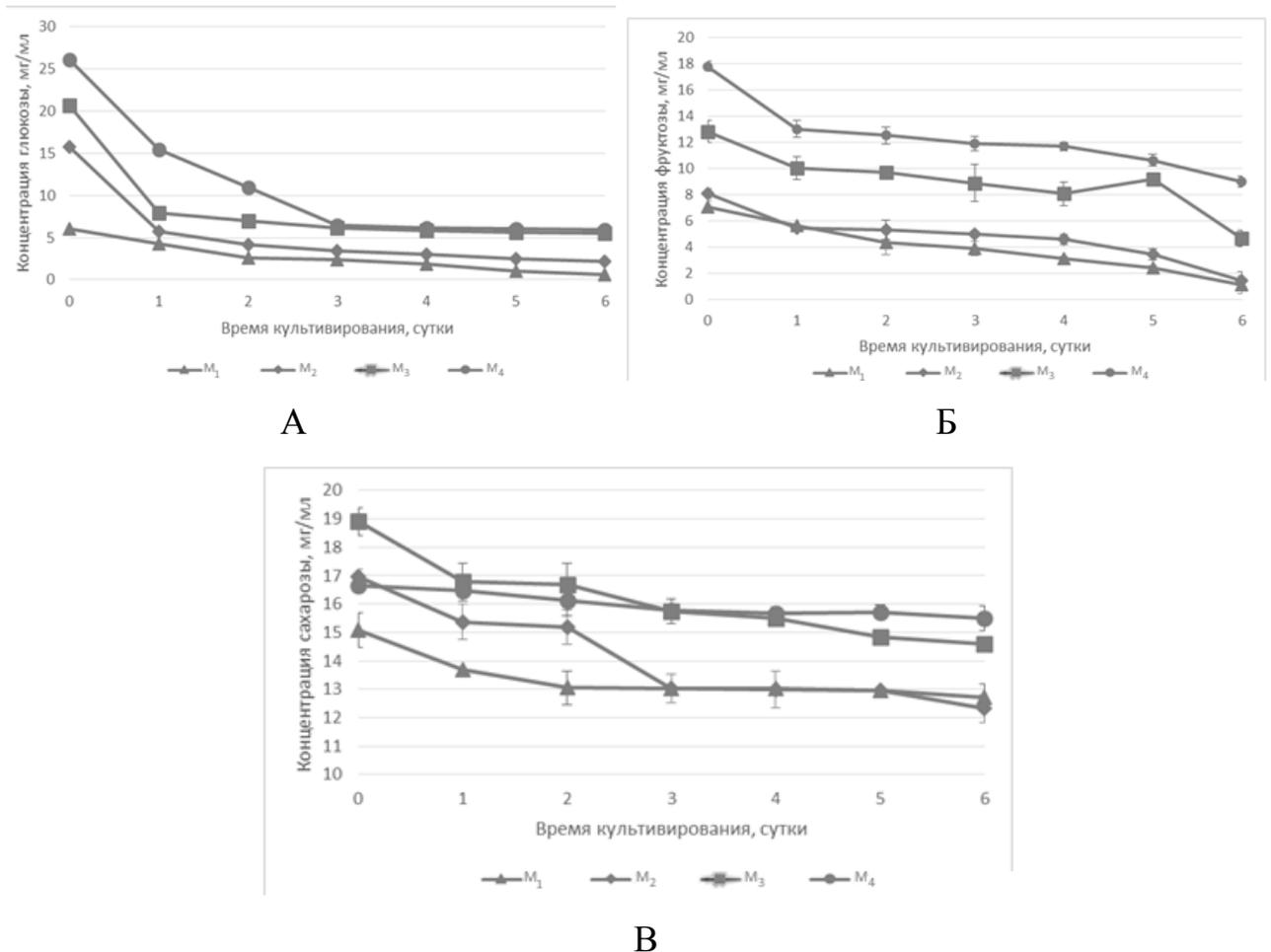


Рисунок 61 – Динамика изменения количества сахаров при культивировании *K. sacrofermentans* B-11267 на средах с различной концентрацией мелассы:

А – глюкоза, Б – фруктоза, В – сахароза

В ходе культивирования наблюдалось снижение концентрации редуцирующих сахаров в среде. В питательных средах M_1 , M_2 , содержащих изначально 13,68 г/л и 17,42 г/л редуцирующих сахаров к 6 суткам произошло снижение их концентрации до $3,07 \pm 0,25$ г/л и $3,75 \pm 0,33$ г/л, соответственно.

В среде M_1 количество редуцирующих сахаров в наибольшей степени уменьшается на 1 сутки культивирования до $6,32 \pm 0,60$ г/л. В средах M_3 и M_4 с начальным содержанием редуцирующих сахаров 27,36 г/л и 32,34 г/л, на 6

сутки культивирования остается $5,99 \pm 0,26$ г/л и $10,60 \pm 0,13$ г/л редуцирующих сахаров, соответственно.

Таким образом, согласно полученным данным, при культивировании продуцента в течение 6 суток нецелесообразно использовать питательную среду с концентрацией мелассы выше 70 г/л, так как в средах М₃ и М₄ остается значительное количество неиспользованных редуцирующих сахаров.

Известно, что на структуру целлюлозы влияют как условия культивирования, так и состав среды.

Проводилось сравнение ИК-спектров целлюлозы, полученной на средах с различной концентрацией мелассы и стандартной среде HS. Полученные спектры представлены на рисунке 62.

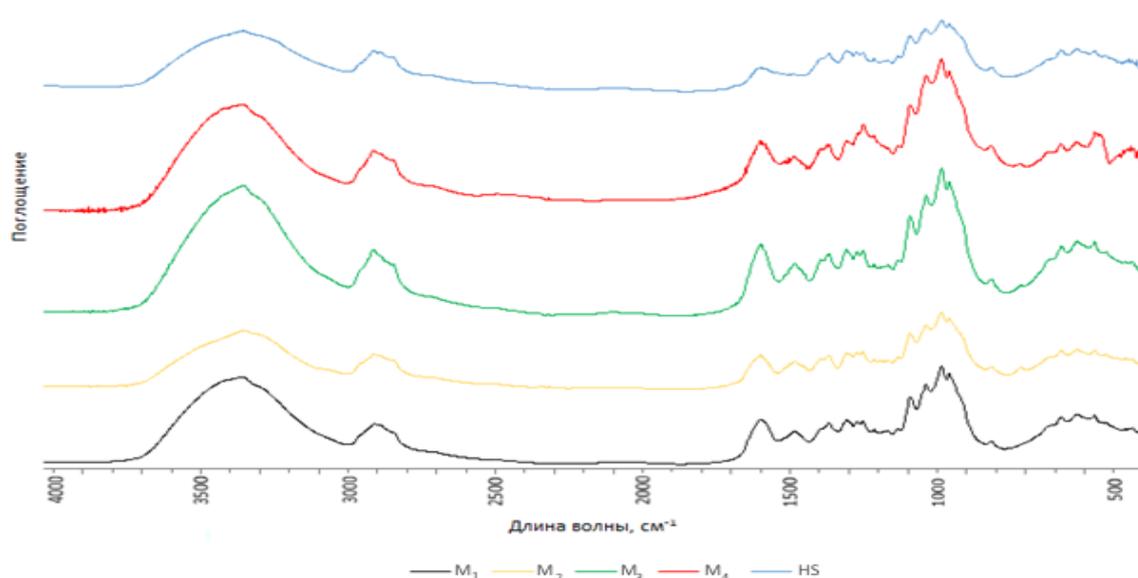


Рисунок 62 – ИК-спектры БЦ, полученной на средах с различной концентрацией мелассы и стандартной среде HS

Данные по сравнению полос поглощения функциональных групп в образцах, полученных на стандартной среде и на средах с различными концентрациями мелассы, представлены в таблице 17.

ИК-спектры показывают сходство обнаруженных пиков с литературными данными, с пиками, соответствующими целлюлозе I (Гладышева, 2015б).

Таблица 17 – Полосы поглощения, обнаруженные в образцах целлюлозы

Отнесение полос поглощения	Среда					
	HS	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	(Гладышева, 2015б).
ν OH-групп, участвующих в межмолекулярных и внутримолекулярных Н-связях	3352	3346	3346	3355	3357	3408
ν связей в группах СН и СН ₂	2919	2920	2921	2920	2915	2897
δ связей НОН обусловлено присутствием прочно связанной воды	1648	1653	1653	1653	1655	1635
δ групп СН ₂	1430	1429	1429	1429	1428	-
δ групп ОН в СН ₂ ОН	1373	1371	1371	1374	1377	1370
ν связей С-О (характерные для полисахаридов полосы, обусловленные наличием ацетильных связей С-О-С и связей С-О в спиртах)	1164 1059	1163 1059	1161 1059	1163 1060	1163 1055	1163 1060
β-1,4 связи	896	896	897	896	895	899

Полосы 1430 (С-Н₂), 1162 (С-О-С), 1111 (кольцо асимметричное) и 895 см⁻¹ (группа С1) могут быть использованы для изучения типа кристаллической целлюлозы, так как спектр кристаллической целлюлозы I отличается в этих полосах от целлюлозы II. Полоса 1430 см⁻¹ характерна для кристаллической целлюлозы I. Если целлюлозное волокно имеет значительное содержание целлюлозы II, эта полоса смещается к 1420 см⁻¹ и количество целлюлозы I уменьшается (Castro et. al., 2011). При этом на среде HS пик наблюдается при длине волны 1430, на средах с 50-90 г/л при 1429 а при 110 г/л мелассы 0 1428.

Спектральная область 1162 см⁻¹ соответствует целлюлозным С-О-С мостикам. В кристаллической целлюлозе эта полоса расположена при 1163 см⁻¹, в то время как для аморфной целлюлозы она расположена при 1156 см⁻¹ (Czaja

et al., 2004). Во всех представленных образцах пик соответствует длине волны 1161-1164 cm^{-1} .

Характерные полосы при 1430, 1163, 1112 и 896 cm^{-1} указывают на целлюлозу I в качестве основного компонента. Незначительные увеличения интенсивности при ряде длин волн, например, 1281 свидетельствуют о незначительном включении целлюлозы II.

Кроме того, определили индекс кристалличности и содержание α и β фазы целлюлозы в данных образцах, основываясь на соотношении интенсивности пиков.

Как показано в таблице 18, БЦ, полученная на различных средах, в целом имеет идентичный индекс кристалличности. Однако с увеличением концентрации мелассы наблюдается незначительное уменьшение соотношения интенсивности пиков.

Таблица 18 – Индекс кристалличности, содержание α и β фаз у БЦ, полученной на среде HS и на средах с различной концентрацией мелассы

Среда	I α , %	I β , %	Индекс кристалличности
HS	44,7 \pm 1,25	55,3 \pm 1,25	1,55 \pm 0,06
M ₁	43,9 \pm 0,90	56,1 \pm 0,90	1,60 \pm 0,06
M ₂	42,1 \pm 1,05	57,9 \pm 1,05	1,57 \pm 0,05
M ₃	41,9 \pm 1,4	58,1 \pm 1,4	1,54 \pm 0,09
M ₄	40,5 \pm 1,3	59,5 \pm 1,3	1,48 \pm 0,03

Полосы 3220 cm^{-1} и 750 cm^{-1} относятся к триклинному I α алломорфу, в то время как полосы, сосредоточенные при 3283 cm^{-1} и при 710 cm^{-1} ответственны за моноклинный I β алломорф (Szymańska–Chargot et al., 2011).

Известно, что ряд веществ, в частности на средах с агропромышленными отходами наблюдается снижение интенсивности пика целлюлозы I α , что приводит к снижению отношения целлюлозы I α / I β . Подобные явления также наблюдаются при получении БЦ на среде с, где могут присутствовать другие полисахариды. Это свидетельствует о том, что наличие указанных выше веществ, изменяет процесс кристаллизации целлюлозы и влияет на агрегацию целлюлозных цепей (Czaja et al., 2004).

Содержание α фазы практически не изменяется в изученных образцах с учетом погрешности. Однако оно незначительно снижается с увеличением концентрации мелассы. Это может быть связано с наличием дополнительных веществ в мелассе, влияющих на сборку молекулы целлюлозы. Поэтому увеличение концентрации мелассы приводит к уменьшению содержания α фазы.

Параметр, называемый индексом кристалличности, использовался для описания относительного количества кристаллического материала в целлюлозе. Методы с использованием ИК–спектроскопии определяют индекс кристалличности путем измерения относительных высот или областей пика. Это является самым простым методом, но дает только относительные значения, поскольку спектр всегда содержит данные как из кристаллической, так и из аморфной областей.

Таким образом, в ходе данного исследования было изучено образование бактериальной целлюлозы на средах с различной концентрацией сахаров в мелассе. Показано, что максимальное количество БЦ образуется при культивировании продуцента в течении 6 суток на среде M₄ – 3,95±0,16 г/л. Однако экономически более целесообразно проводить культивирование в течение 3 суток на среде M₁. Также проводилось исследование структуры БЦ методами ИК-спектроскопии. Отмечено, что с увеличением концентрации мелассы в среде происходит уменьшение индекса кристалличности и содержания α фазы бактериальной целлюлозы.

3.2.3.3 Изучение влияния органических кислот

Исследовалось влияние органических кислот: уксусной, лимонной, янтарной и молочной в количестве 0,5 % как добавка к меласной среде концентрацией 50 г/л.

Данные представлены на рисунке 63.

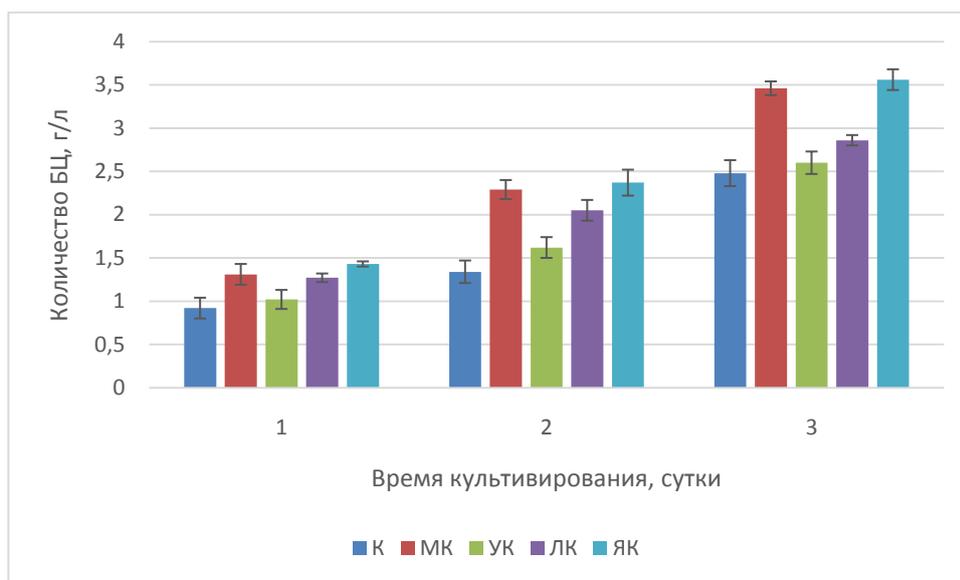


Рисунок 63 – Динамика образования бактериальной целлюлозы на среде с мелассой при добавлении органических кислот в количестве 0,5 %

Согласно полученным данным наибольший выход образуется при добавлении в мелассу молочной и янтарной кислот. На 3 сутки культивирования выход составил $3,46 \pm 0,08$ г/л и $3,56 \pm 0,12$ г/л, относительно $2,48 \pm 0,15$ г/л в контрольной среде. При использовании уксусной кислоты не наблюдается значительного изменения продуктивности. А при использовании лимонной кислоты наблюдается незначительное повышение выхода до $2,86 \pm 0,06$ г/л.

Исследовалась также динамика изменения рН культуральной жидкости. Данные представлены на рисунке 64.

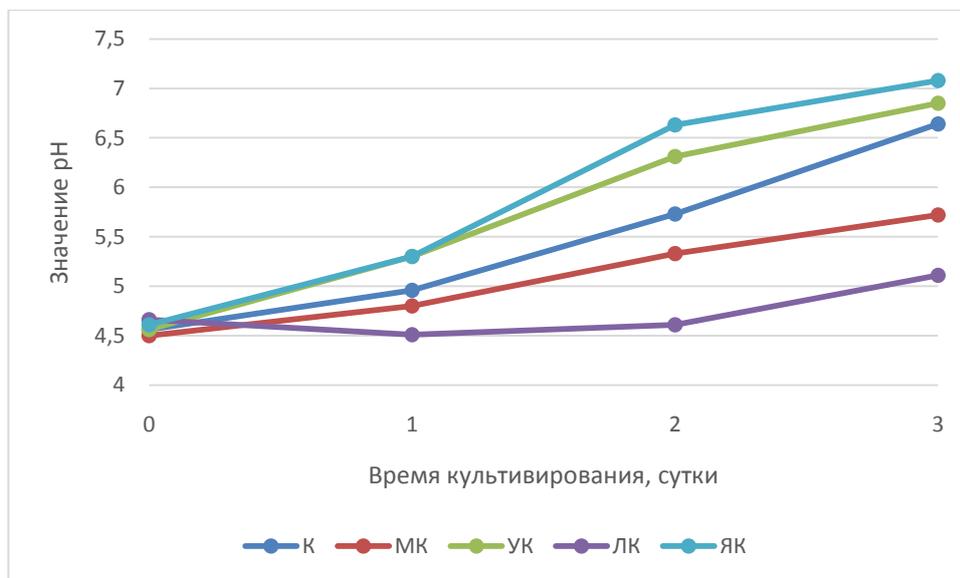


Рисунок 64 – Динамика изменения рН при культивировании на среде с мелассой и органическими кислотами

По результатам исследования можно заметить, что, как и в случае с бардой и средой HS, при добавлении органических кислот в мелассную среду происходит увеличение биосинтеза продукта. Наибольший выход наблюдается при использовании молочной и янтарной кислот. Выход увеличивается примерно в 1,4 раза относительно контроля на 3 сутки культивирования. Положительное влияние органических кислот можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, они могут выступать в качестве дополнительного легкодоступного источника углерода. Во-вторых, являясь активными участниками метаболизма в уксуснокислых бактериях, они могут являться ускорителями функционирования ЦТК и, тем самым, уменьшать образование побочных продуктов, и направлять большее количество источников углерода на образование конечного продукта – бактериальной целлюлозы.

3.2.3.4 Исследование влияния глицерина на образование целлюлозы

Использовалась среда с содержанием мелассы 50 г/л с добавлением глицерина 1 % и 3 %. Данные по образованию полимера представлены на рисунке 65.

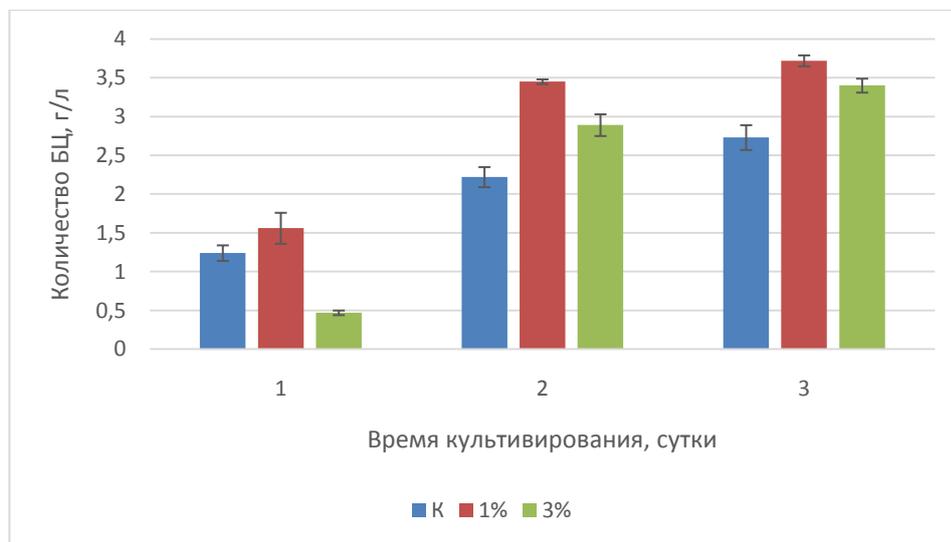


Рисунок 65 – Динамика образования БЦ на среде с мелассой и глицерином

Исходя из рисунка, можно заметить, что наибольший выход БЦ – $3,72 \pm 0,07$ г/л наблюдается при добавлении 1 % глицерина на 3 сутки культивирования. Выход в контрольной среде составил $2,73 \pm 0,16$ г/л. При увеличении концентрации глицерина до 3 % происходит снижение образования целлюлозы до $3,40 \pm 0,09$ г/л.

Данные по изменению рН культуральной жидкости представлены на рисунке 66.

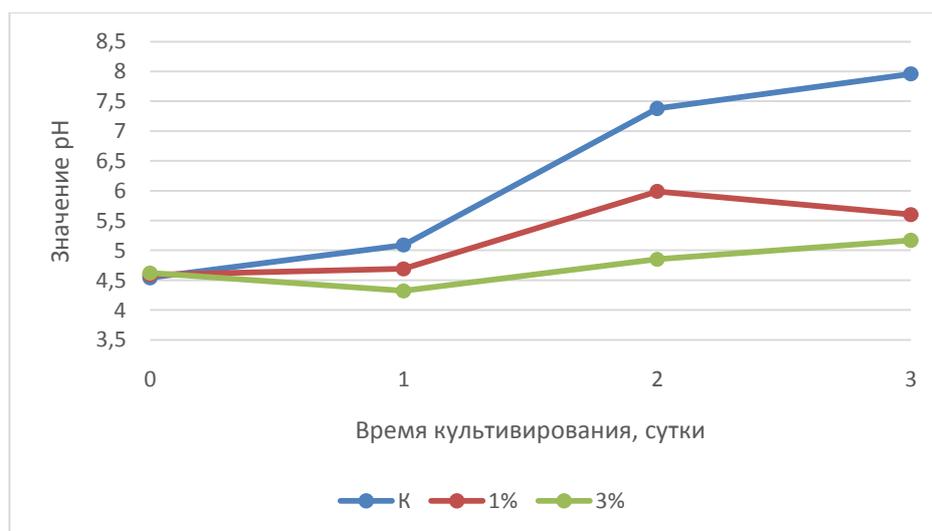


Рисунок 66 – Динамика изменения рН культуральной жидкости при культивировании продуцента на среде с мелассой и глицерином

Согласно полученным данным можно заметить, что при увеличении концентрации глицерина наблюдается снижение значения рН.

Таким образом, в ходе исследования определили, что при использовании в качестве сред отходов биотехнологических производств происходит увеличение выхода относительно контрольной среды NS. Установили, что выход увеличился в 3,5 и 2,5 раза при культивировании на послеспиртовой барде и мелассе соответственно за 6 суток культивирования. Показано, что на среде с мелассой и бардой наблюдается большая степень кристалличности БЦ (83,02 % и 82,3 % соответственно) чем на стандартной среде NS (79,7 %). А также при использовании барды наблюдаются наиболее тонкие волокна целлюлозы.

Наблюдается положительное влияние органических кислот на образование БЦ. При культивировании на послеспиртовой барде и мелассной среде наблюдается увеличение выхода целлюлозы на 43 % и 40 % соответственно при добавлении 0,5 % молочной кислоты.

Кроме того, исследовали влияние глицерина на образование БЦ. Доказали, что использование 1 % глицерина как добавку в среду на основе послеспиртовой барды и мелассы приводит к увеличению биосинтеза продукта на 55 и 36% на 3 сутки культивирования соответственно.

Исследовали влияние источников углерода при культивировании на послеспиртовой барде. Определили, что добавлении 2 % фруктозы и 1 % мелассы к среде приводит к увеличению выхода продукта на 58 % и 38 % соответственно.

3.3 Масштабирование процесса биосинтеза бактериальной целлюлозы при культивировании на средах с отходами биотехнологических производств

Как мы знаем, цель культивирования в биореакторе заключается в увеличении объемов производства и достижении производства в

промышленных масштабах. БЦ, полученную в биореакторной культуре, можно использовать во многих областях промышленности, таких как высококачественная бумага, высококачественные динамики, перевязочные материалы для заживления ран, десертные продукты, для создания композитов, используемых в автомобилях, высокоэффективных армированных композитов в ветроэнергетике, гражданской инфраструктуре, для создания пищевой упаковки, сорбентов и так далее. Если особых требований к размеру, форме, и физико-химическим свойствам материала нет, то его применение при культивировании в биореакторе совпадает с использованием других методов культивирования. Однако наиболее актуальной остается проблема получения при промышленном культивировании полимера с заданными свойствами для сохранения уникальных свойств полимера.

3.3.1 Изучение влияния условий культивирования на выход бактерий при культивировании в шейкере инкубаторе при различных оборотах на среде с мелассой и NS

Микроорганизмы быстро реагируют на изменения условий окружающей среды. Основные параметры окружающей среды: это pH, температура, растворенный кислород, скорость перемешивания (Rani and Appaiah, 2011).

Многочисленными исследованиями установлено, что кислород является важным фактором для роста клеток и синтеза бактериальной целлюлозы различными продуцентами, так как они являются облигатными аэробами (Фан Ми Хань и Громовых, 2011). Поэтому при условии культивирования в шейкере инкубаторе важно подобрать оптимальные обороты перемешивания, влияющие не только на степень аэрации, но и перенос питательных веществ.

Нами было изучено влияние условий перемешивания на образование БЦ. Процесс культивирования вели в шейкере-инкубаторе Environmental shaker-20/60 (BIOSAN) при 50, 100, 150, 200 и 250 об/мин и в статических условиях на

меласной среде, содержащей 50 г/л мелассы и начальным рН в диапазоне от 4,3-4,7, и на среде HS в течение 3 суток. Данные представлены на рисунке 67.

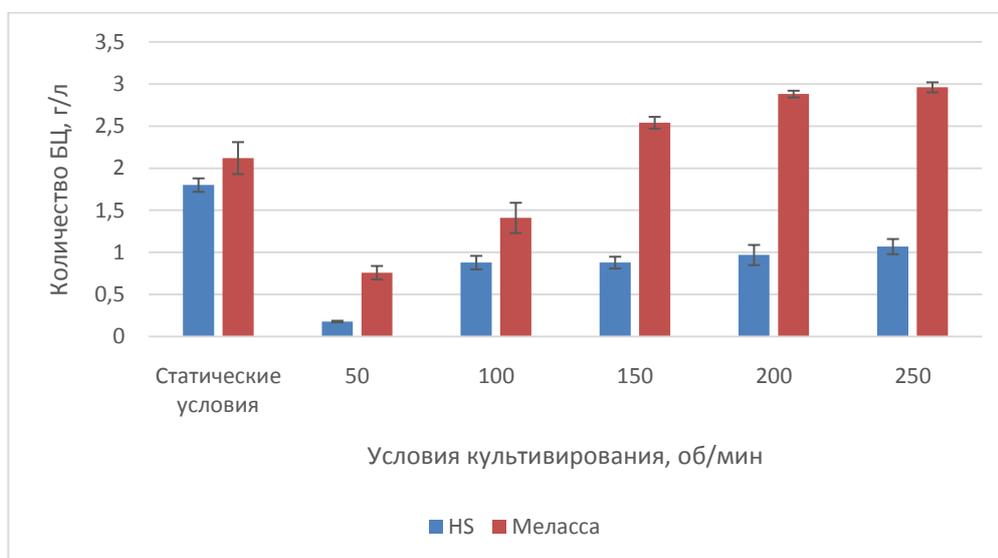


Рисунок 67 – Количество бактериальной целлюлозы, образуемой на среде HS и на среде с мелассой при различных условиях культивирования на 3 сутки культивирования

Из рисунка можно заметить, что наибольшее количество целлюлозы образуется на среде с мелассой при 250 об/мин – $2,96 \pm 0,06$ г/л и 200 об/мин – $2,88 \pm 0,06$ г/л. При уменьшении количества оборотов происходит уменьшение выхода полисахарида, что вероятно связано с уменьшением площади поверхности ферментации и снабжения кислородом. Так же значительное количество полисахарида образуется в статических условиях – $2,12 \pm 0,19$ г/л, вероятно условия 50 об/мин нарушают процесс формирования пленки в статических условиях.

Условия культивирования играют ключевую роль в воздействии на пиковую интенсивность целлюлозы I α и размер кристаллитов. Перемешивание нарушает процесс кристаллизации, что способствует образованию меньших по размеру кристаллитов и более низкой степени кристалличности (Czaja et al., 2004).

Определяли влияние условий культивирования на структуру целлюлозы при различных оборотах при культивировании в шейкере-инкубаторе на среде с мелассой и HS. Данные представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Индекс кристалличности, содержание α и β фаз у БЦ, полученной на среде с мелассой и HS

Питательная среда						
Меласса				HS		
Условия культивирования, об/мин	I α , %	I β , %	Индекс кристалличности	I α , %	I β , %	Индекс кристалличности
Статические условия	45,4 \pm 0,38	54,6 \pm 0,38	2,00 \pm 0,06	44,5 \pm 0,92	55,5 \pm 0,92	2,18 \pm 0,11
50	41,6 \pm 0,35	58,4 \pm 0,35	1,85 \pm 0,16	43,7 \pm 0,21	56,3 \pm 0,21	2,15 \pm 0,06
100	42,8 \pm 0,88	57,2 \pm 0,88	1,80 \pm 0,13	44,5 \pm 0,20	55,5 \pm 0,20	1,90 \pm 0,22
150	42,8 \pm 0,39	57,2 \pm 0,39	1,77 \pm 0,05	44,95 \pm 0,35	55,05 \pm 0,35	1,78 \pm 0,18
200	43,9 \pm 0,74	58,1 \pm 0,74	1,58 \pm 0,04	45,2 \pm 0,41	54,8 \pm 0,41	1,87 \pm 0,21
250	44,9 \pm 0,77	55,1 \pm 0,77	1,54 \pm 0,06	45,3 \pm 0,30	54,7 \pm 0,30	1,70 \pm

Согласно данным, представленным в таблице 19, с увеличением скорости перемешивания наблюдается постепенное уменьшение индекса кристалличности. Вероятно, это связано с тем, что перемешивание уменьшает процесс образования центров кристаллизации.

Таким образом, наилучшей структурой обладает целлюлоза, полученная в статических условиях.

3.3.2 Изучение влияния условий культивирования на выход бактериальной целлюлозы при культивировании в шейкере инкубаторе при различных оборотах на среде с бардой

Было изучено влияние условий перемешивания на образование БЦ при культивировании на послеспиртовой барде.

Изучено влияние условий перемешивания на образование БЦ. Процесс культивирования вели в шейкере-инкубаторе Environmental shaker-20/60 (BIOSAN) при 100, 150, 200 и 250 об/мин на послеспиртовой барде в течение 3 суток и в статических условиях (рис. 68).

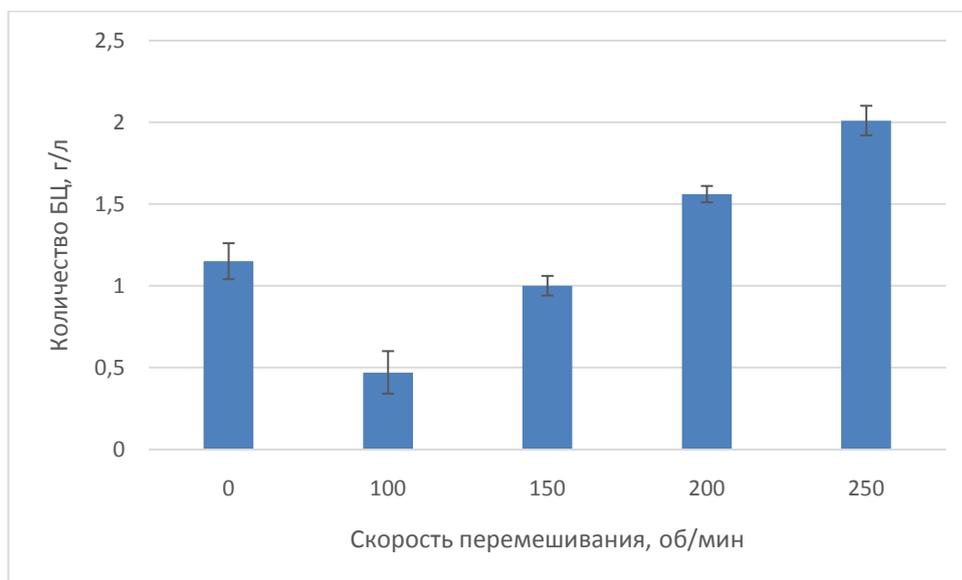


Рисунок 68 – Образование бактериальной целлюлозы *K. sucrofermentans* В-11267 на барде с различной скоростью перемешивания на 3 сутки культивирования

Как можно заметить, при увеличении перемешивания наблюдается значительное увеличение биосинтеза целлюлозы. Соответственно, наименьший выход наблюдается при перемешивании 100 об/мин – 0,47 г/л, наибольший – при 250 об/мин – 2,01 г/л. Таким образом, чем активнее происходит перемешивание компонентов среды, и активнее идет снабжение клеток кислородом, тем активнее идет биосинтез целлюлозы.

Однако можно заметить, что в статических условиях образуется несколько большее количество полимера чем при 150 об/мин. Вероятно низкие выходы при статическом культивировании вызваны недостаточной продолжительностью процесса.

3.3.3 Оптимизация получения бактериальной целлюлозы в биореакторе Biostat Aplus объемом 1л

3.3.3.1 Изучение влияния режима культивирования на выход и структуру бактериальной целлюлозы при культивировании на среде с мелассой

Для более четкого выявления закономерности влияния, условий культивирования на выход и структуру целлюлозы проводили культивирование продуцента *K. sacrofermentans* В-11267 в биореакторе Biostat A plus для подбора оптимальных режимов культивирования, а именно скорости перемешивания и режима аэрации. Культивирование проводили в течение 3 суток. Данные по образованию БЦ представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Образование БЦ *K. sacrofermentans* В-11267 при различных условиях культивирования на третьи сутки в биореакторе на среде с мелассой

Степень аэрации, л/л среды·мин ⁻¹	Количество БЦ при различных режимах перемешивания и аэрации, г/л		
	250 об/мин	300 об/мин	350 об/мин
0,7	2,49±0,11	3,66±0,11	2,77±0,13
0,9	2,55±0,06	3,34±0,15	2,57±0,18
1,1	2,94±0,06	3,36±0,16	2,33±0,10
1,3	2,80±0,05	2,96±0,20	2,35±0,17
1,5	2,07±0,12	2,80±0,12	1,98±0,14

Согласно представленным данным, наибольшее количество БЦ образуется при скорости перемешивания 300 об/мин и интенсивности аэрации равной 0,7 л/л среды·мин⁻¹ – 3,66 ± 0,11 г/л.

При культивировании со скоростью перемешивания 250 об/мин количество БЦ возрастает при увеличении аэрации и достигает максимума при аэрации со скоростью 1,1 л/л среды·мин⁻¹ – 2,94±0,06 г/л. Дальнейшее увеличение аэрации приводит к уменьшению количества целлюлозы.

При культивировании со скоростью перемешивания 300 об/мин увеличение скорости аэрации свыше 0,7 л/л среды·мин⁻¹ не привело к дальнейшему увеличению образования БЦ.

При увеличении скорости перемешивания до 350 об/мин наблюдается снижение образования продукта. При этом наибольшее количество БЦ образуется при аэрации со скоростью 0,7 л/л среды·мин⁻¹ – $2,77 \pm 0,13$ г/л.

Кроме того, исследовали изменение значения рН в ходе культивирования, что показывает эффективность жизнедеятельности бактерий: потребление субстрата и образование побочных продуктов в виде органических кислот. Кроме того, важно оценить содержание растворенного кислорода в среде. В связи с чем на рисунке 69 представлен график изменения рН в ходе культивирования продуцента при аэрации со скоростью 0,7 л/л среды·мин⁻¹ и скорости перемешивания 300 об/мин, как наиболее благоприятного режима культивирования.

Согласно представленным данным, в первые сутки культивирования наблюдается незначительное понижение значений рН с 4,5 до 4,0, что может быть связано с интенсивным ростом и образованием глюконовой кислоты. При увеличении времени культивирования до 3 суток происходит возрастание значений рН до 5,40 что, вероятно связано с потреблением органических кислот.

Параллельно с изменением величины рН наблюдается снижение количества растворенного кислорода в среде до 4,44 %. При остальных исследуемых режимах также наблюдается незначительное повышение значений рН в ходе культивирования и аналогичное снижение количества растворенного кислорода в среде.

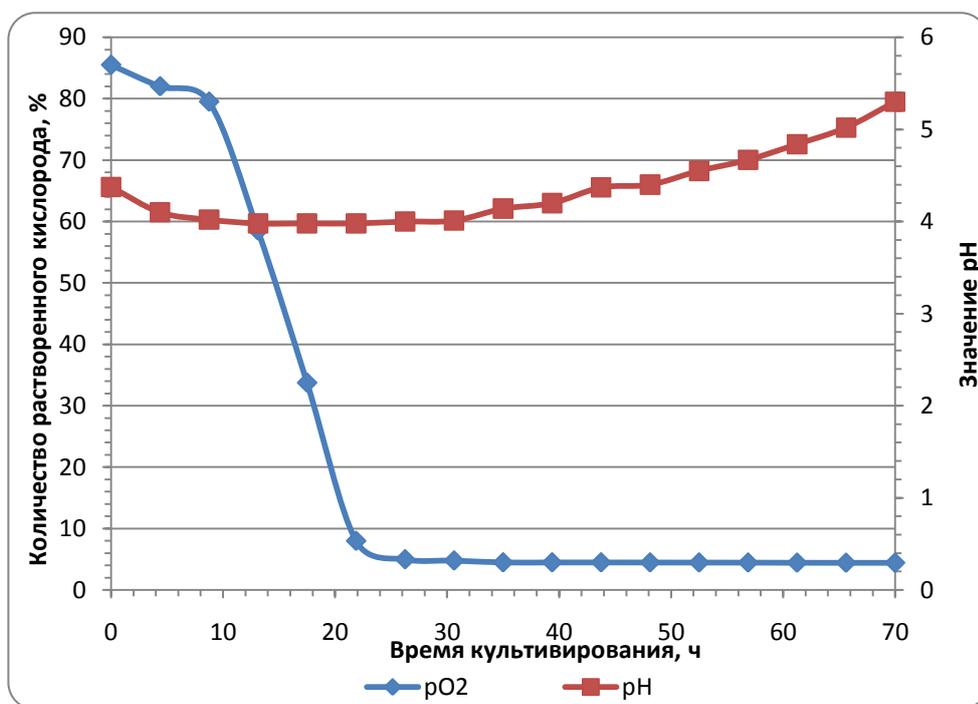


Рисунок 69 – Динамика изменения pH и количества кислорода в среде при образовании БЦ в течение трех суток культивирования на среде с мелассой в биореакторе при аэрации $0,7 \text{ л/л среды} \cdot \text{мин}^{-1}$ и скорости перемешивания 300 об/мин

При помощи метода ИК-спектроскопии был определен индекс кристалличности и содержание α и β фаз у лиофильно высушенных образцов целлюлозы, полученных при различных условиях культивирования (табл. 21).

На рисунке 70 представлены типичные ИК-спектры бактериальной целлюлозы, полученные при различных условиях культивирования. Интенсивный пик при длине волны $3200 - 3600 \text{ см}^{-1}$ обусловлен валентными колебаниями OH-групп (Moharram and Mahmoud, 2008). Менее интенсивные пики обнаружены в области $2800 - 3000 \text{ см}^{-1}$ обусловлены колебаниями CH_2 -групп (Oh et al., 2005). На спектрах присутствуют характерные пики целлюлозы I с сильными полосами при 1430 см^{-1} и при 1163 см^{-1} , отнесенные к симметричному изгибу CH_2 (Гладышева, 2015б) и к асимметричному растяжению C-O-C (Moharram and Mahmoud, 2008), соответственно, характерных для полисахаридов. В спектре целлюлозы II данный пик

сдвигается в область меньших волновых чисел и проявляется около 1156 см^{-1} (Movasaghi et al., 2008). Соответственно наша целлюлоза относится к типу целлюлозы I. Полоса при 899 см^{-1} характеризует ассиметричное колебание атома C_1 и четырех окружающих его атомов в спектрах β -гликозидных структур, что подтверждает наличие β -1,4 связей.

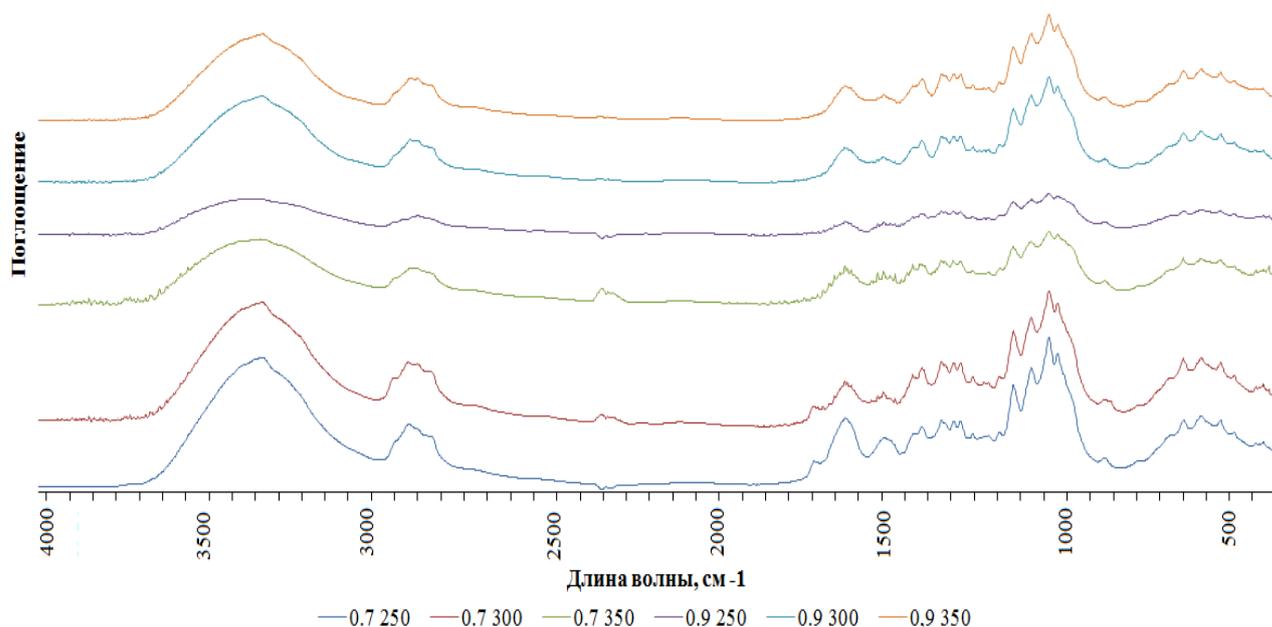


Рисунок 70 – ИК-спектры БЦ, полученные при различных условиях культивирования

Нами установлено, что наибольший индекс кристалличности БЦ регистрируется при режиме культивирования со скоростью перемешивания 300 об/мин и аэрации $0,7\text{ л/л среды}\cdot\text{мин}^{-1}$. В данном варианте опыта индекс кристалличности равен $1,97\pm 0,06$. При дальнейшем увеличении скорости перемешивания до 350 об/мин индекс кристалличности БЦ снижается $1,58\pm 0,04$. Увеличение скорости аэрации до $0.9\text{ л/л среды}\cdot\text{мин}^{-1}$ также вызывает уменьшение индекса кристалличности. Кроме того, можно заметить уменьшение содержания α фазы при увеличении скорости перемешивания. Это можно объяснить негативным воздействием перемешивания на сборку молекул целлюлозы.

Таблица 21 – Индекс кристалличности, содержание α и β фаз и ширина волокон БЦ, полученной в биореакторе при различных режимах перемешивания и аэрации

Режим аэрации и перемешивания	I α , %	I β , %	Индекс кристалличности	Ширина волокон, нм
0,7 л/л среды мин ⁻¹ , 250 об/мин	43,0±0,15	57,0±0,15	1,60±0,02	56,3±8,5
0,7 л/л среды мин ⁻¹ , 300 об/мин	44,4±0,29	55,6±0,29	1,97±0,06	36,9±6,2
0,7 л/л среды мин ⁻¹ , 350 об/мин	41,1±0,28	58,9±0,28	1,58±0,04	77,3±9,9
0,9 л/л среды мин ⁻¹ , 250 об/мин	43,3±0,35	56,7±0,35	1,42±0,06	53,3±7,2
0,9 л/л среды мин ⁻¹ , 300 об/мин	42,6±0,46	57,4±0,46	1,76±0,08	64,5±7,1
0,9 л/л среды мин ⁻¹ , 350 об/мин	40,2±0,31	59,8±0,31	1,40±0,07	74,0±8,1

Наилучшими физико-механическими свойствами обладает целлюлоза с высоким аспектным содержанием – соотношением длины волокна к ее ширине (George and Sabarathi, 2015). В частности, волокна с большим аспектным числом обладают улучшенными механическими свойствами и термической стабильностью (Базарнова и др., 2002). Также важную роль в формировании сетчатой структуры играет аспектное число, что улучшает механические характеристики полимерных нанокомпозитов (Young et. al., 2010).

Поэтому в этой серии опытов мы исследовали структуру БЦ с помощью атомно-силового микроскопа SPM9600 Shimadzu, полученную в процессе культивирования в биореакторе, при следующих условиях культивирования: аэрации со скоростью 0,7 л/л и 0,9 л/л среды мин⁻¹ и скоростью перемешивания 250, 300 и 350 об/мин. Изображение представлено на рисунке 71. Ширина волокна представлена в таблице 21.

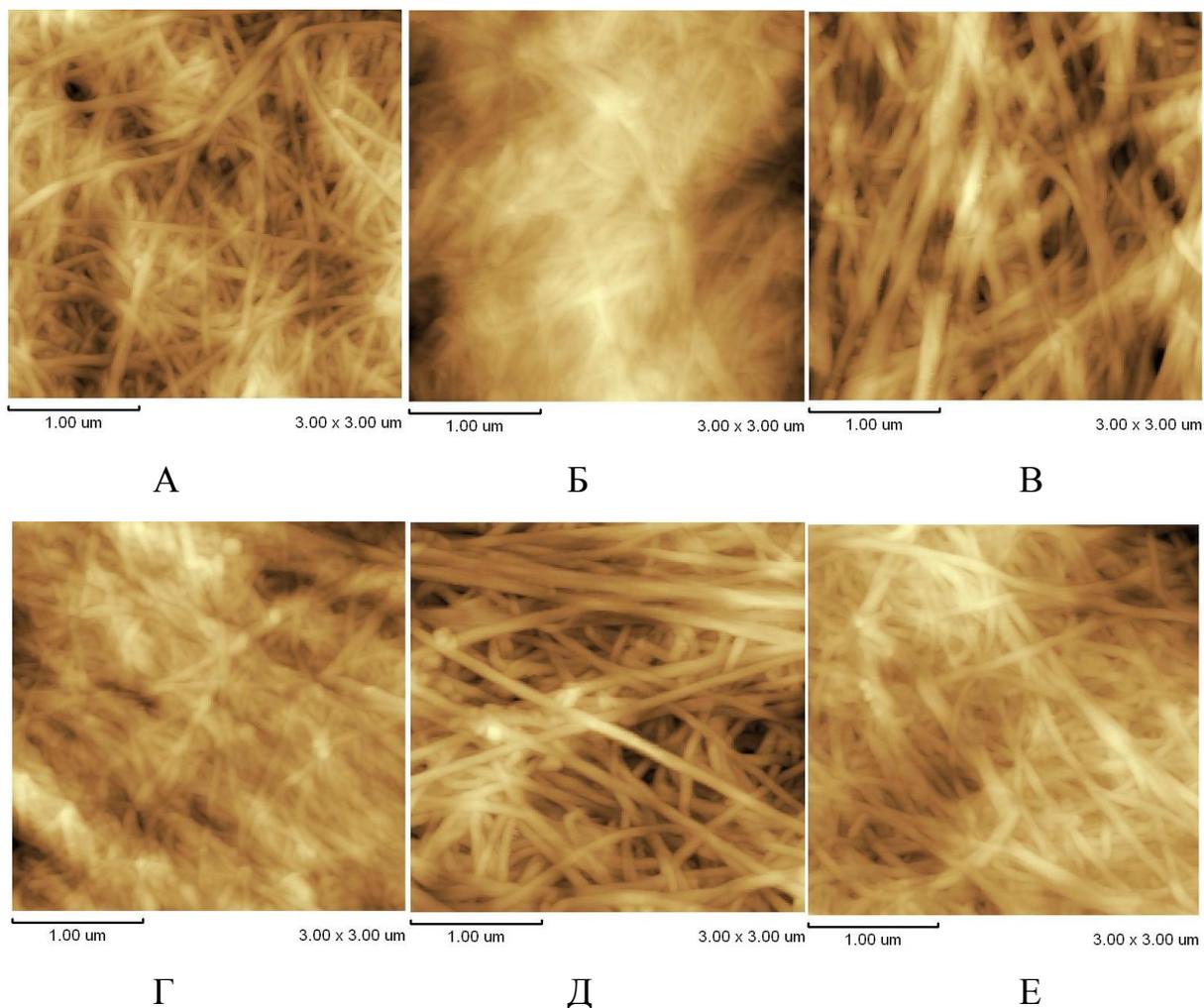


Рисунок 71 – АСМ-изображения БЦ, полученной при различных условиях культивирования:

А, Б, В – скорость аэрации $0,7 \text{ л/л среды} \cdot \text{мин}^{-1}$ и скорость перемешивания 250, 300 и 350 об/мин, соответственно, Г, Д, Е – скорость аэрации $0,9 \text{ л/л среды} \cdot \text{мин}^{-1}$ и скорость перемешивания 250, 300 и 350 об/мин, соответственно

В следующей серии опытов, мы провели оценку структуры БЦ с помощью рентгеноструктурного анализа. В качестве образца для исследования брали БЦ, полученную при аэрации среды – $0,7 \text{ л/л среды} \cdot \text{мин}^{-1}$ и оборотах мешалки, равных 250, 300 и 350 об/мин. Полученные данные представлены на рисунке 72.

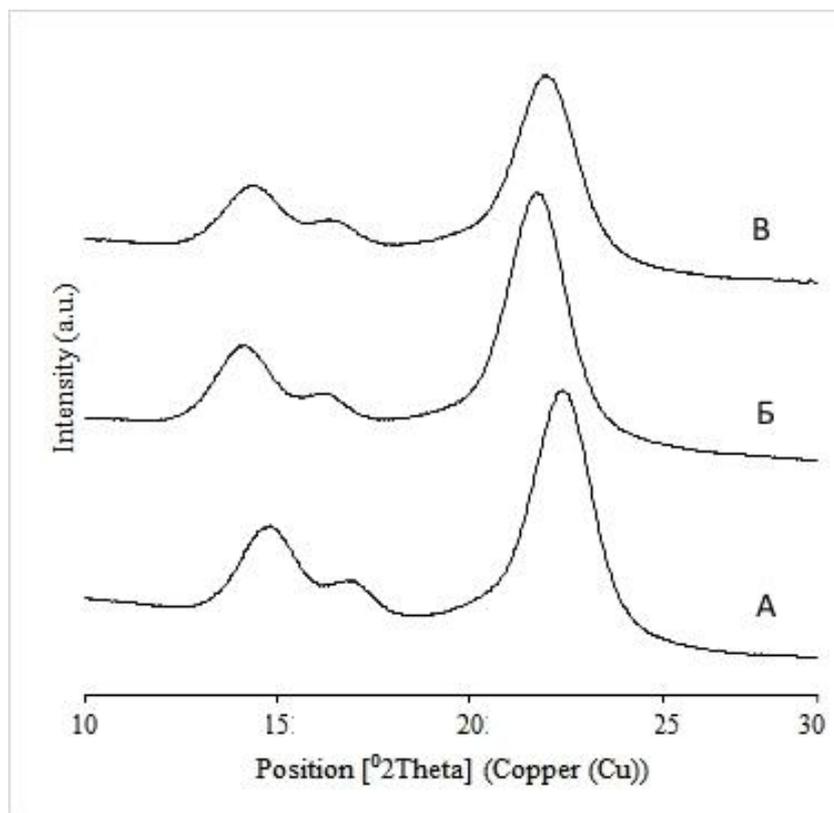


Рисунок 72 – Спектры рентгеновской дифракции (режим отражения) БЦ, полученной на среде с мелассой при различных режимах культивирования: А, Б, В – скорость аэрации 0,7 л/л среды·мин⁻¹ и скорость перемешивания 250, 300 и 350 об/мин, соответственно

На рисунке 72 видно три характерных дифракционных пика в области 10-30 °, которым присвоены кристаллографические плоскости (100), (010) и (110). Эти дифракционные пики соответствуют дифракционным углам 14,33°, 16,59° и 22,34° соответственно. Ярko выраженный дифракционный пик при 22,34° во всех образцах характерен для типичной структуры целлюлозы I.

Полученные нами результаты подтверждаются данными литературы, в которых указывают на интенсивность пиков при 22,34° у исследованных образцов БЦ.

Значения индекса кристалличности, изученных образцов представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Степень кристалличности целлюлозы, полученной в биореакторе BiostatA при различных режимах культивирования

Режим аэрации и перемешивания	Степень кристалличности, %
0,7 л/л среды·мин ⁻¹ , 250 об/мин	78,61
0,7 л/л среды·мин ⁻¹ , 300 об/мин	78,77
0,7 л/л среды·мин ⁻¹ , 350 об/мин	69,42

Наибольшая степень кристалличности наблюдается при режиме 0,7 л/л среды·мин⁻¹ и оборотах мешалки 300 об/мин, и составляет 78,77 %. При 250 об/мин наблюдается незначительное снижение степени кристалличности до 78,61 %. Показано, что при увеличении оборотов мешалки до 350 происходит снижение степени кристалличности до 69,42. Вероятно это связано с негативным влиянием высокой скорости перемешивания, что указывает на то, что механическое воздействие разрушает межводородные связи целлюлозы и могут приводить к разрушению кристаллической структуры.

3.3.3.2 Исследование влияния количества инокулята на образование бактериальной целлюлозы при культивировании на меласной среде с в биореакторе

Кроме того, изучали влияние количества инокулята при выращивании в 1 л биореакторе Biostat Aplus с объемом среды 800 мл. В качестве питательной среды использовали мелассу концентрацией 5 %.

Количество инокулята является важным параметром, влияющим на рост культуры и образование продукта. При недостаточном внесении культуры, рост микроорганизмов будет замедлен, что приведет к уменьшению биосинтеза. При излишнем количестве клеток, бактерии будут лимитированы по количеству питательных веществ, что также уменьшит образование продукта.

Данные по образованию БЦ представлены на рисунке 73. В ходе эксперимента вносили 10 %, 15 % и 20 % инокулята. При культивировании использовали подобранный оптимальный режим аэрация 0,7 л/л среды·мин⁻¹.

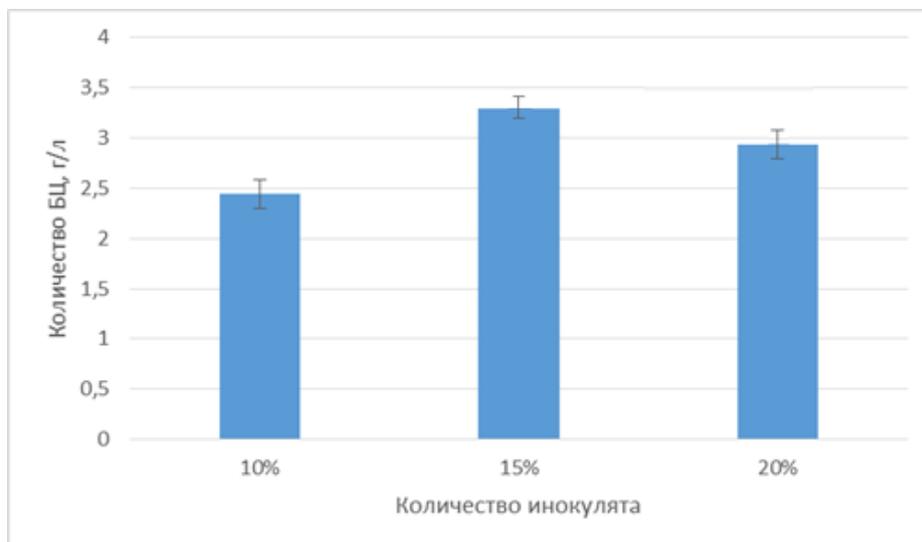


Рисунок 73 – Количество БЦ, образованной на 5 % меласной среде при различном количестве посевного материала в биореакторе Biostat Aplus

Из рисунка можно заметить, что при культивировании в биореакторе на 3 сутки наибольший выход, $3,29 \pm 0,35$ г/л, наблюдается при внесении 15 % инокулята. Таким образом, оптимальным количеством инокулята является 15 %.

3.3.3.3 Изучение влияния концентрации мелассы на выход бактериальной целлюлозы в 1 л биореакторе Biostat A plus

Изучали влияние концентрации мелассы при культивировании в биореакторе Biostat A plus. Полученные данные представлены на рисунке 74.

Из полученных данных видно, что на среде HS образуется в два раза меньше полимера чем на среде с мелассой. Можно заметить, что наибольший выход образуется при использовании 50 г/л мелассы, а при дальнейшем увеличении концентрации происходит снижение уровня биосинтеза.

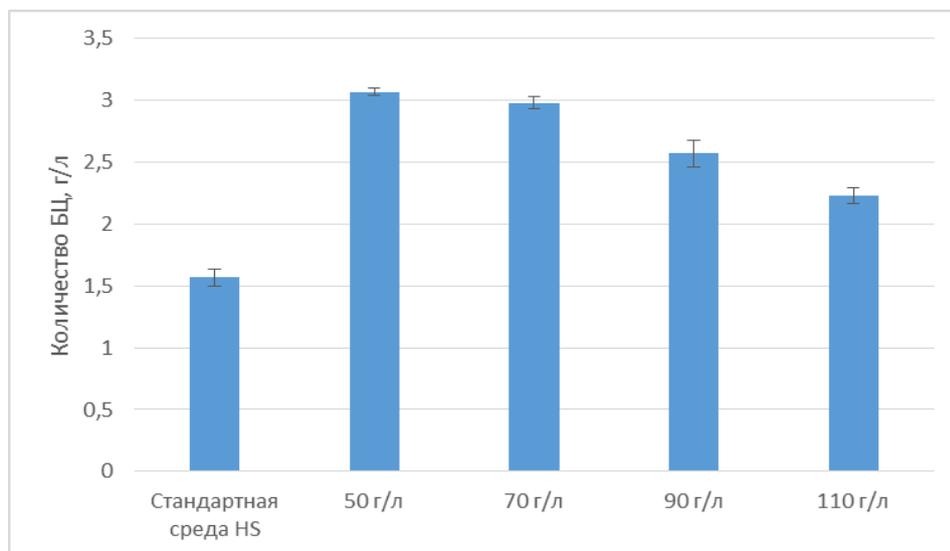


Рисунок 74 – Образование бактериальной целлюлозы *K. sacrofermentans* В-11267 при различных концентрациях мелассы, а также на среде HS в биореакторе объемом 1 л

3.3.3.4 Изучение влияния источников азота и витаминов на образование целлюлозы при культивировании на среде с мелассой

Важное значение для образования целлюлозы оказывают источники азота и витамины. Вследствие чего изучали влияние этих добавок на образование БЦ при культивировании в биореакторе. Данные представлены на рисунке 75.

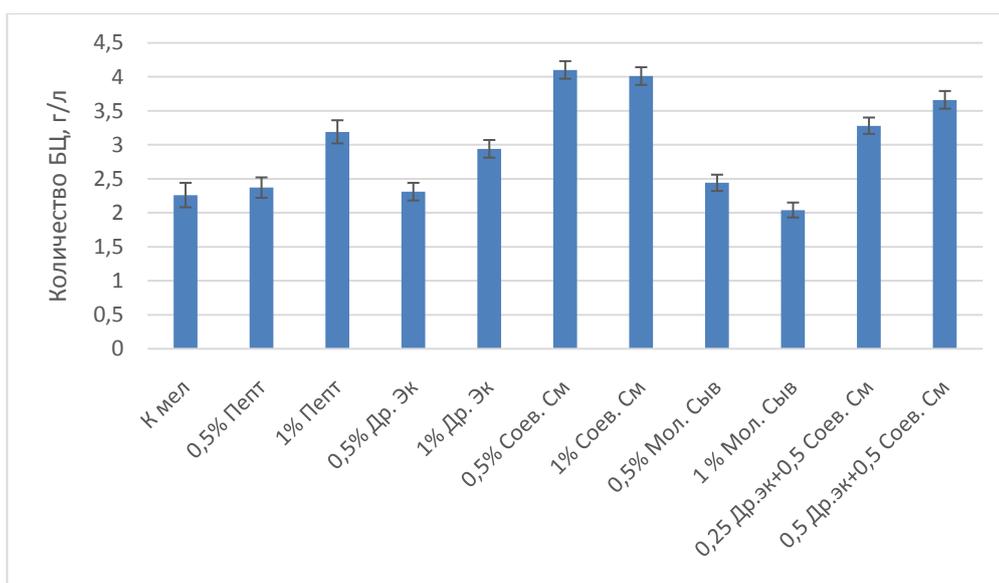


Рисунок 75 – Образование бактериальной целлюлозы *K. sacrofermentans* В-11267 на среде с мелассой и различных источниках азота и витаминов

Из полученных данных можно заметить увеличение образования целлюлозы при добавлении соевой муки в концентрации 0,5 %. Выход составил 4,10 г/л, относительно 2,26 в контрольной среде. Увеличение концентрации до 1 % не приводит к дальнейшему росту образования полимера. Кроме того, можно заметить увеличение образования целлюлозы при добавлении в среду 1 % пептона и дрожжевого экстракта

3.3.3.5 Изучение влияния условий культивирования на образование бактериальной целлюлозы при культивировании на послеспиртовой барде

Культивирование осуществляли на среде, состоящей из послеспиртовой барды. Данные представлены в таблице 23. Дальнейшее увеличение аэрирования было прекращено в связи с окончанием партии барды.

Таблица 23 – Образование бактериальной целлюлозы *K. sacrofermentans* В-11267 при различных условиях культивирования на трети сутки в биореакторе объемом 1 л на среде с бардой

Варианты культивирования	Количество бактериальной целлюлозы, г/л		
	Без перемешивания	250 об/мин	300 об/мин
0,15 л/л среды·мин ⁻¹	0,11±0,03	0,47±0,09	0,62±0,30
0,3 л/л среды·мин ⁻¹	0,30±0,04	0,70±0,09	1,09±0,28
0,5 л/л среды·мин ⁻¹	0,79±0,10	1,19±0,09	1,43±0,34
0,7 л/л среды·мин ⁻¹	2,19±0,47	2,36±0,38	3,66±0,25
0,9 л/л среды·мин ⁻¹	3,21±0,26	3,55±0,40	3,22±0,38

Из полученных данных видно, что в варианте без перемешивания наблюдаются наименьшие выходы. С увеличением количества оборотов до 300 происходит увеличение выхода целлюлозы. При увеличении степени аэрирования наблюдается значительное увеличение выхода. Максимальный выход в вариантах без перемешивания и при 250 об/мин получен при максимальном, изученном аэрировании 0,9 м³/мин – 3,21±0,26 г/л и

$3,55 \pm 0,40$ г/л. Наибольшее же количество полимера образуется при 300 об/мин и аэрировании $0,7$ л/л среды \cdot мин⁻¹ – $3,66 \pm 0,25$ г/л, при дальнейшем увеличении аэрирования до $0,9$ л/л среды \cdot мин⁻¹ происходит снижение уровня биосинтеза.

Данные по изменению рН и количеству растворенного кислорода представлены на рисунке 76.

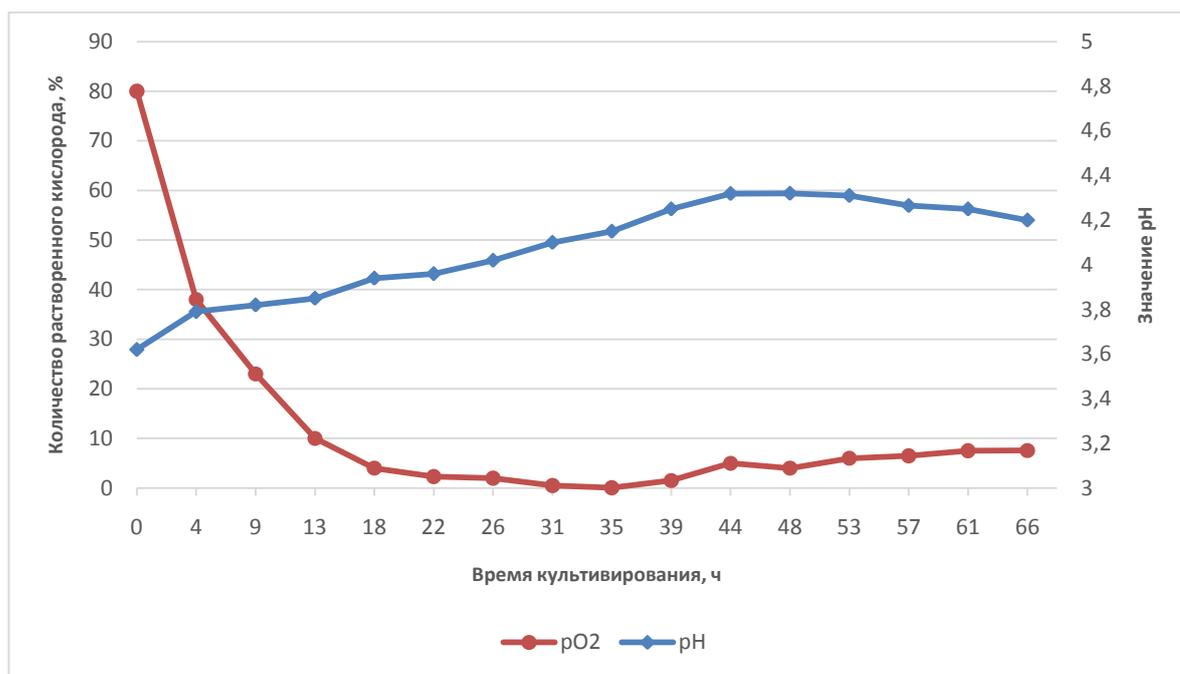


Рисунок 76 – Динамика изменения рН и количества растворенного кислорода при образовании БЦ *K. sacrofermentans* В-11267 в течение трех суток культивирования на барде с аэрированием $0,7$ л/л среды \cdot мин⁻¹ и скоростью перемешивания 300 об/мин

Можно заметить, что при культивировании происходит резкое снижение количества растворенного кислорода до минимального значения к 30 часу культивирования. Аналогичная динамика прослеживается при остальных режимах культивирования.

3.3.3.6 Изучение влияния источников азота и витаминов на образование бактериальной целлюлозы при использовании послеспиртовой барды

Изучали влияние источников азота на образование бактериальной целлюлозы. Данные представлены на рисунке 77.

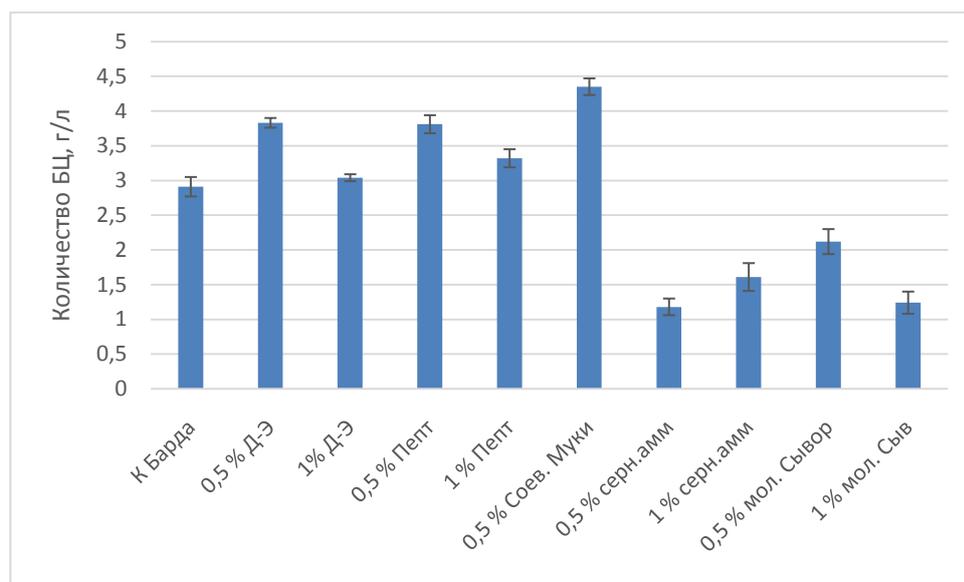


Рисунок 77 – Образование бактериальной целлюлозы *K. sacrofermentans* В-11267 на среде с бардой и различных источниках азота и витаминов

Из полученных данных можно заметить увеличение образования целлюлозы при добавлении соевой муки в концентрации 0,5 %. Выход составил 4,35 г/л, относительно 2,91 г/л в контрольной среде. Кроме того, можно заметить увеличение образования целлюлозы при добавлении в среду 0,5 % пептона и дрожжевого экстракта.

3.3.3.7 Изучение влияния источников углерода на образование БЦ при культивировании на послеспиртовой барде

Поскольку в ходе исследований было установлено положительное влияние глицерина в концентрации 1 % на образование БЦ в колбах, аналогичные исследования были проведены в биореакторе объемом 1 литр. Также в проведенных ранее исследованиях показано положительное влияние фруктозы в концентрации 20 г/л на биосинтез полисахарида. Поэтому в

процессе масштабирования исследовалось образование БЦ на послеспиртовой барде с добавлением глицерина в концентрации 1 %, фруктозы в концентрации 20 г/л и совместного действия глицерина и фруктозы. Полученные данные представлены на рисунке 78.

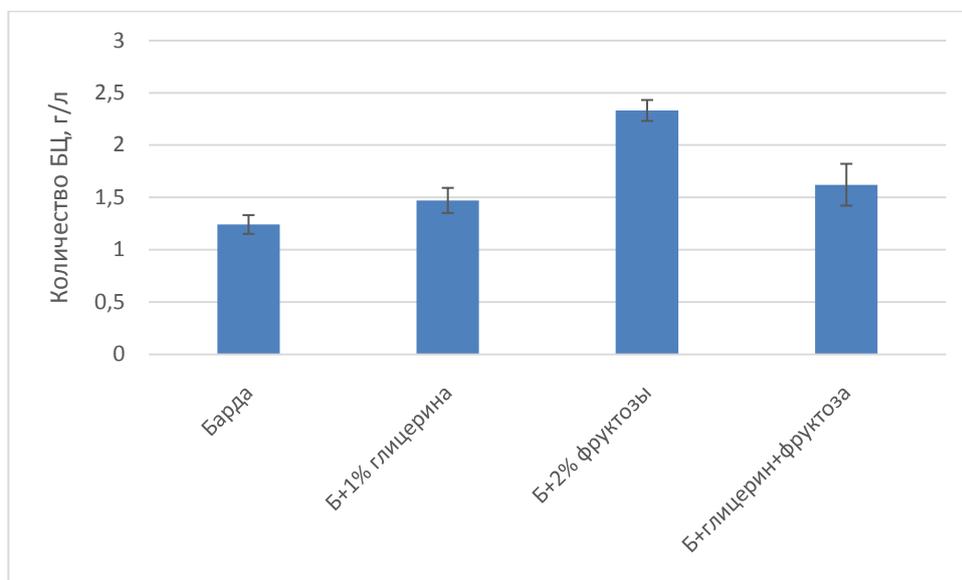


Рисунок 78 – Количество БЦ, образованной *K. sacrofermentans* B-11267 в течение трех суток культивирования на различных средах в 1 л биореакторе BIOSTAT A plus

Из полученных данных видно, что наибольший выход продукта наблюдается на барде с добавлением фруктозы $2,33 \pm 0,10$ г/л, что выше, чем в барде без добавок – $1,24 \pm 0,09$ г/л. Кроме того, можно заметить незначительно увеличение выхода при добавлении в среду 1 % глицерина. Однако, при совместном внесении не наблюдается увеличения выхода, выше чем при добавлении чистой фруктозы.

Изучали динамику изменения рН в ходе культивирования (рис. 77). В процессе культивирования продуцента на послеспиртовой барде с 1 % глицерина наблюдаем увеличение значения рН с 3,60 до 4,40 в течение трех суток культивирования. На рисунке 79 показано изменение рН культуральной жидкости в течение трех суток культивирования на послеспиртовой барде с добавлением фруктозы. Наблюдали увеличение значения рН с 3,76 до 5,85.

Потребление органических кислот на среде с фруктозой идет более активно, чем на среде с глицерином, либо в результате метаболизма фруктозы образуется меньше органических кислот, чем при утилизации глицерина.

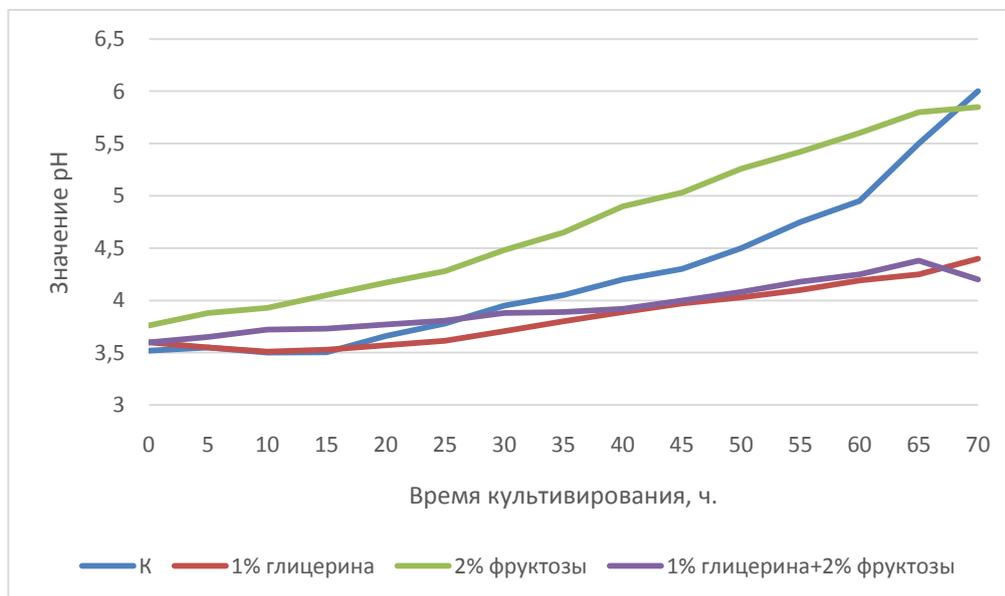


Рисунок 79 – Динамика изменения рН на различных средах в 1 л биореакторе BIOSTAT A plus

Также исследовалось совместное влияние глицерина в концентрации 1 % и фруктозы в концентрации 2 % на образование БЦ. Значение рН при культивировании бактерий продуцентов БЦ в течение трех суток на послеспиртовой барде с добавлением фруктозы в концентрации 2 % и 1 % глицерина изменилось в меньшей степени с 3,60 до 4,20. Вероятно, слишком высокие концентрации источников углерода оказывают ингибирующее воздействие на образование продукта, в следствии накопления органических кислот.

В контроле на послеспиртовой барде без добавок наблюдалось максимальное снижение кислотности среды: значение рН в течение трех суток культивирования изменилось с 3,50 до 6,00.

Таким образом, при культивировании в биореакторе объемом 1 л определили наилучший режим аэрации и перемешивания – 0,7 л/л среды·мин⁻¹ и

скоростью перемешивания 300 об/мин. Оценили влияние условий культивирования на структуру БЦ. Кроме того, рассмотрели влияние количества инокулята, а также глицерина и фруктозы на образование БЦ. Для дальнейшего масштабирования процесса использовали биореактор объемом 6 л.

3.3.4 Оптимизация получения бактериальной целлюлозы в биореакторе Biostat V plus объемом 6 л

3.3.4.1 Культивирование с использованием послеспиртовой барды

Нами было исследовано образование БЦ в 6 л биореакторе на послеспиртовой барде с глицерином в концентрации 1 % и при добавлении 2 % фруктозы. Культивирование велось трое суток при 250 об/мин и аэрации 1 л/л среды·мин⁻¹. Выходы представлены рисунке 80.

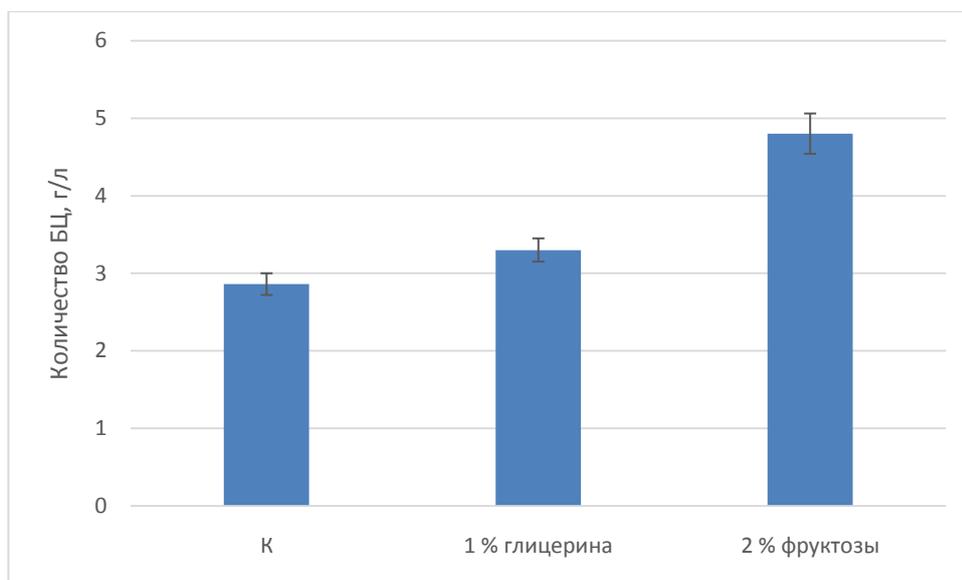


Рисунок 80 – Образование бактериальной целлюлозы *K. sacrofermentans* В-11267 на среде с бардой и добавлением 1% глицерина и 2 % фруктозы на третьи сутки культивирования в биореакторе объемом 6 л

Было проведено, культивирование на послеспиртовой барде в биореакторе Biostat V plus. Графики изменения рН и кислорода представлены на рисунке 81. Значение рН увеличивается в ходе культивирования до 60 часа с

3,9 до 6,1, что связано с потреблением органических кислот из среды, а затем наблюдается снижение рН до 5,40, что очевидно связано, с образованием органических кислот, в частности, глюконовой. Кроме того, можно заметить существенное снижение количества растворенного кислорода в ходе культивирования к 40 часу.

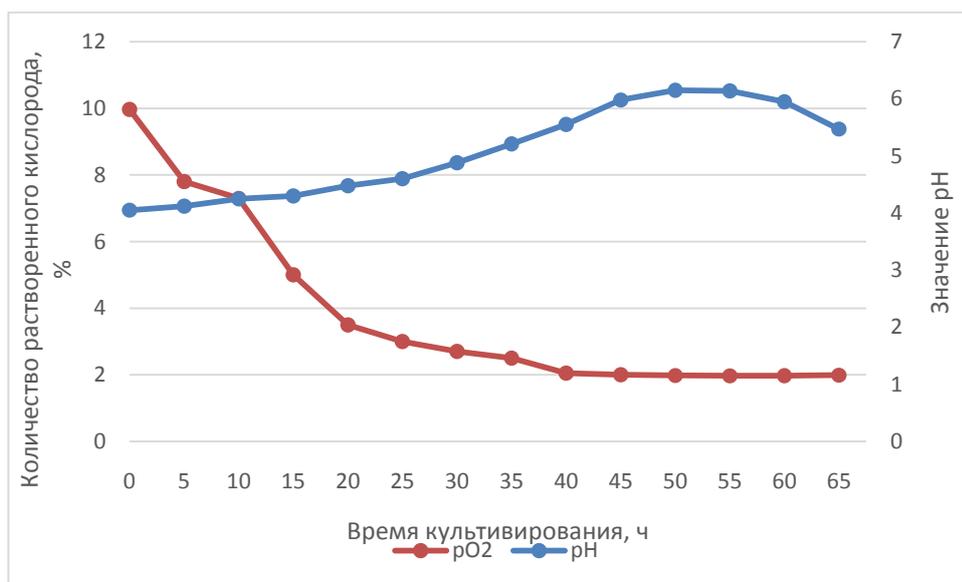


Рисунок 81 – Динамика изменения рН и растворенного кислорода при образовании БЦ *K. sacrofermentans* В-11267 в течение трех суток культивирования на послеспиртовой барде

Была изучена динамика изменения рН и растворенного кислорода в процессе культивирования при добавлении 1 % глицерина. Данные представлены на рисунке 82.

Значение рН увеличивается в ходе культивирования с 4,0 до 4,4, что связано с потреблением органических кислот из среды. Однако из-за наличия глицерина в среде можно заметить меньшее защелачивание среды, что может быть связано с потреблением глицерина. Также, наблюдается уменьшение количества кислорода в ходе культивирования с 15 до 3%.

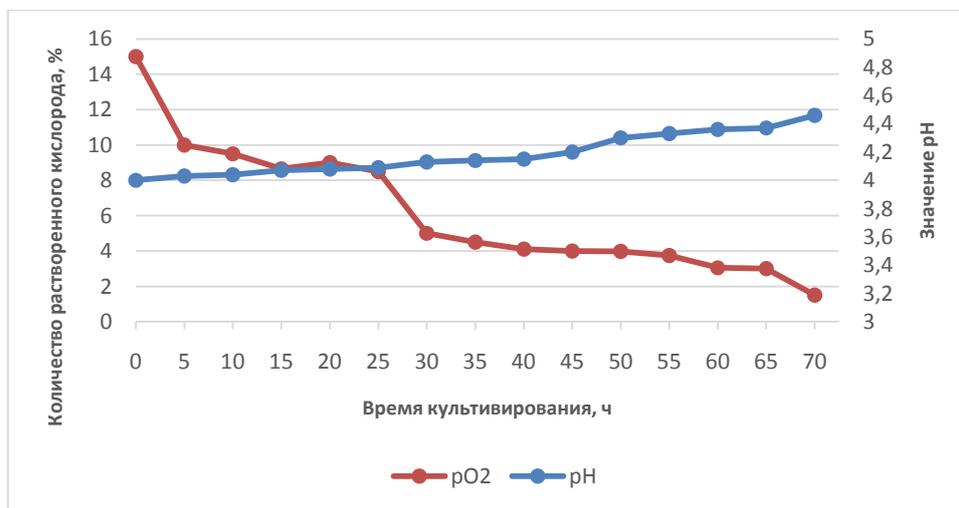


Рисунок 82 – Динамика изменения pH при образовании БЦ *K. sacrofermentans* B-11267 в течение трех суток культивирования на послеспиртовой барде с добавлением 1 % глицерина

Было проведено, культивирование на послеспиртовой барде с фруктозой. Графики изменения pH и количества растворенного кислорода представлены на рисунке 83. Значение pH увеличивается в ходе культивирования с 3,9 до 5, что связано с потреблением органических кислот из среды. А также можно заметить резкое уменьшение количества растворенного кислорода к 30 часу культивирования.

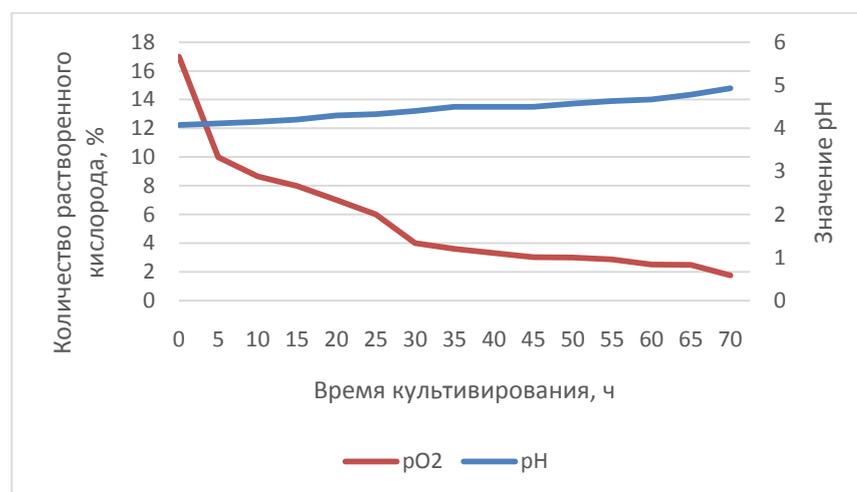


Рисунок 83 – Динамика изменения pH при образовании БЦ *K. sacrofermentans* B-11267 в течение трех суток культивирования на послеспиртовой барде с добавлением 2 % фруктозы

3.3.4.2 Изучение влияния условий культивирования на среде с мелассой

В дальнейшем проводили оптимизацию режимов, используя мелассу в качестве среды. Исследовали различные режимы культивирования в 6 л биореакторе Biostat V plus данные представлены рисунке 84.

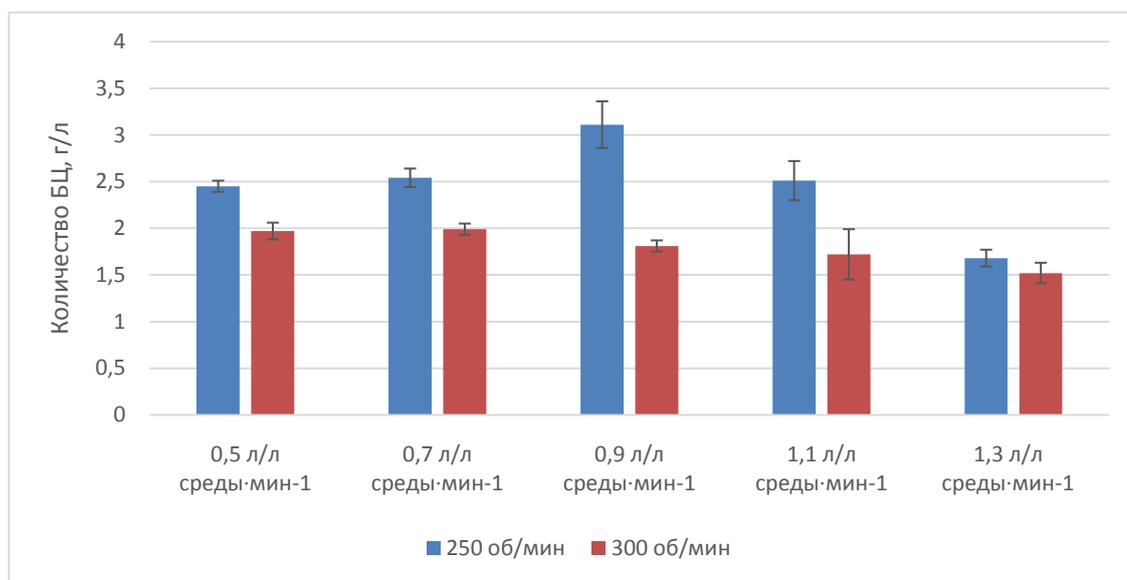


Рисунок 84 – Образование бактериальной целлюлозы *K. sucrofermentans* В-11267 на среде с 50 г/л мелассы на третьи сутки культивирования в биореакторе объемом 6 л при различных режимах культивирования

В процессе масштабирования подбирали условия для получения бактериальной целлюлозы в биореакторе объемом 6 л. Согласно полученным данным наибольший выход наблюдается при следующем режиме: аэрация – 0,9 л/мин и перемешивание – 250 об/мин. Выход составил – 3,11 г/л. При увеличении оборотов мешалки и аэрации наблюдается снижение образования продукта.

Оценили влияние условий культивирования в биореакторе Biostat Vplus на структуру БЦ с помощью рентгеноструктурного анализа. В качестве образца для исследования брали БЦ, полученную при аэрации среды – 0,5 л/л среды·мин⁻¹ и 1,1 л/л среды·мин⁻¹ и при режиме перемешивания 250 об/мин. Полученные данные представлены на рисунке 85.

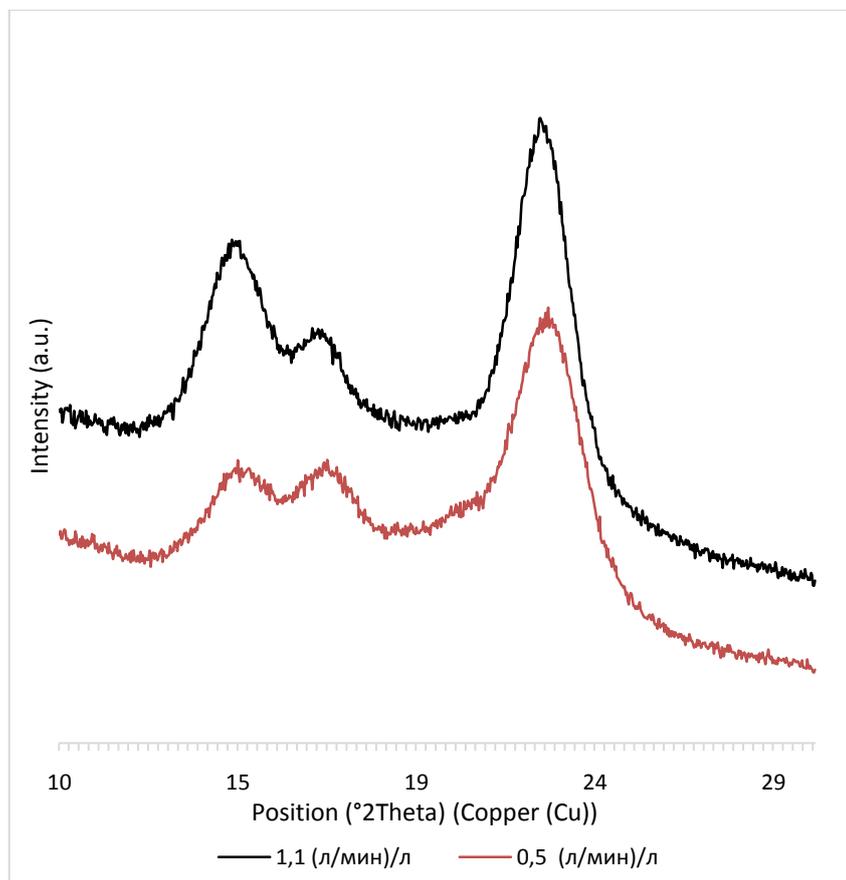


Рисунок 85 – Спектры рентгеновской дифракции (режим отражения) БЦ, полученной в биореакторе Biostat Vplus при перемешивании 250 об/мин и аэрации 0,5 и 1,1 (л/мин)/л среды на среде с мелассой

На полученных спектрах рентгеновской дифракции можно увидеть три основных пика $14,4^\circ$, $16,8^\circ$ и $22,5^\circ$, соответствующие кристаллографическим плоскостям (100), (010) и (110) соответственно.

Значения степени кристалличности целлюлозы, а также индекс кристалличности представлены в таблице 24. Можно заметить, резкое уменьшение степени кристалличности при увеличении степени аэрации. При режиме аэрации $0,5 \text{ л/л среды} \cdot \text{мин}^{-1}$ степень кристалличности составляла 61,0 %, а при $1,1 \text{ л/л среды} \cdot \text{мин}^{-1}$ – 50,2 %. Кроме того, происходит снижение индекса кристалличности с 1,60 до 1,37.

Таблица 24 – Индекс кристалличности, содержание α и β фаз и степень кристалличности БЦ, полученной в биореакторе при различных режимах аэрации

Режим аэрации и перемешивания	I α , %	I β , %	Индекс кристалличности	Степень кристалличности, %
0,5 л/л среды·мин ⁻¹ , 250 об/мин	44,8±0,65	55,2±0,65	1,60±0,15	61,0
1,1 л/л среды·мин ⁻¹ , 250 об/мин	46,5±0,57	53,5±0,57	1,37±0,11	50,2

В ходе исследования доказали увеличение выхода целлюлозы при культивировании на послеспиртовой барде с добавлением глицерина и фруктозы. При добавлении 2 % фруктозы наблюдается увеличение выхода в 1,7 раза. Установили, что наибольший выход образуется при режиме культивирования 0,9 л/л среды·мин⁻¹, и перемешивании 250 об/мин – 3,11±0,31 г/л. Кроме того, определили, что при увеличении аэрации наблюдается снижение степени кристалличности, полученной БЦ.

Для дальнейшего масштабирования, получали бактериальную целлюлозу в биореакторе объемом 30л.

3.3.5 Оптимизация получения бактериальной целлюлозы в биореакторе объемом 30 л (Biostat C plus)

Оптимизировали режим культивирования для максимального выхода полимера в биореакторе Biostat C plus на среде с мелассой в концентрации 5 %. Данные представлены на рисунке 86.

При изучении биосинтеза БЦ в 30 л биореакторе определили, что при увеличении степени аэрации при скорости оборотов мешалки 250 об/мин происходит увеличение выхода полимера. Наибольший выход был достигнут при аэрации 1,1 л/мин на литр среды – 2,8 г/л. При увеличении оборотов мешалки происходит увеличение выхода продукта. Однако при аэрации

1,1 л/мин на литр среды наблюдается снижение продуктивности, что вероятно говорит о негативном влиянии большого количества растворенного кислорода.

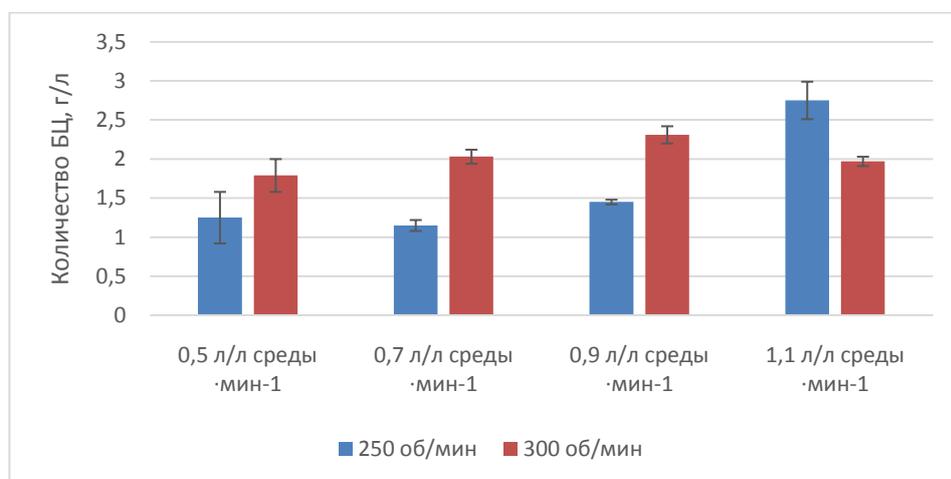


Рисунок 86 – Образование бактериальной целлюлозы *K. sucrofermentns* В-11267 при различных условиях культивирования на третьи сутки в биореакторе объемом 30 л на среде с мелассой

Кроме того, изучали структуру целлюлозы, полученной при наилучшем режиме культивирования. Спектр рентгеновской дифракции представлен на рисунке 87.

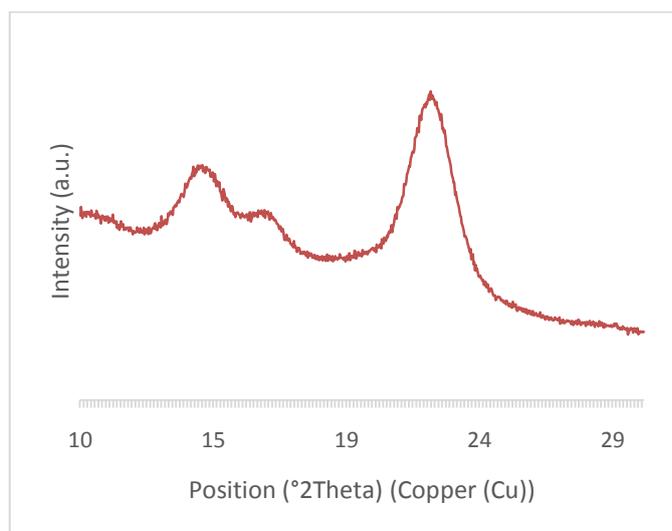


Рисунок 87 – Спектры рентгеновской дифракции (режим отражения) БЦ, полученной в биореакторе Biostat Cplus при перемешивании 250 об/мин и аэрации 1,1 (л/мин) / л среды на среде с мелассой

Значения степени кристалличности целлюлозы, а также индекс кристалличности представлены в таблице 25. Определили, что степень кристалличности изученного образца целлюлозы составила 54,6 %.

Таблица 25 – Индекс кристалличности, содержание α и β фаз и степень кристалличности БЦ, полученной в биореакторе Biostat C plus

Режим аэрации и перемешивания	I α , %	I β , %	Индекс кристалличности	Степень кристалличности, %
1.1 л/л среды·мин ⁻¹ , 250 об/мин	43,8±0,46	56,2±0,46	1,57±0,07	54,6

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что при культивировании продуцента в шейкере-инкубаторе наибольшее количество целлюлозы образуется при скорости перемешивания 250 об/мин: на среде с мелассой – 2,96±0,06 г/л, на среде с бардой и глицерином в концентрации 1 % – 4.2 г/л. Степень кристалличности БЦ на среде с мелассой составила 83.0 %, на среде с бардой – 82.3 %. Более тонкие волокна образуются на среде с бардой и составляют в среднем 36±6,0 нм. При культивировании на среде с мелассой были обнаружены волокна толщиной 56±8,2 нм.

В биореакторе объемом 1 л наибольшее количество БЦ образуется в среде с мелассой при скорости перемешивания 300 об/мин и интенсивности аэрации 0,7 л/л среды·мин⁻¹ – 3,66 ± 0,11 г/л. Показано, что при данном режиме целлюлоза характеризуется наилучшими свойствами: индекс кристалличности составил 1,97±0,06, степень кристалличности – 78,77 %, ширина волокон - 36,9±6,2 нм.

В биореакторе объемом 6 л наибольший выход наблюдается при следующем режиме: аэрация – 0,9 л/л среды мин⁻¹ и перемешивание – 250 об/мин. Показано, что наибольший выход БЦ – 4,8 г/л наблюдается на послеспиртовой барде с фруктозой в концентрации 2 %. На среде с мелассой выход БЦ составил 3,11 г/л. Однако, исходя из данных рентгеноструктурного анализа можно заметить снижение степени кристалличности целлюлозы при

увеличении степени аэрации. При аэрации 0,5 л/мин степень кристалличности составила 61,0 %, а при 1,1 л/л среды мин⁻¹ – 50,2 %.

При культивировании продуцента в 30 л биореакторе на среде с мелассой наибольший выход БЦ достигнут при аэрации 1,1 л/л среды мин⁻¹ и перемешивании со скоростью 250 об/мин – 2,8 г/л. Степень кристалличности целлюлозы составила 54,6 %.

Таким образом, в процессе масштабирования удалось получить БЦ в количестве не ниже уровня, полученного при культивировании в колбах. Однако обнаружено, что в процессе масштабирования в биореакторах происходило снижение степени кристалличности БЦ.

3.4. Получение гидрогелей с антибактериальными свойствами на основе БЦ и хитозана

3.4.1 Антибактериальная активность хитозана

Биологическая активность хитозана существенно зависит от его молекулярной массы и степени ацетилирования (СД). Оба параметра независимо влияют на антимикробную активность хитозана, хотя при изучении литературных данных обнаружено, что влияние ММ на антимикробную активность больше, чем влияние СД. Как уже упоминалось, СД оказывает существенное влияние на растворимость и заряд молекулы, где группы –NH₂, –ОН в молекуле хитозана считаются доминирующими реактивными центрами. Следовательно, чем выше СД, тем больше будет количество свободных аминогрупп, присутствующих в хитозане, и выше будет антимикробный эффект (Gou et al., 2009).

На первом этапе проверяли антибактериальную активность образцов хитозана.

1. Хитозан низкомолекулярный, с ММ 50-190 кДА с СД=75 % – 85 % (Sigma-Aldrich, Германия).

2. Хитозан высокомолекулярный, с ММ 310-375 кДа с СД>75 % (Sigma-Aldrich, Германия).

Антибактериальную активность определяли диффузионным методом при помощи лунок. Использовали три тест-культуры *Staphylococcus aureus*, *B. licheniformis* и *Escherichia coli*. Использовали раствор хитозана в 1 % уксусной кислоте в концентрации 0,5 % и 1 %. Данные представлены в таблице 26 и на рисунке 88.

Таблица 26 – Изучение антибактериальной активности хитозана

Исследуемый образец хитозана	Диаметр зон задержки роста образцов хитозана (0,5 и 1 % раствора) на исследуемые тест-культуры, см ²					
	0,5 % раствор			1 % раствор		
	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. licheniformis</i>
Хитозан НМ	3,23±0,2	1,13±0,1	1,81±0,1	3,37±0,3	3,41±0,2	2,41±0,4
Хитозан ВМ	3,06±0,1	-	1,18±0,2	3,92±0,4	2,36±0,1	2,10±0,06

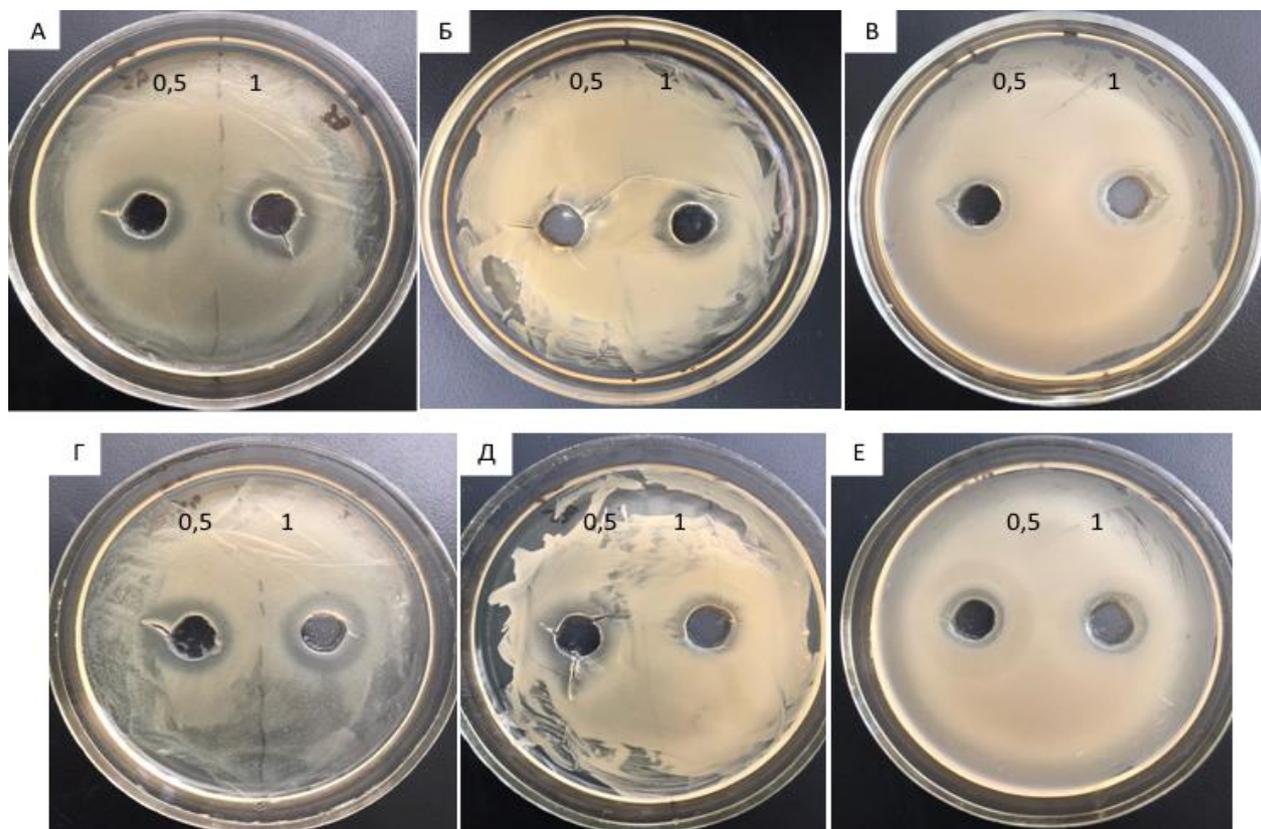


Рисунок 88 – Антибактериальная активность растворов хитозана: А – НМ против *E. coli*, Б – НМ против *St. aureus*, В – НМ против *B. licheniformis*, Г – ВМ против *E. coli*, Д – ВМ против *St. aureus*, Е – ВМ против *B. licheniformis*

Из полученных данных, можно заметить, что при увеличении концентрации хитозана до 1 % происходит увеличение антибактериальной активности у всех исследованных образцов хитозана. При этом, наибольшая активность низкомолекулярного хитозана проявляется против грам положительной культуры *St. aureus* и Грам отрицательной *E.coli*, тогда как высокомолекулярный хитозан проявляет большую активность против грам отрицательной *E.coli*. В связи с чем, для создания композита нами был выбран низкомолекулярный хитозан.

Антимикробная активность хитозана в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий широко изучалась. Поликатионные молекулы хитозана могут взаимодействовать с анионными компонентами мембраны бактериальной клетки, что приводит к утечке внутриклеточных электролитов и других низкомолекулярных компонентов клетки. В конечном итоге это подавляет рост бактерий (Tanrichai, 2020).

Однако, согласно литературным данным, имеется противоположная информация. Антибактериальный эффект хитозана на *S. aureus* усиливался с увеличением ММ, но антибактериальный эффект хитозана на *E. coli* снижался с увеличением ММ. Антибактериальная активность хитозана с низкой молекулярной массой как правило выше, чем у хитозана с высокой молекулярной массой, поскольку антибактериальным механизмом действия хитозана против *E. coli* является флокуляция (Li, 2020).

В литературе, однако, нет однозначного мнения о влиянии ММ хитозана на его биологическую активность. Например, в работе (Fernandes et al, 2009) показано, что при увеличении ММ хитозана происходит увеличение антибактериального эффекта против вегетативных клеток *Bacillus cereus*. Антибактериальную активность высокомолекулярного хитозана можно объяснить увеличением количества аминогрупп. Это способствует более прочному связыванию полимера с поверхностными структурами клетки, что может уменьшить скорость диффузии питательных веществ, в которых нуждается микробная клетка. Однако, противоположное мнение, можно

обнаружить в работе (Kumar et al., 2007). Более высокой антибактериальной активностью обладают низкомолекулярные образцы хитозана. Антибактериальную активность низкомолекулярного хитозана авторы работы связывают с тем, что он обладает большей проникающей способностью через клеточную стенку бактерий, нарушает их функционирование, влияя на физиологические внутриклеточные процессы, что приводит клетку к гибели (Попова, 2017).

Результаты эффективности антимикробной активности хитозановых пленок найдены в исследованиях (Foster et al, 2011). Согласно сведениям данных авторов, сильная противомикробная эффективность хитозана была обнаружена только тогда, когда хитозан находился в форме раствора, тогда как микробное ингибирование хитозана не было обнаружено в значительной степени при использовании тонких пленок хитозана. Это могло быть связано с ограниченным взаимодействием катионных цепей хитозана в пленках с бактериальными клетками. Подобная потеря микробного ингибирования наблюдалась также при использовании бумаги с хитозановым (10 мас. %) покрытием (Deng, 2017). Когда концентрация хитозана была увеличена до 20 мас. %, общее количество бактерий снижалось. Эти исследования, привели к возникновению идеи об использовании хитозана в сочетании с целлюлозой в форме влажного гидрогелевого материала. В связи с чем на следующем этапе работы получали данные материалы.

3.4.2 Получение гидрогелей на основе бактериальной целлюлозы и хитозана

Гидрогели состоят из гидрофильной полимерной сети, способной впитывать большое количество биологической жидкости или воды. Их эластичность, характеристики набухания, способность связывать лекарственные препараты и создавать благоприятную среду для заживления делают их потенциальными кандидатами для биомедицинских применений.

В качестве основы для создания гидрогелей особое внимание привлекают биополимеры, в частности БЦ. Однако, низкая абсорбционная способность из-за присутствия высококристаллических областей ограничивает ее применение в чистом виде (Pandey et al., 2014). Кроме того, бактериальная целлюлоза не обладает антибактериальной активностью.

Таким образом, при использовании в составе композита других полимеров, обладающих необходимыми свойствами, можно преодолеть эти недостатки. Перспективным антибактериальным биополимером является хитозан. Потенциал объединения БЦ и хитозана велик: устраняются недостатки обоих полимеров; получается материал с хорошими механическими свойствами, бактерицидной активностью и способностью разлагаться.

Технология semi-IPN – это эффективный и простой метод разработки гидрогелей на основе синтетических или биополимеров, таких как хитозан. В системе гидрогелей полу-IPN один полимер сшит, а другой полимер остается линейным. Линейный полимер остается физически связанным со сшитым полимером за счет сил Ван-дер-Ваальса, электростатических взаимодействий, водородных связей, гидрофобных взаимодействий или комбинации этих взаимодействий (Wahid, 2018).

Были получены гидрогели на основе БЦ и хитозана, в соотношении БЦ-хитозан 20:80, 50:50 и 80:20 при использовании в качестве сшивающего агента глутарового альдегида в количестве 2 %. Кроме того, в качестве контроля исследовали гидрогель на основе БЦ и чистого хитозана с глутаровым альдегидом (рисунок 89).

Гидрогель на основе чистого хитозана характеризовался хрупкостью. Гидрогель, содержащий 80 % целлюлозы, обладал низкой стабильностью, плотностью, плохо держал форму, вероятно из-за низкого содержания хитозана. Суспензия на основе БЦ не сшивалась при добавлении глутарового альдегида, в связи с чем в качестве контроля использовали гель-пленку БЦ.

Поскольку БЦ и хитозан имеют сходные структуры, ожидалась хорошая совместимость и взаимодействие на молекулярном уровне между обоими полимерами.

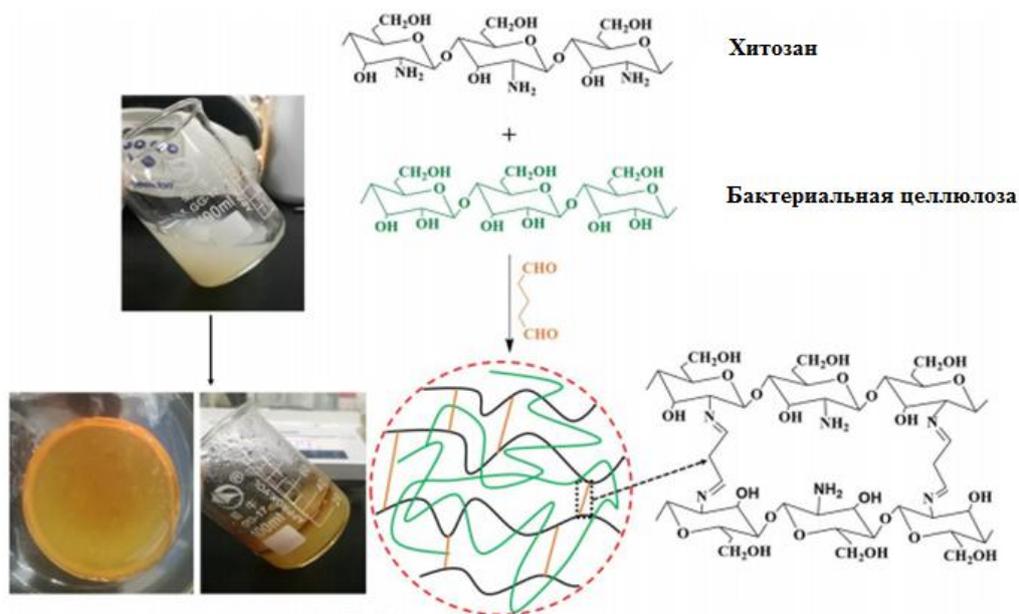


Рисунок 89 – Гидрогель бактериальная целлюлоза-хитозан, полученный при сшивании с помощью глутарового альдегида

На рисунке 90 показаны ИК-спектры БЦ и высушенных гидрогелей БЦ и хитозана в соотношении 80:20, 50:50 и 20:80, а также чистого хитозана.

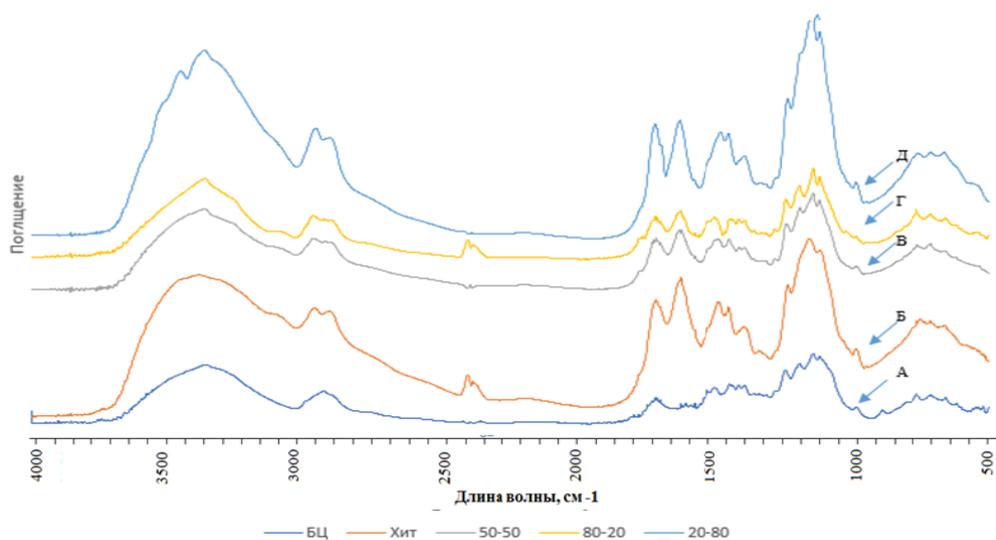


Рисунок 90 – ИК-спектры пленки БЦ, хитозана и композитов БЦ-хитозан в соотношении 80:20, 50:50, 20:80

В частности, на ИК-спектрах чистых пленок БЦ обнаружена область поглощения при $3200 - 3500 \text{ см}^{-1}$ с пиком при 3330 см^{-1} , которая соответствует валентным колебаниям гидроксильных групп, связанных межмолекулярными и внутримолекулярными водородными связями. Поглощение в областях 1161 и 1050 см^{-1} вызвано ассиметричными колебаниями С-О-С группы и вибрациями С-С, С-ОН, С-Н групп пиранозного кольца глюкозы, соответственно. Характерные полосы при 1456 , 1161 , 1108 и 894 см^{-1} указывают на целлюлозу I в качестве основного компонента (Casaburi et al., 2017).

В то же время, в спектре чистого гидрогеля хитозана обнаружены полосы поглощения при 1645 см^{-1} (амид I) и 1373 см^{-1} (амид III). Другой пик при 1558 см^{-1} можно отнести к С = N реакции глутаральдегида с аминогруппой хитозана с образованием имидной связи.

Полосы поглощения при 1147 см^{-1} (антисимметричное растяжение моста С-О-С), 1065 см^{-1} и 1026 см^{-1} (скелетные колебания с участием растяжения С-О) характерны для структуры хитозанового сахара.

После создания композита БЦ-хитозан материал демонстрировал все пики, описанные для БЦ и дополнительные пики, указывающие на присутствие хитозана. Пики на 1647 см^{-1} , 1556 см^{-1} и 1369 см^{-1} наблюдались в композите 50:50 и приписывались хитозанамиду I, амиду II и амиду III, соответственно. В варианте с большим количеством хитозана 20:80 присутствуют соответствующие пики при 1649 см^{-1} , 1560 см^{-1} и 1377 см^{-1} .

Как видно, полосы поглощения хитозана при 1645 см^{-1} и 1558 см^{-1} были смещены в композитах БЦ-хитозан 50:50 и 20:80 до 1647 и 1649 см^{-1} и 1556 и 1560 см^{-1} , соответственно, что предполагает взаимодействие между целлюлозой и хитозаном.

Кроме того, пик, относящийся к растяжению О-Н, стал шире, что позволяет предположить, что молекулы хитозана вмешиваются в водородные связи между цепями целлюлозы. Характерные полосы хитозана смещены в присутствии целлюлозы, что указывает на межмолекулярную связь между

аминогруппами хитозана и гидроксильными остатками БЦ с образованием водородных связей (Wahid, 2018).

Для дополнительного изучения структуры полученных композиционных материалов использовали метод компьютерной микротомографии. Результаты представлены на рисунке 91.

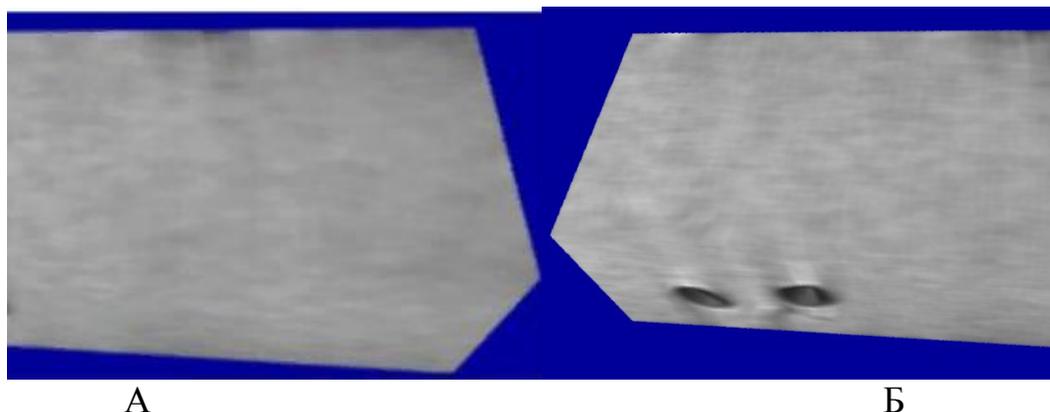


Рисунок 91 – Рентгеновские микротомографии гидрогелей:

А – БЦ:хитозан (50:50); Б – БЦ:хитозан (20:80)

При сканировании этих образцов установлено, что структура гидрогелей однородная, плотная, поры отсутствуют. Однако в образце БЦ:хитозан (20:80), с одного края обнаружено наличие двух отверстий, которые вероятно образовались вследствие механического перемешивания при реакции сшивания.

Морфология поперечного сечения гидрогелей была исследована методом СЭМ. Как показано на рисунке 92, все гидрогели представлены микропористыми структурами, что справедливо для всех видов лиофильно высушенных гидрогелей и соответствует литературным данным (Wahid et al., 2018).

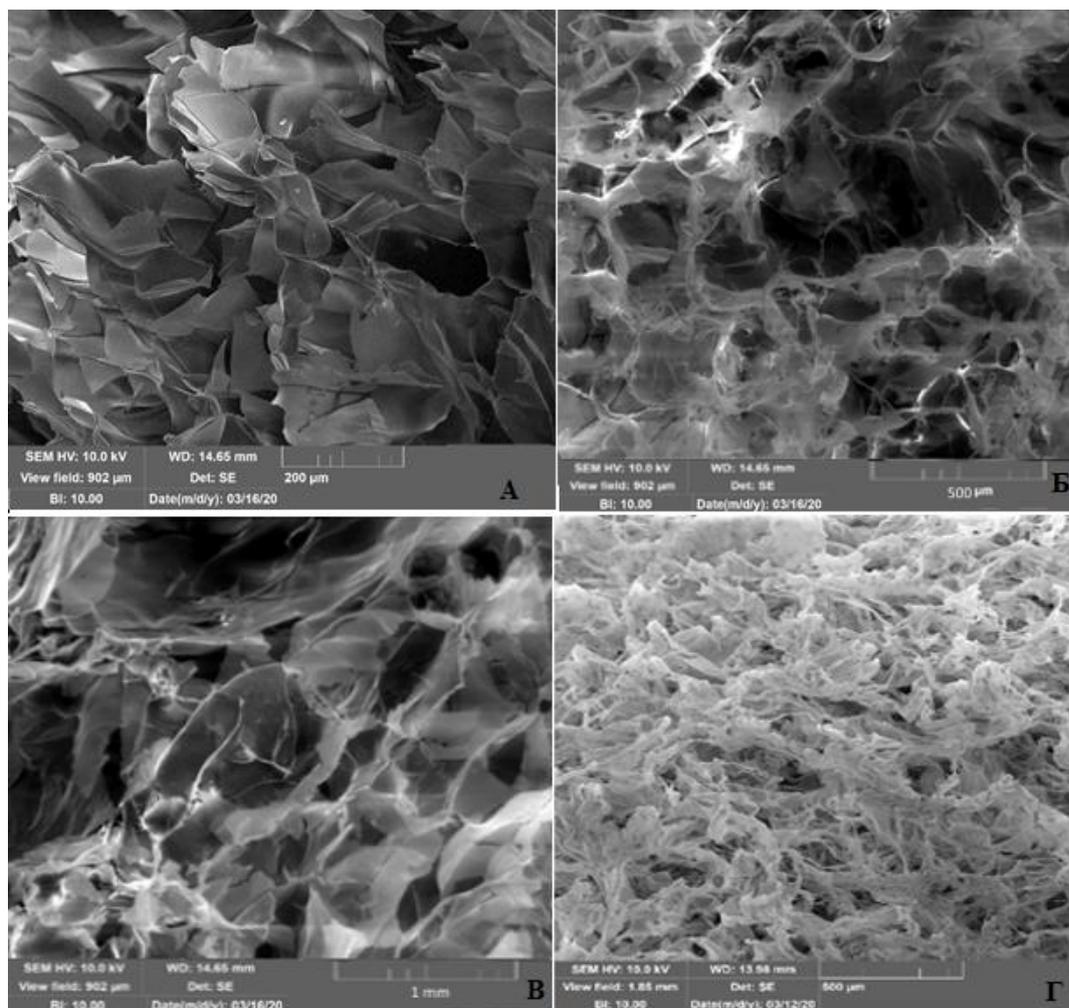


Рисунок 92 – СЭМ–изображения структуры гидрогелей БЦ-хитозан:

А – Хитозан (200 мкм), Б – 20:80 (500 мкм), В – 50:50 (100 мкм),

Г – БЦ (500 мкм)

У изученных образцов наблюдаются различия в структуре, а именно размере пор. Чистый гидрогель хитозана характеризуется наибольшим размером пор (рисунок 92 А), в то время как размер пор уменьшается путем введения БЦ в гидрогели (БЦ-20 и БЦ-50), как показано на рисунке 92 Б и 92 В. Что может быть вызвано, более упорядоченной и тонной структурой волокон БЦ (рисунок 92 Г).

Содержание гелевой фракции гидрогелей БЦ-хитозан показаны на рисунке 93. Наибольшим значением – 87,5 % характеризуется чистая целлюлоза, тогда как в композитах значение содержания гелевой фракции увеличивается с 72,3 % до 86,1 % с увеличением содержания целлюлозы в

композите. БЦ является гидрофильным полимером с высокой водопоглощающей способностью, а хитозан обладает способностью набухать в воде. В композиции влагоудерживающая способность и гелеобразующие свойства комбинированных полимеров могли бы увеличиться, что привело к высокому содержанию гелевой фракции (Wahid et al., 2018).

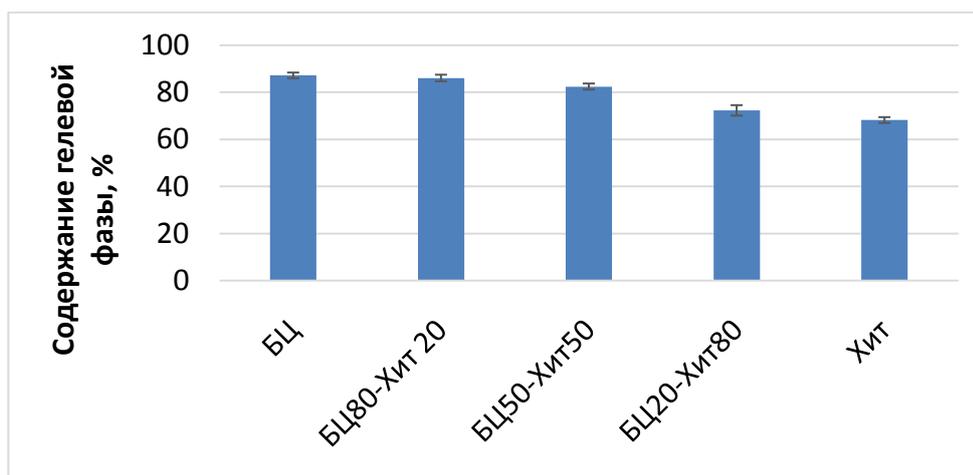


Рисунок 93 – Содержание гелевой фазы гидрогелей

Влагосвязывающая способность гелей была определена при использовании воды в течении 24 ч, данные представлены на рисунке 94.

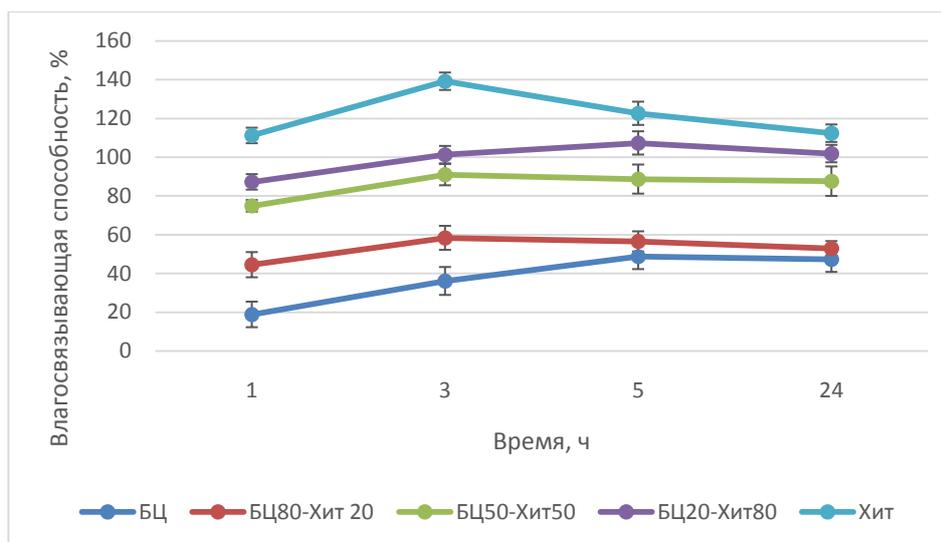


Рисунок 94 – Влагосвязывающая способность гидрогелей на основе целлюлозы и хитозан

Согласно полученным данным, наибольшая влагосвязывающая способность наблюдается у гидрогеля чистого хитозана, причем максимум ($139,1 \pm 7,2$) наблюдается на 3 ч, а затем несколько снижается. При увеличении концентрации целлюлозы в гидрогелях наблюдается снижение влагосвязывающей способности, и минимальные значения наблюдаются у чистой гель-пленки БЦ. Во всех вариантах максимальная влагосвязывающая способность наблюдается на 3 час.

Для дальнейшего исследования были отобраны образцы БЦ-хитозан 50:50 и 20:80, поскольку они обладали наилучшими обобщающими характеристиками.

Поскольку, согласно литературным источникам, механизм действия хитозана основан на электростатическом взаимодействии, он предполагает, что чем больше количество катионизированных аминов, тем выше будет антимикробная активность.

После проведенных исследований предположили о возможности уменьшения концентрации сшивающего агента. В связи с чем, получили два аналогичных композита при использовании 1 % глутарового альдегида.

Влагосвязывающая способность гелей была определена при использовании воды в течении 24 ч и показана на рисунке 95.

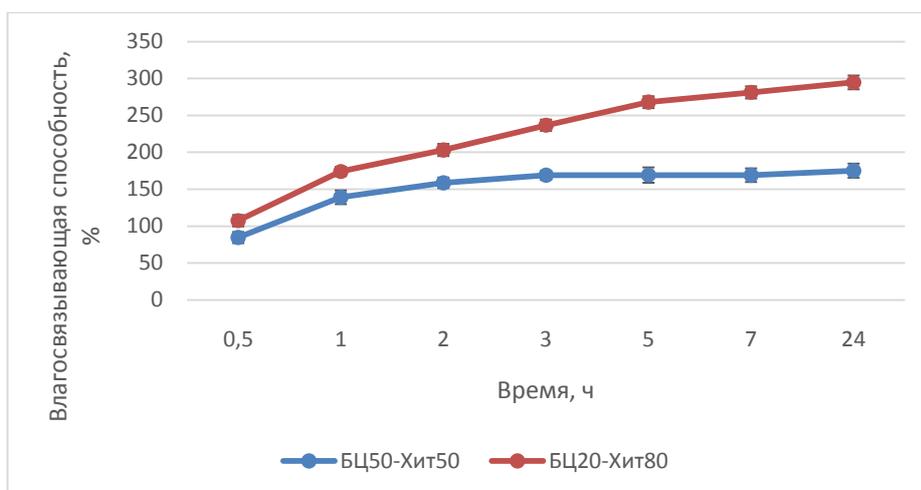
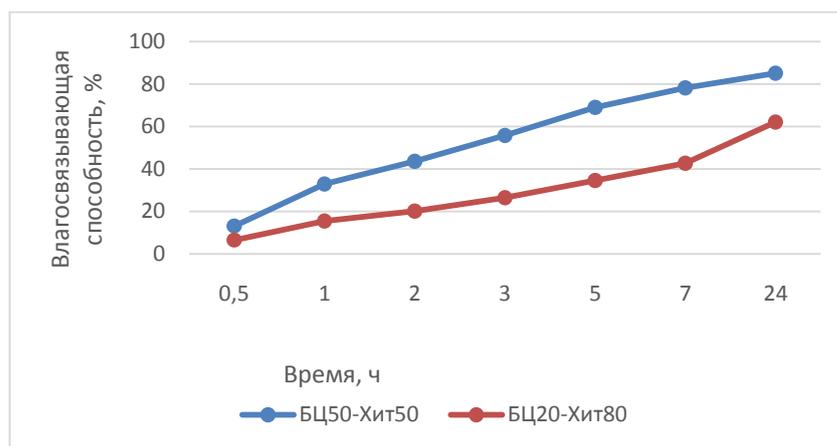


Рисунок 95 – Влагосвязывающая способность гидрогелей

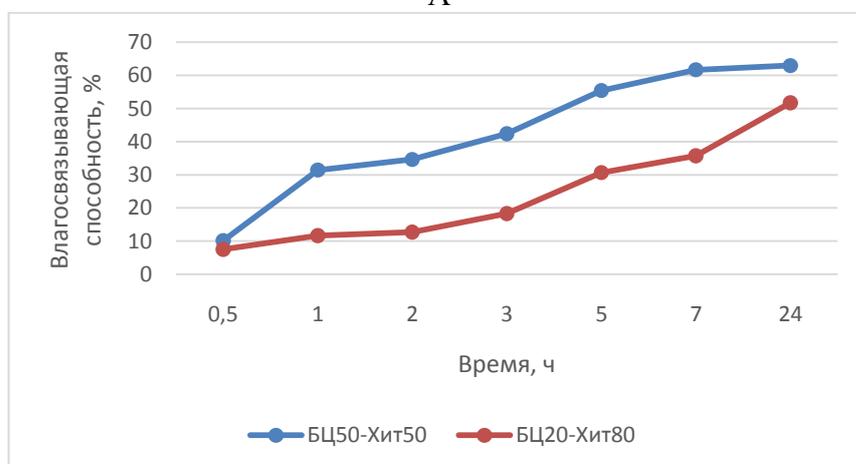
Согласно представленным данным, наибольшая влагосвязывающая способность наблюдается у образца с соотношением БЦ-хитозан 20:80 – 297,7 % на 24 ч. Тогда как у образца с большим содержанием целлюлозы (50:50) наблюдается также, как и ранее меньшее значение влагосвязывающей способности – 175,2 %.

В сравнении с ранее полученными гидрогелями с большим содержанием сшивающего агента, у данных гидрогелей существенно повышается влагосвязывающая способность, что вероятно может быть связано с большим содержанием реакционных групп. Так же можно заметить, что способность связывать воду продолжается до 24 ч выдержки.

Также изучалась влагосвязывающая способность композитов в растворах NaCl и CaCl₂. Данные представлены на рисунке 96.



А



Б

Рисунок 96 – Влагосвязывающая способность гидрогелей целлюлозы

А – раствора NaCl, Б – раствора CaCl₂

Согласно полученным результатам, наибольшая влагосвязывающая способность наблюдается у гидрогелей с соотношением БЦ: хитозан 50:50.

Таким образом, гидрогели с соотношением БЦ: хитозан 50:50 и 20:80 показали хорошую влагосвязывающую способность.

3.4.2.1 Изучение антибактериальной активности контрольных гидрогелей бактериальная целлюлоза:хитозан

Антибактериальная активность контрольных гидрогелей без антибиотика была протестирована на тест-культурах *S. aureus*, *B. licheniformis* и *E. coli*. В таблице 27 показаны диаметры зон задержки роста. Все образцы показали антибактериальную активность против данных бактериальных штаммов. Диаметр зон ингибирования увеличивается при увеличении содержания хитозана в гидрогелях. Кроме того, можно заметить, что наибольшая активность гидрогелей проявляется против *B. licheniformis* при использовании гидрогеля 20:80 с 1 % ГА.

Таблица 27 – Антибактериальная активность контрольных гидрогелей БЦ-хитозан без антибиотика

Тест-культура	Площадь зон задержки роста тест-микроорганизмов, см ² при использовании гидрогелей БЦ:хитозан без антибиотика с различным количеством глутарового альдегида			
	50:50		20:80	
	1%	2 %	1 %	2 %
<i>S. aureus</i>	1,0±0,1	1,2±0,1	1,5±0,2	1,6±0,2
<i>E.coli</i>	1,8±0,1	1,6±0,1	2,3±0,2	1,8±0,1
<i>B. licheniformis</i>	1,1±0,1	0,8±0,1	2,6±0,1	1,4±0,2

Так же, можно заметить, что при тестировании гелей против *S. aureus* не наблюдается значительных отличий в эффективности при использовании 1 или 2 % ГА. При исследовании активности против *E. coli* в случае гидрогелей с соотношением БЦ:хитозан 20:80, аналогично с *B. licheniformis* наибольшая активность проявляется при использовании 1 % ГА. Что вероятно вызвано тем, что хитозан находится в менее сшитом состоянии и содержит большее число заряженных групп.

3.4.3 Получение гидрогелей с фузидином натрия

Были получены гидрогели БЦ:хитозан (2 % глутарового альдегида), содержащие 200 мкг фузидина натрия / 1 г гидрогеля. Антибактериальная активность гидрогелей была проверена на тест-микроорганизмах: грамположительных бактериях *S. aureus*, *B. licheniformis* и грамотрицательных бактериях *E. coli*. В таблице 28 показаны зоны бактерицидной активности образцов гидрогелей (рисунок 97). Все образцы показали антибактериальную активность в отношении исследуемых тест-культур.

Таблица 28 – Зоны задержки роста бактерий *S.aureus*, *B. licheniformis* *E.coli* при использовании гидрогелей

Тест-культура	Площадь зон задержки роста тест-микроорганизмов, см ² при использовании гидрогелей с различным соотношением целлюлоза:хитозан	
	50:50	20:80
<i>S. aureus</i>	8,7±0,5	11,9±0,4
<i>E. coli</i>	3,1±0,2	4,1±0,2
<i>B. licheniformis</i>	1,1±0,2	2,3±0,5

Зоны ингибирования как для *S. aureus*, так и для *E.coli* увеличивались при увеличении содержания хитозана в гидрогелях. Так при использовании гидрогеля с соотношением БЦ:хитозан 50:50 площадь зон задержки роста *S. aureus* составила 8,7±0,5 см², а гидрогеля с соотношением БЦ:хитозан 20:80 – 11,9±0,4см². Площади зон отсутствия роста *E. coli* составили 3,1±0,2 см² и 4,1±0,2см² для гидрогеля с соотношением БЦ:хитозан 50:50 и 20:80, соответственно. Гидрогели проявляют большую активность в отношении *S. aureus*.

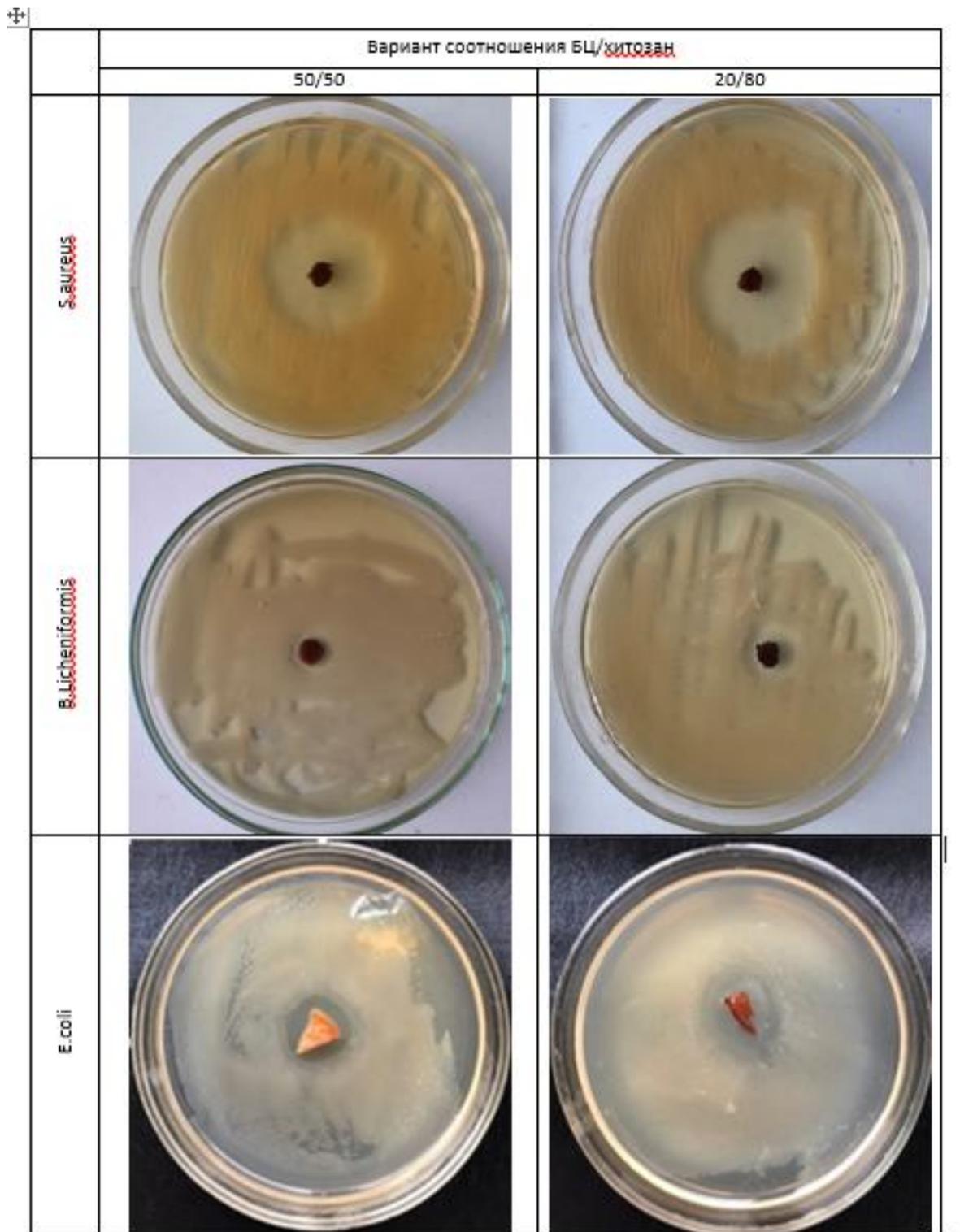


Рисунок 97 – Зоны задержки роста тест-организмов *S.aureus*, *B. licheniformis*, *E.coli* при использовании гидрогелей БЦ-хитозан-фузидин натрия

На следующем этапе, увеличили концентрацию антимикробного агента, проверяли концентрации 200, 400 и 600 мкг фузидина натрия / 1 г гидрогеля, и

исследовали антибактериальную активность против *S. aureus*. Данные представлены в таблице 29 и на рисунке 98.

Таблица 29 – Зоны задержки роста тест-организма при использовании гидрогелей с различной концентрацией фузидина натрия.

Соотношение БЦ-хитозан	Площадь зон задержки роста тест-микроорганизмов, см ²		
	Концентрация фузидина натрия		
	200 мкг / г	400 мкг / г	600 мкг/г
Гидрогель 50-50	5,6±0,4	8,7±0,4	14,7±0,4
Гидрогель 20-80	10,0±0,5	12,6±0,5	16,4±0,4

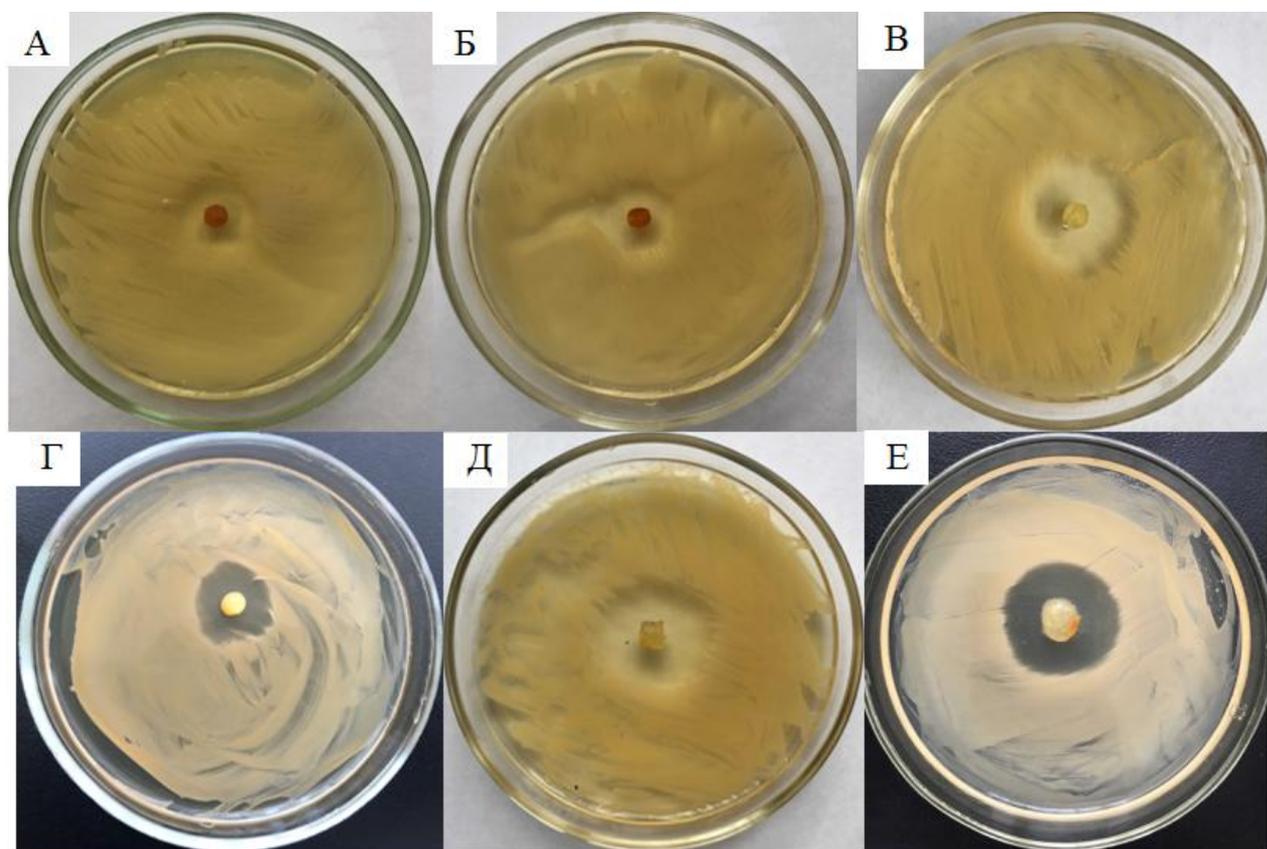


Рисунок 98 – Зоны задержки роста тест-организма при использовании гидрогелей с различной концентрацией фузидина натрия: А – 50/50 200 мкг/г, Б – 50/50 400 мкг/г, В – 50/50 600 мкг/г, Г – 20/80 200 мкг/г, Д – 20/80 400 мкг/г, Е – 20/80 600 мкг/г

Из полученных данных видно, что с увеличением концентрации антибиотика фузидина натрия с 200 до 600 мкг / 1 г гидрогеля, происходит увеличение площади зон задержки роста с $5,6 \pm 0,4$ см² до $14,7 \pm 0,4$ при использовании гидрогеля с соотношением 50:50, и с $10,0 \pm 0,5$ до $16,4 \pm 0,4$ см² при использовании гидрогеля с соотношением 20:80.

Кроме того, определяли антибактериальную активность методом подсчета колониеобразующих единиц, путем помещения 0,5 г гидрогеля в пробирку с 5 мл бактериальной суспензии. Данные представлены в таблице 30.

Таблица 30 – Количество жизнеспособных клеток (КОЕ / мл) и снижение жизнеспособности клеток (%) микроорганизмов при динамическом контакте с композитами бактериальная целлюлоза/хитозан при различных концентрациях глутарового альдегида в присутствии фузидина натрия

Вариант гидрогеля	Время выдержки, ч	Тест-культура <i>S. aureus</i>	
		Снижение жизнеспособности клеток (%)	КОЕ/мл
БЦ:хит 20:80 200 мкг/г ФН 2 % ГА	0	0	20×10^6
	1	10	18×10^6
	3	35	13×10^6
	8	65	7×10^6
	24	99,5	$0,09 \times 10^6$
БЦ:хит 20:80 200 мкг/г ФН 1 % ГА	0	0	126×10^6
	1	34,0	83×10^6
	3	72,0	35×10^6
	8	99,8	$0,2 \times 10^6$
	24	100	0
БЦ:хит 20:80 без ФН 2 % ГА	0	0	183×10^6
	1	3,8	176×10^6
	3	28,9	130×10^6
	8	38,8	112×10^6
	24	55,7	81×10^6

Согласно полученным результатам, образцы, содержащие фузидат натрия в течение 24 часов, подавляют рост *S. aureus*. Однако, можно заметить, что при

использовании 1 % глутарового альдегида, снижение количества микроорганизмов происходит с большей скоростью.

3.4.4 Получение гидрогелей на основе окисленной бактериальной целлюлозы, хитозана и фузидовой кислоты

Предполагается, что введение дополнительных функциональных групп в нановолокна БЦ повысит их активность, и будет удобнее иммобилизовать многие виды биомакромолекул, что приведет к дополнительным функциям и / или улучшенным характеристикам материалов.

Среди различных методов наиболее широко использовались окисления периодатом и ТЕМПО. Периодатное окисление характеризуется специфическим разрывом связи С2-С3 глюкопиранозидного кольца, и это расщепление приводит к образованию двух альдегидных групп на единицу глюкозы.

Селективное окисление может быть достигнуто с помощью каталитических методов. ТЕМПО-опосредованное окисление стало наиболее перспективным методом селективного окисления первичных гидроксильных групп в альдегиды (Luo, 2013).

Окисление, опосредованное ТЕМПО, является наиболее распространенным методом модификации и активации целлюлозы (рисунок 99), поскольку оно является основой для введения функциональных карбоксильных групп (Elayaraja et al., 2021).

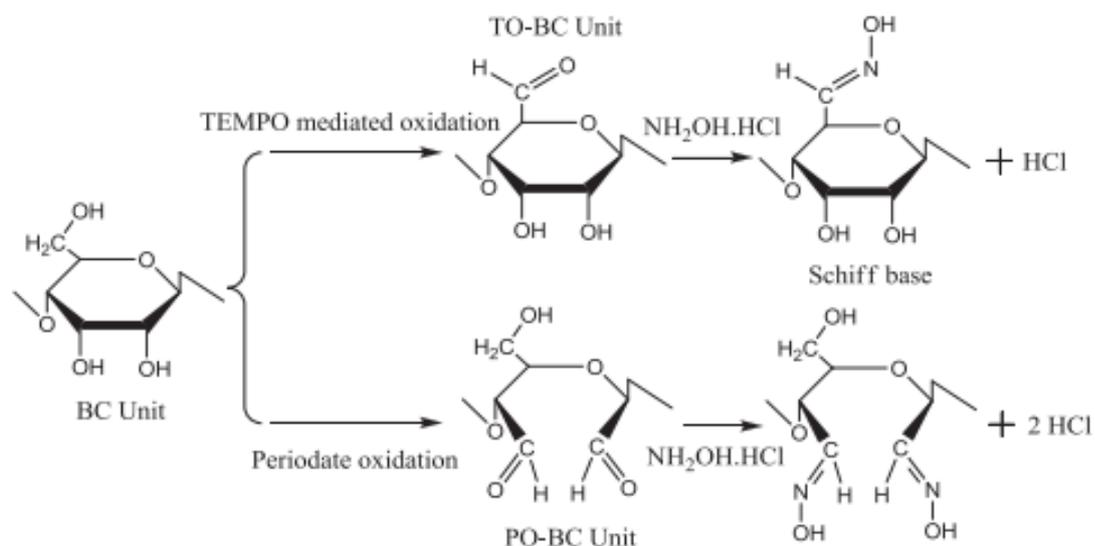


Рисунок 99 – Механизм периодатного окисления, ТЕМПО-опосредованного окисления и реакции основания Шиффа (Луо, 2013)

Изучили ИК-спектры полученных композитов, которые представлены на рисунке 100.

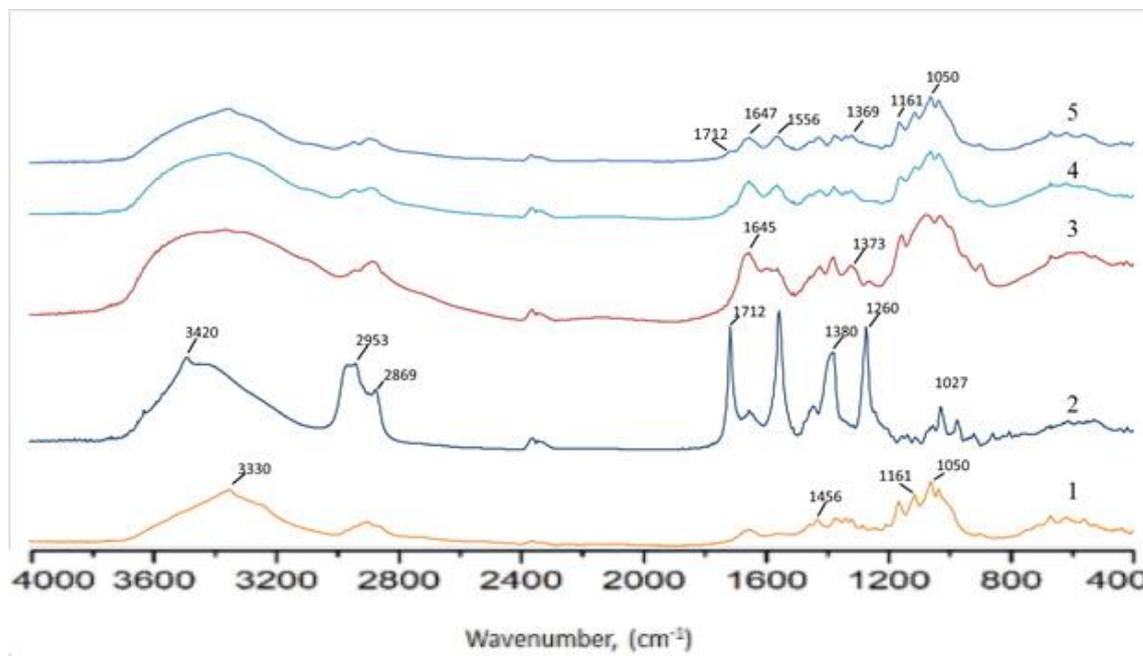


Рисунок 100 – ИК-спектры: 1 – БЦ, 2 – фузидин натрия, 3 – хитозан, 4 – БЦ-хитозан-ФН, 5 – оБЦ-хитозан-ФН

При анализе ИК-спектров чистой фузидовой кислоты, наблюдалась интенсивная полоса длине волны при 3500 см^{-1} , что было связано с вызвано валентным колебанием групп ОН.

При 1712 см^{-1} наблюдаются интенсивные колебания, связанные с симметричным и асимметричным растяжением карбонильных групп. Интенсивные полосы, расположенные на $1380, 2869\text{ см}^{-1}$, были связаны с симметричными метильными группами, а колебания, расположенные на 2953 см^{-1} , были связаны и асимметричными деформациями метильных и метиленовых групп. Вибрация, расположенная на 1260 см^{-1} , была связана с растяжением вибрации групп $\text{C}=\text{O}$, а вибрация, расположенная на 1027 см^{-1} , была связана с растяжением первичных спиртов.

Инфракрасный спектр чисто фузидовой кислоты показал три характерные полосы при $3420, 1725, 1260\text{ см}^{-1}$. Поглощение при $3420, 1725\text{ см}^{-1}$ было вызвано валентным колебанием водородно-связанных групп ОН и карбоксильных групп ФК.

Целлюлоза имеет в ИК-спектре широкую полосу поглощения в области $3000\text{-}3700\text{ см}^{-1}$, которая характеризует валентные колебания гидроксильных групп, включенных в водородную связь. ИК-спектр пленок целлюлозы показал пики при 3330 см^{-1} и 2920 см^{-1} , относящиеся к О-Н и алифатическое валентное колебание С-Н соответственно. Полосы при 1660 и 1480 см^{-1} указывают на то, что на поверхности расположены карбоксильные и карбоксилатные группы. Поглощение в областях 1161 и 1050 см^{-1} вызвано ассиметричными колебаниями С-О-С группы и вибрациями С-С, С-ОН, С-Н групп пиранозного кольца глюкозы, соответственно. Характерные полосы при $1456, 1161, 1108$ и 894 см^{-1} указывают на целлюлозу I в качестве основного компонента (Casaburi et al., 2017).

В спектрах хитозана обнаружили полосы поглощения при 1645 см^{-1} – амид (колебания $\text{C}=\text{O}$), 1320 см^{-1} – амид и 1520 см^{-1} – изгиб NH_2 . Полоса поглощения при 1160 см^{-1} , связанна с антисимметричным колебанием мостика

СО-С. Пик при 1080 и 1035 см^{-1} , показывают скелетные колебания с участием растяжения С-О, характерные для структуры полисахарида хитозана.

В композитах БЦ-хитозан-ФН демонстрируются все пики, описанные для БЦ, и дополнительные пики, указывающие на присутствие хитозана и фузидина натрия. Пики при 1647 см^{-1} , 1556 см^{-1} и 1369 см^{-1} наблюдались в композите и приписывались хитозанамиду I, амиду II и амиду III, соответственно.

Кроме того, пик, относящийся к растяжению О-Н, стал шире, что позволяет предположить, что молекулы хитозана вмешиваются в водородные связи между цепями целлюлозы. Характерные полосы хитозана смещены в присутствии целлюлозы, что указывает на межмолекулярную связь между аминогруппами хитозана и гидроксильными остатками БЦ с образованием водородных связей (Wahid, 2018).

Успешное окисление БЦ можно обнаружить по наличию пика при длине волны 1600 см^{-1} . Однако, в форматер композита можно обнаружить по увеличению интенсивности пика.

Исследовали возможность использования окисленной целлюлозы для формирования антимикробных композитов с хитозаном и 200 мкг / г фузидина натрия. Данные представлены в таблице 31.

Таблица 31 – Площадь зон задержки роста бактерий *S.aureus*, *B. licheniformis* *E.coli* при использовании гидрогелей

Тест-культура	Площадь зон задержки роста тест-микробов, см^2 при использовании гидрогелей с различным соотношением целлюлоза:хитозан		Площадь зон задержки роста тест-микробов, см^2 при использовании гидрогелей с различным соотношением окисленная целлюлоза:хитозан	
	50:50	20:80	50:50	20:80
<i>S. aureus</i>	5,1±0,5	10,3±0,7	11,0±0,7	12,8±0,2
<i>E. coli</i>	2,8±0,1	3,3±0,3	6,5±0,4	5,8±0,3
<i>B. Licheniformis</i>	1,8±0,1	2,3±0,2	4,8±0,8	6,3±0,8

Из полученных данных видно, что при использовании для формирования гидрогелей окисленной целлюлозы происходит увеличение диаметра зон

задержки роста тест-культур. Данные закономерности характерны для всех тест-культур и соотношений целлюлоза:хитозан.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе наших исследований были существенно расширены представления о биосинтезе бактериальной целлюлозы при различных условиях культивирования.

Для достижения поставленных целей в рамках диссертации было изучено образование бактериальной целлюлозы штаммом *K. sacrofermentans* В-11267 в стандартной среде NS с различными источниками углерода. Проведен подбор условий синтеза полисахарида на средах с отходами биотехнологических производств: мелассой и послеспиртовой бардой. Изучено влияние различных эффекторов: источников углерода (сахаров, глицерина, органических кислот) и т.д. Изучено потребление источников углерода в ходе культивирования продуцента. Исследованы структура и физико-химические свойства полученной целлюлозы с использованием таких современных методов как: СЭМ, АФМ, ИК-спектроскопия, рентгеновской микротомографии. Проведено масштабирование процесса получения БЦ в биореакторах объемом 1, 6 и 30 л. Изучено влияние условий культивирования на выход и структуру полученного полимера.

Созданы гидрогелевые композиты на основе БЦ и хитозана. Показано, что наилучшими характеристиками обладали композиты с соотношением БЦ : хитозан 50:50 и 20:80 с добавлением 1 % глутарового альдегида. Гидрогели показали хорошую влагосвязывающую способность и при включении фузидина натрия обладали высокой антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий *S. aureus*.

Таким образом, экспериментальное решение поставленных задач позволило не только расширить представления о биосинтезе бактериальной целлюлозы при различных условиях культивирования, но и повысить продуктивность штамма *K. sacrofermentans* В-11267 и продемонстрировать его высокий потенциал для промышленного получения БЦ и биокомпозиционных материалов на ее основе, в частности гидрогелевых композитов медицинского назначения.

ВЫВОДЫ

1. Впервые изучено образование БЦ штаммом *K. sacrofermentans* В-11267 на стандартной среде NS с различными источниками углерода. Показано, что максимальное количество БЦ с наиболее тонкими волокнами образуется на среде NS с глицерином, выход полимера при этом увеличивается на 95 % относительно контроля.

2. Впервые разработаны технологические основы получения БЦ с помощью штамма *K. sacrofermentans* В-11267 на средах с отходами биотехнологических производств: мелассой и бардой, что позволяет снизить себестоимость готового продукта и увеличить выход полисахарида по сравнению со стандартной средой NS в 3,5 и 2,5 раза, соответственно. Выход полимера составляет на среде NS – 1,34 г/л, на мелассе – 3,52 г/л и на барде – 4,82 г/л.

3. Доказано, что использование мелассы и послеспиртовой барды позволяет получить БЦ с улучшенными характеристиками по сравнению с полимером, полученным на стандартной среде NS: степень кристалличности полисахарида на стандартной среде – 79,7 %, на мелассе – 83,0 %, на барде – 82,3 %.

4. Впервые изучено влияние условий культивирования *K. sacrofermentans* В-11267 на выход и структуру целлюлозы в процессе масштабирования в биореакторах объемом 1, 6 и 30 л. Определены параметры культивирования, обеспечивающие максимальное накопление полисахарида. Показано, что при увеличении объема биореактора наблюдается оптимальное влияние усиления аэрации на продуктивность процесса с 0,7 до 1,1 л/л среды·мин⁻¹.

5. Научно обоснована возможность получения БЦ с заданными свойствами (степень кристалличности, аспектное соотношение) путем изменения условий культивирования продуцента. По данным рентгеноструктурного анализа установлено, что увеличение степени аэрации, а

также скорости перемешивания приводит к снижению степени кристалличности целлюлозы.

6. Впервые получены гидрогелевые композиты на основе БЦ, хитозана и фузидовой кислоты, обладающие высокой антибактериальной активностью. Наилучшими характеристиками обладали гидрогели с соотношением БЦ:хитозан 50:50 и 20:80 с добавлением 1 % глутарового альдегида.

7. В результате оптимизации условий культивирования повышена продуктивность штамма *K. sacrofermentans* В-11267 и продемонстрирован его высокий потенциал для промышленного получения БЦ и биокomпозиционных материалов на ее основе, в частности гидрогелевых композитов с антибактериальными свойствами для медицины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варламов В.П., Мысякина И.С. Хитозан в биологии, микробиологии, медицине и сельском хозяйстве // Микробиология. – 2018. – Т. 87, №5. – С. 595-598.
2. Волова Т.Г., Прудникова С.В., Шишацкая Е.И. Штамм бактерии *komagataeibacter xylinus* – продуцент бактериальной целлюлозы // Патент № 2568605 Российская Федерация (20.11.2015). – 11 с.
3. Гладышева Е.К. Изучение биосинтеза бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* j. Lindau на средах с различной начальной концентрацией глюкозы // Фундаментальные исследования. – 2015. – №2. – С.13-17. –а.
4. Гладышева Е.К. Исследование структуры и химического строения бактериальной целлюлозы // Ползуновский вестник. – 2015. – Т.2. – № 4.– С. 100–103. – б.
5. Полунина Е.Е., Клыгина О.Ю., Ловкова Т.В. Средство для лечения кожных гнойных инфекций, составы и способы получения // Патент № 2472490 Российская Федерация (05.08.2011). – 11 с.
6. Попова Э.В., Домнина Н.С., Коваленко Н.М. Биологическая активность хитозана с разной молекулярной массой // Вестник защиты растений. – 2017. – Т.3, №93. – С. 28-33.
7. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Пестов Н.А. Получение бактериальной целлюлозы и нанокпозиционных материалов: монография / Саранск: Изд-во Мордов. ун-та. – 2014 – 128 с.
8. Ревин В.В., Лияськина Е.В. Штамм *Glucanacetobacter sucrofermentans* – продуцент бактериальной целлюлозы // Патент № 2523606 Российская Федерация (20.07.2014). – 6 с.
9. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назаркина М.И., Киреев Н.В. Способ получения бактериальной целлюлозы // Патент № 2536257 Российская Федерация (20.12.2014). – 6 с.

10. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назаркина М.И., Киреев Н.В. Способ получения бактериальной целлюлозы // Патент РФ № 2536973 Российская Федерация (27.12.2014). – 6 с.
11. Самуйленко А.Я., Гринь С.А., Албулов А.И., Фролова М.А., Гринь А.В., Шинкарев С.М., Сазанова Э.Я., Варламов В.П., Еремец В.И., Мельник Н.В., Мельник Р.Н., Бондарева Н.А., Хабаров В.Б., Панина Л.И., Буряк А.К., Хабаров М.В., Черных О.Ю., Кощаев А.Г., Красочко П.А., Лысенко А.А., Кривонос Р.А., Гринь В.А. Биологически активные вещества (хитозан и его производные): монография // Краснодар : КубГАУ, 2018. – 355 с.
12. Титок В. В., Леонтьев В. Н., Федоренко И. В., Кубрак С.В., Юренкова С. И., Грушецкая З.Е. Биосинтез целлюлозы: современный взгляд и концепции // Труды Белорусского государственного университета. – 2007. – Т.2, Ч.1. – С. 54-64.
13. Фан Ми Хань, Громовых Т. И. Оптимизация условий глубинного культивирования штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 методом полного факторного эксперимента // «Живые системы и биологическая безопасность населения»: Материалы IX Международной научной конференции студентов и молодых ученых – Москва. – 2011. – С.24-26.
14. Хоменко А.И., Шадурская С.К. Антибиотики: химиотерапия инфекционных заболеваний // Ростов: «Феникс», 2002. – 192 с.
15. Шипина О.Т., Валишина З.Т., Косточко А.В. Рентгенодифракционный анализ различных видов целлюлозы // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18, № 17. – С. 166-170.
16. Adachi O., Kazunobu M., Shinagawa E., Ameyama M. Crystallization and characterization of NADP-dependent D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* // Agric. Biol. Chem. – 1980. – Vol. 44. – P. 301-308.
17. Aksu N.B., Yozgatli V., Okur M.E., Ayla S., Yoltaş A., Okur N.U. Preparation and evaluation of QbD based fusidic acid loaded in situ gel formulations for burn wound treatment // Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2019. – Vol. 52. – P. 110-121.

18. Alavi M, Nokhodchi A. An overview on antimicrobial and wound healing properties of ZnO nanobiofilms, hydrogels, and bionanocomposites based on cellulose, chitosan, and alginate polymers // *Carbohydr. Polymers.* – 2020. – Vol. 227. – P. 1-6.
19. Atwa N.A., Nagwa A.A., El-Diwany A.L., El-Saied H., Basta A.H. Improvement in bacterial cellulose production using *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 10245 and characterization of the cellulose pellicles produced // *Egyptian Pharmaceutical journal.* – 2015. – Vol. 1, I. 2. – P. 123-129.
20. Aydın Y.A., Aksoy N.D. Isolation and characterization of an efficient bacterial cellulose producer strain in agitated culture: *Gluconacetobacter hansenii* P2A // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2014. – Vol. 98, I. 3. – P. 1065-1075.
21. Azeredo H.M.C., Barud H., Farinas C.S., Vasconcellos V.M., Claro A.M. Bacterial cellulose as a raw material for food and food packaging application // *Frontiers in Sustainable Food Systems.* – 2019. – Vol. 3. – P. 1-14.
22. Bae S., Shoda M. Bacterial cellulose production by fed-bath fermentation in molasses medium // *Biotechnol. Prog.* – 2004. – №20. – P. 1366-1371.
23. Bae S., Shoda M. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production using Box-Behnken design // *Biotechnol Bioeng.* – 2005. – Vol.90. – P.20-28.
24. Bayazidi P., Almasi H., Asl A.K. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties // *Int J Biol.* – 2018. – Vol. 107. – P. 2544-2551.
25. Behera S.S., Ray R.C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2016. – Vol.86. – P.656-669.
26. Bilg E., Bayir E., Urkmez A. S., Hames E. E. Optimization of Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus* using Carob and Haricot Bean // *International Journal of Biological Macromolecules* – 2016. – Vol. 90. – P. 2-10.

27. Brown Jr. R. M., Saxena I. M. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers // *Plant physiol biochem.* – 2000. – Vol. 38. – P. 57-67.
28. Buldum G., Bismarck A., Mantalaris A. Recombinant biosynthesis of bacterial cellulose in genetically modified *Escherichia coli* // *Bioprocess and Biosystems Engineering.* – 2018. – Vol. 41, I.2. – P. 265-279.
29. Cacicedo M.L., Castro M.C., Servetas I., Bosnea L.A., Boura K., Tsafrakidou P., Dima A. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications // *Bioresource Technology.* – 2016. – Vol. 213. – P. 172-180. – b.
30. Cacicedo M.L., León I.E., González J.S., Porto L.M., Alvarez V.A., Castro G.R. Modified bacterial cellulose scaffolds for localized doxorubicin release in human colorectal HT-29 cells // *Colloids Surf. B.* – 2016. – Vol. 140. – P. 421-429a.
31. Cacicedo M.L., Pacheco G., Islan G.A., Alvarez V.A., Barud H.S., Castro G.R. Chitosan-bacterial cellulose patch of ciprofloxacin for wound dressing: Preparation and characterization studies // *Int J Biol Macromol.* – 2020. – Vol. 147. – P. 1136-1145.
32. Çakar F., Özer I., AYTEKIN, Sahin F. Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium // *Carbohydr. Polym.* – 2014. – Vol. 106, I. 1. – P. 1-13.
33. Campano C., Balea A., Blanco A., Negro C. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review // *Cellulose.* – 2016. – Vol. 23, I. 1. – P. 57-91
34. Carreira P., Mendes J.A.S., Trovatti E., Serafim L. S., Freire C.S.R., Silvestre A.G.D., Neto C.P. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose // *Bioresource Technol.* – 2011. – Vol. 102, I. 15. – P.7354-7360.
35. Casaburi A., Rojo U. M., Cerrutti P., Foresti L. Carboxymethyl cellulose with tailored degree of substitution obtained from bacterial cellulose // *Food Hydrocolloids* – 2017. – Vol. 75. – P. 147-156.

36. Castro C., Zuluaga R., Álvarez C., Putaux J.L., Caro G., Rojas O.J., Mondragon I., Ganan P. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter genus* // Carbohydr. Polym. – 2012. – Vol. 89, I. 4. – P. 1033-1037.
37. Castro C., Zuluaga R., Putaux J.L., Caro G., Mondragon I., Ganan P. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii sp.* from Colombian agroindustrial wastes // Carbohydr Polym. – 2011. – Vol. 84. – P.96-102.
38. Cavka A., Guo X., Tang S. J., Winstrand S., Jonsson L.J., Hong F. Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge // Biotechnol. Biofuels. – 2013. – Vol. 6. – P. 1-10.
39. Cazón P., Vázquez M. Bacterial cellulose as a biodegradable food packaging material: A review // Food HydrSocolloids. – 2021. – Vol. 113. – P. 1-9.
40. Chao Y., Sugano Y., Shoda M. Bacterial cellulose production under oxygen-enriched air at different fructose concentrations in a 50-liter, internal-loop airlift reactor // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – Vol. 55, № 6. – P.673-679.
41. Chau M., DeFrance K.J., Kopera B., Machado V.R., Rosenfeldt S., Reyes L. Composite hydrogels with tunable anisotropic morphologies and mechanical properties // Chemistry of Materials. – 2016. – Vol. 28, I. 10. – P. 3406-3415.
42. Chawla P.R., Bajaj I.B., Shrikant A.S., Singhal R.S. Fermentative production of microbial cellulose // Food Technol. Biotechnol. – 2009. – Vol.47, I. 2. – P. 107-124.
43. Chen L., Hong F., Yang X. X., Han S. F. Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism // Bioresour. Technol. – 2013. – Vol.135 – P. 464-468.
44. Cheng H.P., Wang P.M., Chen J.W., Wu W.T. Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2002. – Vol. 35, I. 2. – P. 125-132.

45. Cheng K.C., Catchmark J.M., Demirci A. Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property // *Cellulose*. – 2009. – Vol.16. – P.1033-1045.
46. Cheng K.C., Catchmark J.M., Demirci A. Effects of CMC addition on bacterial cellulose production in a biofilm reactor and its paper sheets analysis // *Biomacromolecules*. – 2011. – Vol. 12, I.3. – P. 730-736.
47. Choi C.N., Song H.J., Kim M.J., Chang M.H., Kim S.J. Properties of bacterial cellulose produced in a pilot-scale spherical type bubble column bioreactor // *Korean J. Chem. Eng.* – 2009. – Vol. 26, № 1. – P.136-140.
48. Ciolacu D., Ciolacu F., Popa V.I. Amorphous cellulose – structure and characterization // *Cellulose chemistry and technology*. – 2011. – Vol. 45, I.1. – P.13-21.
49. Coban E.P., Biyik H. Evaluation of different pH and temperatures for bacterial cellulose production in HS medium and beet molasses medium // *African Journal of microbiology research*. – 2011. – Vol. 5, I. 9 – P. 1037-1045.
50. Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown R.M. Microbial cellulose – the natural power to heal wounds // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27, I. 2. – P. 145-151.
51. Czaja W., Romanovicz D., Brown R. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture // *Cellulose*. – 2004. – Vol.11. – P. 403-411.
52. Czaja W., Young D. J., Kawecki M., Brown R.M.J. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications // *Biomacromolecules*. – 2006. – Vol. 8. – P.1-12.
53. Dahman Y., Jayasuriya K.E., Kalis M. Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: preliminary study // *Applied biochemistry and biotechnology*. – 2010. – Vol. 162, I.6. – P. 1647-1659.
54. Dayal M.S., Catchmark J.M. Mechanical and structural property analysis of bacterial cellulose composites // *Carbohydr. Polym.* – 2016. – Vol. 144. – P. 447-453.

55. Deng Z., Jung J., Zhao Y. Development, characterization, and validation of chitosan adsorbed cellulose nanofiber (CNF) films as water resistant and antibacterial food contact packaging // *Food Sci Technol.* – 2017. – Vol. 83. – P. 132–140.
56. Du J., Vepachedu V., Cho S. H., Kumar M., Nixom B.C. Structure of the Cellulose Synthase Complex of *Gluconacetobacter hansenii* at 23.4 Å Resolution // *PLOS ONE.* – 2016. – Vol.11, I. 5. – P. 107-124.
57. Dudman W.F. Cellulose production by *Acefobacter acetigenum* in defined medium // *J.gen. Microbiol.* – 1959. – Vol. 21. – P.327-337.
58. Dutta S.D., Patel D.K., Lim K.T. Functional cellulose-based hydrogels as extracellular matrices for tissue engineering // *Journal of Biological Engineering.* – 2019. – Vol. 55, I. 13. – P. 1-19.
59. Elayaraja S., Liu G., Zagorsek K., Mabruk M. TEMPO-oxidized biodegradable bacterial cellulose (BBC) membrane coated with biologically-synthesized silver nanoparticles (AgNPs) as a potential antimicrobial agent in aquaculture (In vitro) // *Aquaculture.* – 2021. – Vol. 530. – P. 1–10.
60. Elham E.A., Amir K.A. Influence of Fermentation Condition and Alkali Treatment on the Porosity and Thickness of Bacterial Cellulose Membranes // *TOJSAT.* – 2013. – Vol. 3, I. 2. – P. 194-203.
61. Esa F., Tasirin S.M., Rahman N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application // *Agriculture and Agricultural Science Procedia.* – 2014. – Vol. 2. – P. 113-119.
62. Faria-Tischer P.C., Tischer C.A., Heux L., Denmat S.L., Picart C., Sierakowski M.R., Putaux J.L. Preparation of cellulose II and III films by allomorphic conversion of bacterial cellulose I pellicles // *Materials Science and Engineering: C.* – 2015. – Vol. 51. – P. 167-173.
63. Feng X. C., Niamat U., Wang,X.J., Sun X.C., Li C.Y., Bai Y., Chen L., Li Z. X. Characterization of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* CGMCC 3917 // *Journal of Food Science.* – 2015. – Vol. 80, I. 10. – P. 2217-2227.

64. des I.A.A., Pedro A.C., Ribeiro V.R., Bortolini D.G., Ozaki M.S.C., Maciel G.M., Haminiuk C.W.I. Bacterial cellulose: From production optimization to new applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 164. – 2598-2611.
65. Fernandes J.C., Eaton P., Gomes A.M., Pimtado M.E., Malcata F.X. Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation // *Ultramicroscopy*. – 2009. – Vol. 109, № 8. – P. 854-860.
66. Florea M., Reeve B., Abbott J., Freemont P.S., Ellis T. Genome sequence and plasmid transformation of the model high-yield bacterial cellulose producer *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582 // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 1-9.
67. Fontana J.D., Koop H.S., Tiboni M., Grzybowski A. New Insights on Bacterial Cellulose // *Food Biosynthesis*. – 2017. – Vol. 7. – P. 213-249.
68. Fu L., Yang G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair // *Carbohydrate Polymers*. – 2013. – Vol. 92. – P. 1432- 1442.
69. Gao X., Shi Z., Kuśmierczyk P., Liu C., Yang G. Sevostianov I., Silberschmidt V.V. Time-dependent rheological behaviour of bacterial cellulose hydrogel // *Materials Science and Engineering C*. – 2016. – Vol. 58. – P. 153-159.
70. Gayathry G., Gopaldaswamy G. Production and characterisation of microbial cellulosic fibre from *Acetobacter xylinum* // *Indian J. Fibre*. – 2014. – Vol. 39. – P. 93-96.
71. George J., Sabapathi S.N. Cellulose nanocrystals: synthesis, functional properties, and applications // *Nanotechnology, Science and Applications*. – 2015. – Vol. 8. – P. 45-54.
72. Giardina P., de Biasi M.G., de Rosa M., Gambacorta A., Buonocore V. Glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* // *Biochem J*. – 1986. – Vol. 239, I. 3. – P. 517-522.

73. Go´mez-Manzo S., Chavez-Pacheco J.L., Contreras-Zentella M., Sosa-Torres M.E., Arreguín-Espinosa R. Molecular and Catalytic Properties of the Aldehyde Dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a Quinoheme Protein Containing Pyrroloquinoline Quinone, Cytochrome b, and Cytochrome c // Journal of bacteriology. – 2010. – Vol. 192, I. 21. – P. 5718–5724.
74. Goy R.C., Britto D.D., Assis O.B.G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan // Polímeros. – 2009. – Vol. 19, I. 3. – P. 241-247.
75. Gromovykh T.I., Sadykova V.S., Lutcenko S.V., Dmitrenok A., Feldman N.B., Danilchuk T.N. Bacterial cellulose synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* for medical applications // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2017. – Vol. 53, I. 1. – P. 60-67.
76. Guan F., Chen S., Yao J., Zheng W., Wang H. ZnS/bacterial cellulose/epoxy resin (ZnS/BC/E56) nanocomposites with good transparency and flexibility // J. Mater. Sci. Technol. – Vol. 32, № 2. – 2016. – P.153-157.
77. Gumustecin K., Ciftci M., Coban A., Altikat S., Aktas O., Gul M., Timur H., Dane S. Effects of nicotine and vitamin E on glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in some rat tissues in vivo and in vitro // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2005. – Vol. 20, I. 5. – P. 497-502.
78. Guo C., Luo X., Zhou X., Shi B., Wang J., Zhao J., Zhang X. Quantitative analysis of binary polymorphs mixtures of fusidic acid by diffuse reflectance FTIR spectroscopy, diffuse reflectance FT-NIR spectroscopy, Raman spectroscopy and multivariate calibration // J Pharm Biomed Anal. – 2017. – Vol.140. – P. 130-136.
79. Helenius G., Backdahl H., Bodin A., Nannmark U., Gatenholm P., Risberg B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose // J. Biomed. Mater. Res. – 2006. – Vol. 76. – P. 431-438.
80. Hofinger M., Bertholdt G., Weuster Botz D. Microbial production of homogeneously layered cellulose pellicles in a membrane bioreactor // Biotechnology and Bioengineering. – 2011. – Vol. 108, I.9. – P. 2237-2240.

81. Hong F., Qiu K. An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain *Acetobacter aceti* subsp. *xylinus* ATCC 23770 // Carbohydr. Polym. – 2008. – Vol. 72, I. 3. – P. 545-549.
82. Hornung M., Ludwig M., Schmauder H.P. Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: a novel aerosol bioreactor working on a fed batch principle (part 3) // Engineering in Life Sciences. – 2006. – Vol. 7. I. 1. – P. 35-41.
83. Houssni E.S., Diwany A.E., Bast A.H., Atwa A.N., El-Ghwas D.E. Production and characterization of economical bacterial cellulose // Bioresources Biotechnol.– 2008. – Vol. 3, I. 4. – P.1196-1217.
84. Hu Y., Catchmark J.M., Vogler E.A. Factors Impacting the Formation of Sphere-Like Bacterial Cellulose Particles and Their Biocompatibility for Human Osteoblast Growth // Biomacromolecules. – 2013. – Vol. 14. – P. 3444-3452.
85. Huang C., Yang X.Y., Xiong L., Guo H.J., Luo J., Wang B., Zhang H.R., Lin X.Q., Chen X.D. Utilization of corn cob acid hydrolysate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2014. – Vol. 175, I. 3. – P.1678-1688.
86. Hungund B.S., Gupta S.G. Production of bacterial cellulose from *Enterobacter amnigenus* GH-1 isolated from rotten apple // World J. Microbiol. Biotechnol. – Vol. 26, I.10. – 2010. – P.1823-1828.
87. Hwan J., Park J. K. Improvement of bacterial cellulose production in *Acetobacter xylinum* using byproduct produced by *Gluconacetobacter hansenii* // Korean Journal of Chemical Engineering. – 2012. – Vol.29, I.5. – P.563-566.
88. Hwang J.W., Yang Y.K., Hwang J. K., Pyun Y.R., Kim Y.S. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture // J Biosci Bioeng. – 1999. – Vol.88. – P.183-188.
89. Ishida T., Mitarai M., Sugano Y., Shoda M. Role of water-soluble polysaccharides in bacterial cellulose production // Biotechnol Bioeng. – 2003. – Vol. 83. – P. 474-478.

90. Islam M.U. Taous K., Joong K.P. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – Vol. 88, I.2. – P. 596-603.
91. Islam M.U., Ullah M.W., Khan S., Shah N., Park J.K. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – Vol. 102. – P. 1166-1173.
92. Jacob-Wilk D., Kurek I., Hogan P., Delmer D.P. The cotton fiber zinc-binding domain of cellulose synthase A1 from *Gossypium hirsutum* displays rapid turnover in vitro and in vivo // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, I. 32. – P. 12191-12196.
93. Joseph G., Rowe G.E., Margaritis A., Wan W. Effects of polyacrylamide-co-acrylic acid on cellulose production by *Acetobacter xylinum* // *Journal Chem Technol Biotechnol*. – 2003. – Vol. 78. – P.964-970.
94. Juncu G., Stoica-Guzun A., Stroescu M., Isopencu G., Jinga S.I. Drug release kinetics from carboxymethylcellulose-bacterial cellulose composite films // *Int. J. Pharm.* – 2016. – Vol. 510, I. 2. – P. 485-492.
95. Jung H., Jeong J., Lee O., Park G.T., Kim K.K., Park H.C., Lee S.M., Kim Y.G., Son H.J. Influence of glycerol on production and structural–physical properties of cellulose from *Acetobacter sp.* V6 cultured in shake flasks // *Bioresource Technology*. – 2010. – Vol. 101. – P. 3602-3608.
96. Jyoti K., Malik G., Chaudhary M., Sharma M., Goswami M., Katare O.P., Singh S.B., Madan J. Chitosan and phospholipid assisted topical fusidic acid drug delivery in burn wound: Strategies to conquer pharmaceutical and clinical challenges, opportunities and future panorama // *Int J Biol Macromol.* – 2020. – Vol. 161. – P. 325-335.
97. Kawano S., Tajima K., Uemori Y., Yamashita H. Cloning of cellulose synthesis related genes from *Acetobacter xylinum* ATCC23769 and ATCC53582: comparison of cellulose synthetic ability between strains // *DNA Research* – 2002. – Vol. 9, I. 5 – P. 149-156.

98. Keshk S. Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications // *Bioprocess Biotechniq.* – 2014. – Vol. 4, I. 2. – P. 150-160.
99. Keshk S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus* // *Carbohydrate Polimers.* – 2014. – Vol. 99. – P. 98-100. – b.
100. Keshk S., Sameshima K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production // *Afr. J. Biotechnol.* – 2005. – Vol. 4. – P. 478-482.
101. Keshk S., Sameshima K. Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture // *Enzyme Microb. Technol.* – 2006. – Vol. 40. – P. 4-8. – a.
102. Keshk S., Sameshima K. The utilization of sugar cane molasses the presence of lignosulfonate for production of bacterial cellulose // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2006. – № 72. – P. 291-296. – b.
103. Kim S.Y., Kim J., Wee Y., Park D., Ryu H. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter sp.* PKY5 in a rotary biofilm contactor // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* – 2007. – Vol. 137, I. 1. – P. 529-537.
104. Kim S.Y., Kim J., Wee Y., Park D., Ryu H. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter sp.* RKY5 Isolated From Persimmon Vinegar // *Applied biochemistry and biotechnology.* – 2006. – Vol. 121. – P. 705-715.
105. Kiziltas E.E., Gardner D.J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars // *Carbohydrate Polimers.* – 2015. – Vol. 124. – P. 131-138.
106. Klem D., Heublein B., Fink H.P., Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2005. – Vol. 44, I. 22. – P. 3358-3393.
107. Koehler J., Brandl F., Goepferich A. Hydrogel wound dressing for bioactive treatment of acute and chronic wounds // *European Polymer Journal.* – 2018. – Vol. 100. – P. 1-11.
108. Kozyrovska N.L., Kukharenko O.L., Zaets I.L., Ovcharenko L.L., Bardeau J.F., Tarasyuk O., Porhyn S., Mischenko I., Vovk A., Rogalsky S. Promising

low cost antimicrobial composite material based on bacterial cellulose and polyhexamethylene guanidine hydrochloride // European polymer journal. – 2014. – Vol. 60. – P. 247-254.

109. Krystynowicz A., Czaja W., Wiktorowska-Jeziarska A., Gonçalves-Miśkiewicz M., Turkiewicz M., Bielecki S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2002. – Vol. 29, I. 4. – P. 189-195.

110. Kumar A.B.V., Varadaraj M.C., Tharanathan R.N. Low molecular weight preparation with the aid of pepsin, characterization, and bactericidal activity // Biomacromolecules. – 2007. – Vol. 2, № 2. – P. 566-572.

111. Kumbhar J. V., Rajwade J.M., Paknikar K.M. Fruit peels support higher yield and superior quality bacterial cellulose production // Applied microbiology and biotechnology. – 2015. – Vol. 99, I. 16. – P. 6677-6691.

112. Kuo C.H., Chen J.H., Liou B. K., Lee C.K. Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* // Food Hydrocolloids. – 2016. – Vol. 53. – P. 98-103.

113. Kwak M.H., Kim J.E., Go J., Koh E.K., Song S.H., Son H.J., Kim H.S., Yun Y.H., Jung Y.J., D.Y. Hwang Bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter sp.* A10 for burn wound dressing applications // Carbohydr. Polym. – 2015. – Vol. 122. – P. 387-398.

114. Lee K.Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites // Macromolecular bioscience. – 2014. – Vol. 14. – P. 10-32.

115. Li J., Zhuang S. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives // European Polymer Journal. – 2020. – Vol. 138. – P. 1-12.

116. Lin D., Liu Z., Shen R., Chen S., Yang X. Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 158. – P. 1007-1019.

117. Lin N., Dufresne A. Nanocellulose in biomedicine: current status and future prospect // *Eur. Polym. J.* – 2014. – Vol. 59. – P. 302-325.
118. Lin S.P., Calvar I.L., Catchmark J.M., Liu J.R., Demirci A. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose // *Cellulose.* – 2013. – Vol. 20, I. 5. – P. 2191-2219.
119. Lin S.P., Huang Y.H., Hsu K.D., Lai Y.J., Chen Y.K., Cheng K.C. Isolation and identification of cellulose-producing strain *Komagataeibacter intermedius* from fermented fruit juice // *Carbohydr. Polym.* – 2016. – Vol. 151. – P. 827–833. – a.
120. Lin S.P., Liu C.T., Hsu K.D., Hung Y.T., Shih T.Y., Cheng K.C. Production of bacterial cellulose with various additives in a PCS rotating disk bioreactor and its material property analysis / S. P. Lin, (et al.) // *Cellulose.* – 2016. – Vol. 23. – P. 367- 377. – b.
121. Lin W., Lien C., Yeh H., Yu C., Hsu S. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications // *Carbohydrate Polymers.* – 2013. – Vol. 94, I. 1. – P. 603-611.
122. Liu X., Wang Y., Cheng Z., Sheng J., Yang R. Nano-sized fibrils dispersed from bacterial cellulose grafted with chitosan // *Carbohydrate Polymers.* – 2019. – Vol. 214. – P. 311-316.
123. Lu H., Jiang X. Structure and properties of bacterial cellulose produced using a trickling bed reactor // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2014. – Vol. 172, I. 8. – P. 3844-3861.
124. Luo H., Xiong G., Hu D., Wan Y. Characterization of TEMPO-oxidized bacterial cellulose scaffolds for tissue engineering applications // *Materials Chemistry and Physics.* – 2013. – Vol. 143. – P. 1-7.
125. Lustri W. R., Barud H.G., Barud H.S., Peres F. S., Gutierrez J., Tercjak A., de Oliveira Junior O.B., Ribeiro S.J. Microbial Cellulose – Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications // *Cellulose – Fundamental Aspects and Current Trends.* – 2015. – Vol. 6. – P. 133-157.

126. Machado R.T.A., Gutierrez J., Tercjak A., Trovatti E., Uahib F.G.M., Moreno G.P., Nascimento A.P., Berreta A.A., Ribeiro S.J.L., Barud H.S. *Komagataeibacter rhaeticus* as an alternative bacteria for cellulose production // Carbohydrate Polymers. – 2016. – Vol. 152. – P. 841-849.
127. Marian E., Tita B., Duteanu N., Vicas L., Ciocan S., Jurca T., Antal L., Tica O., Mureşan M., Pallag A., Micle O. Antimicrobial activity of fusidic acid inclusion complexes // Int J Infect Dis. – 2020. – Vol. 101. – P. 1-24.
128. Matsuoka M., Tsuchida T., Matsushita K., Adachi O., Yoshinaga F. Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans* // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 1996. – Vol. 60, I. 4. – P. 575-579.
129. McNamara J.T., Morgan J.L., Zimmer J.A. molecular description of cellulose biosynthesis // Annu Rev Biochem. – 2015. – Vol. 84. – P. 895-921.
130. Meftahi A., Khajavi R., Rashidi A., Sattari M., Yazdanshenas M.E., Torabi M. The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose // Cellulose. – 2010. – Vol. 17. – P. 199-204.
131. Miller G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar // Anal. Chem. – 1959. – Vol. 31, I. 31. – P. 426-428.
132. Mocanu A., Isopencu G., Busuioc C., Popa O.M., Dietrich P., Socaciu-Siebert L. Bacterial cellulose films with ZnO nanoparticles and propolis extracts: Synergistic antimicrobial effect // Sci Rep. – 2019. – Vol. 9. – P. 1-10.
133. Mohammadkazemi F., Azin M., Ashori A. Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media // Carbohydr. Polym. – 2015. – Vol. 117. – P. 518-523.
134. Moharram M.A., Mahmoud O.M. FTIR spectroscopic study of the effect of microwave heating on the transformation of cellulose I into cellulose II during mercerization // J. Appl. Polym. – 2008. – Vol. 107. – P. 30-36.
135. Molina-Ramírez C., Enciso C., Torres-Taborda M., Zuluaga R., Gañán P., Rojas O.J., Castro C. Effects of alternative energy sources on bacterial cellulose

characteristics produced by *Komagataeibacter medellinensis* // Carbohydr. – 2018. – Vol.53. – P.98-103.

136. Moon S.H., Park J. M., Chun H.Y., Kim S.J. Comparisons of physical properties of bacterial celluloses produced in different culture conditions using saccharified food wastes // Biotechnol Bioprocess Eng. – 2006. – Vol. 11. – P. 26-31.

137. Moosavi-Nasab M., Yousefi A. Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste // Iranian journal of biotechnology. – 2011. – № 2. – P. 94-101.

138. Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues // Appl. Spectrosc. Rev. – 2008. – Vol. 43. – P. 134-179.

139. Oh S.Y., Yoo D.I., Shin Y., Kim H.C., Kim H.Y., Chung Y.S., Park W.H., Youk J.H. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy // Carbohydr. – 2005. – Vol. 340. – P. 2376-2391.

140. Pa'e N. Rotary discs reactor for enhanced production of microbial cellulose: monography // Universiti Teknologi Malaysia, Faculty of Chemical and Natural Resource Engineering, 2009. – 97 p.

141. Pa'e N., Muhamad I.I., Hashim Z., Yusof A. H.M. Bacterial Cellulose Nanocomposites // Publisher: Springer International Publishing, 2019. – 272 p.

142. Pa'e N., Zahan K.A., Muhamad I.I. Production of biopolymer from *Acetobacter xylinum* using different fermentation methods // International Journal of engineering and technology IJET-IJENS. – 2011. – Vol. 11, I. 5. – P. 90-98.

143. Pacheco G., Nogueira C.R., Meneguín A.B., Trovatti E., Silva C.C., Machado T.A., Ribeiro J.L., da Silva Filho E.C., Barud S.H. Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source // Industrial Crops & Products. – 2017. – Vol. 107. – P. 13-19.

144. Pandey M., Mohamad N., Amin M.C.I.M. Bacterial Cellulose/Acrylamide pH-Sensitive Smart Hydrogel: Development, Characterization,

and Toxicity Studies in ICR Mice Model // Mol. Pharm. – 2014. – Vol. 11. – P. 3596-3608.

145. Park J.K., Hyun S., Jung J. Conversion of *G. hansenii* PJK into non-cellulose-producing mutants according to the culture condition // J.Biotechnol Bioprocess Eng. – 2004. – Vol. 9. – P. 383-388.

146. Park J.K., Jung J.Y., Park Y.H. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol // Biotechnology letters. – 2003. – Vol. 25. – P. 2055-2059.

147. Patel D.K., Dutta S.D., Ganguly K., Lim K.T. Multifunctional bioactive chitosan/cellulose nanocrystal scaffolds eradicate bacterial growth and sustain drug delivery // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 170. – P. 178-188.

148. Pertile R.A.N., Andrade F.K., Alves C., Gama M. Surface modification of bacterial cellulose by nitrogen-containing plasma for improved interaction with cells // Carbohydr. Polym. – 2010. – Vol. 82, I. 3. – P. 692-698.

149. Pinto F.C.M., De-Oliveira A.C.A.X., De-Carvalho R.R., Gomes-Carneiro M.R., Coelho D.R., Lima S.V.C., Paumgarten F.J.R., Aguiar J.L.A. Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses // Carbohydrate Polymers. – 2016. – Vol. 137. – P. 556-560.

150. Premjet S., Premjet D., Ohtani Y. The effect of ingredients of sugar cane molasses on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* // Sen' I Gakkaishi. – 2007. – Vol.63. – P. 193-199.

151. Qiu K., Netravali A.N.A Review of fabrication and applications of bacterial cellulose based nanocomposites // Polym. Rev. – 2014. – Vol. 54. – P. 598-626.

152. Ramana K.V., Tomar A., Singh L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum* // World journal of microbiology and biotechnology. – 2000. – Vol. 16. – P. 245-248.

153. Rani M.U., Udayasankar K., Appaiah K. Properties of bacterial cellulose produced in grape medium by native isolate *Gluconacetobacter sp.* // J Appl Polym Sci. – 2011. – Vol. 120. – P. 2835-2841.
154. Rani M.U., Appaiah A. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production from *Gluconacetobacter hansenii* UAC09 // Ann Microbiol. – 2011. – Vol. 61. – P. 781-787.
155. Rebelo A.R., Archer A.J., Chen X.L., Liu C.Q., Yang G., Liu Y. Dehydration of bacterial cellulose and the water content effects on its viscoelastic and electrochemical properties // Sci Technol Adv Mater.– 2018. – Vol. 19, I. 1. – P. 203-211.
156. Reiniati I., Hrymak A.N., Margaritis A. Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals // Critical Reviews in Biotechnology. – 2016. – Vol. 36 – P. 1-12.
157. Ruka D.R., Simon G.P., Dean K.M. Bacterial cellulose and its use in renewable composites // Nanocellulose Polymer Nanocomposites: Fundamentals and Applications. – 2014. – Vol. 32 – P. 89-130.
158. Sani A., Dahman Y. Improvements in the production of bacterial synthesized biocellulose nanofibres using different culture methods // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 85. – P. 151-164.
159. Santos S.M., Carbajo J. M., Gómez N., Ladero M., Villar J.C. Modification of Bacterial Cellulose Biofilms with Xylan Polyelectrolytes // Bioengineering. – 2017. – Vol. 4. – P. 1-13.
160. Schluesener J.K., Schluesener H.J. Nanosilver: application and novel aspects of toxicology // Arch. Toxicol. – 2013. – Vol. 87, I. 4. – P. 569-576.
161. Sconti G. Mechanical Properties of Bacterial Cellulose Implants // Chalmers university of technology. – 2010. – Vol. 10 – P. 38-50.
162. Shahmohammadi J.F., Almasi H. Morphological, physical, antimicrobial and release properties of ZnO nanoparticles-loaded bacterial cellulose films // Carbohydr Polym. – 2016. – Vol. 149. – P. 8-19.

163. Sheng-Chi W., Meng-Hsun L. Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Gluconacetobacter xylinus* // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2015. – Vol. 120, I. 4. – P. 444-449.
164. Shi Z., Gao X., Ullah M.W., Li S., Wang Q., Yang G. Electroconductive natural polymer-based hydrogels // Biomaterials. – 2016. – Vol. 111. – P. 40-54.
165. Silveira F.C.A., Pinto F.C.M., Caldas S.d.S., Leal M.d.C., Cesário J., Aguiar J.L.d.A. Treatment of tympanic membrane perforation using bacterial cellulose: a randomized controlled trial // Braz. J. Otorhinolaryngol. – 2016. – Vol. 82, I. 2. – P. 203-208.
166. Skinner P.O., Cannon R.E. *Acetobacter xylinum*: An inquiry into cellulose biosynthesis // The American biology teacher. – 2000. – Vol. 62, I. 6. – P. 442-444.
167. Sokolnicki A.M., Fisher R.J., Harrah T.P., Kaplan D.L. Permeability of bacterial cellulose membranes // J. Biomed. Mater. Res. – 2006. – Vol 76. – P. 431-438.
168. Son H.J., Heo M.S., Kim Y.G., Lee S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures // Biotechnol Appl Biochem. – 2001. – Vol. 33. – P.1-5.
169. Son H.J., Kim H.G., Kim K.K., Kim H.S., Kim Y.Q., Lee S.J. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions // Bioresource Technol. – 2003. – Vol. 86. – P. 215-219.
170. Song H., Li H., Seo J., Kim M., Kim S. Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes // Korean Journal of Chemical Engineering. – 2009. – Vol. 26, I. 1. – P. 141-146.
171. Sriplai N., Pinitsoontorn N. Bacterial cellulose-based magnetic nanocomposites: A review // Carbohydrate Polymers. – 2021. – Vol. 254. – P. 1-56.
172. Strap J.L., Latos A., Shim I., Bonetta D.T. Characterization of pellicle inhibition in *Gluconacetobacter xylinus* 53582 by a small molecule, pellicin, identified by a chemical genetics screen // PloS one. – 2011. – Vol. 6, I. 12. – P. 1-9.

173. Sunagawa N., Fujiwara T., Yoda T., Kawano S., Satoh Y., Yao M., Tajima K., Dairi T. Cellulose complementing factor (Ccp) is a new member of the cellulose synthase complex (terminal complex) in *Acetobacter xylinum* // J Biosci Bioeng. – 2013. – Vol. 115, I. 6. – P. 607-612.
174. Sung J.Y., Lee Y.N. Isoforms of glucose 6-phosphate dehydrogenase in *Deinococcus radiophilus* // Journal of microbiology. – 2007. – Vol. 45. – P. 318-325.
175. Suzuki S., Suzuki F., Kanie Y., Tsujitani K., Hirai A., Kaji H., Horii F. Structure and crystallization of sub-elementary fibrils of bacterial cellulose isolated by using a fluorescent brightening agent // Cellulose. – 2012. – Vol. 19. – P. 713-727.
176. Szymańska-Chargot M., Cybulska J., Zdunek A. Sensing the Structural Differences in Cellulose from Apple and Bacterial Cell Wall Materials by Raman and FT-IR Spectroscopy // Sensors. – 2011. – Vol. 11, I. 6. – P. 5543-5560.
177. Tanpichai S., Witayakran S., Wootthikanokkhan J., Srimarut Y., Woraprayote W., Malila Y. Mechanical and antibacterial properties of the chitosan coated cellulose paper for packaging applications: Effects of molecular weight types and concentrations of chitosan // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 155. – P. 1510-1519.
178. Thakur K., Sharma G., Singh B., Chhibber S., Patil A.B., Katare O.P. Chitosan-tailored lipidic nanoconstructs of Fusidic acid as promising vehicle for wound infections: An explorative study // Int J Biol Macromol. – 2018. – Vol. 115. – P. 1012-1025.
179. Tokoh C., Takabe K., Sujiyama J., Fujita M. CP/MAS ¹³C NMR and electron diffraction study of bacterial cellulose structure affected by cell wall polysaccharides // Cellulose. – 2002. – Vol. 9. – P. 351-360.
180. Torgbo S., Sukyai P. Bacterial cellulose-based scaffold materials for bone tissue engineering // Applied materials today. – 2018. – Vol. 11. – P. 34-49.
181. Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D., Kopsahelis N., Mandala I., Papanikolaou S., Paloukis F., Alves V., Koutinas A. Bacterial cellulose production from industrial waste and byproduct streams // Int. J. Mol. Sci. – 2015. – Vol. 16. – P. 14832–14849.

182. Ul-Islam M., Joong T.K., Parka K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – Vol. 88, I. 2. – P. 596-603.
183. Ulkür E., Oncul O., Karagoz H., Yeniz E., Celiköz B. Comparison of silver-coated dressing (Acticoat), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass), and fusidic acid 2% (Fucidin) for topical antibacterial effect in methicillin-resistant *Staphylococci*-contaminated, full-skin thickness rat burn wound // *Burns*. – 2005. – Vol.31, I. 7. – P. 874-877.
184. Ullah H., Wahid F., Santos H.A., Khan T. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites // *Carbohydr. Polym.* – 2016. – Vol. 150. – P. 330-352.
185. Vanangamudi S.S., Srinivasan M., Chulliel N.N., Senthilkumar K., Haridas S. A medicinal fusidic acid cream made using sodium fusidate and incorporating a biopolymer, a corticosteroid – clobet // Patent US-2012270835-A1 (13.04.2009). – 11 p.
186. Vazquez A., Foresti M. L., Cerrutti P., Galvagno M. Bacterial Cellulose from Simple and Low Cost Production Media by *Gluconacetobacter xylinus* // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2013. – Vol. 21, I. 2. – P. 545-554.
187. Vingsbo L., Frimodt-Moller C.N. Efficacy of topical and systemic antibiotic treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a murine superficial skin wound infection model // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2013. – Vol.42. – P. 272-275.
188. Vohra A., Satyanarayana T. A cost-effective cane molasses medium for enhanced cell-bound phytase production by *Pichia anomala* // *J. Appl Microbiol.* – 2004. – Vol. 97, № 3. – P.471-476.
189. Wada M., Okano T. Synchrotron-radiated X-ray and neutron diffraction study of native cellulose // *Cellulose*. – 1997. – Vol. 4. – P. 221-232.
190. Wahid F., Hu X.H., Chu L.Q., Jia S.R., Xie Y.Y., Zhong C. Development of bacterial cellulose/chitosan based semi-interpenetrating hydrogels

with improved mechanical and antibacterial properties // International Journal of Biological Macromolecules. – 2019. – Vol. 122. – P. 380-387.

191. Wang J., Tavakoli J., Tang Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review // Carbohydrate Polymers. – 2019. – Vol. 219. – P. 63-76.

192. Wee Y.J., Kim S.J., Yoon S.D., Ryu H.W. Isolation and characterization of a bacterial cellulose producing bacterium derived from the persimmon vinegar // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10, I. 72. – P.16267-16276.

193. Wichterle O., Lím D. Hydrophilic gels for biological use // Nature. – 1960. – Vol. 185. – P. 117.

194. Williamson D.A., Carter G.P., Howden B.P. Current and Emerging Topical Antibacterials and Antiseptics: Agents, Action, and Resistance Patterns // Clin Microbiol Rev. – 2017. – Vol. 30, I. 3. – P. 827-860.

195. Wu J.M., Liu R.H. Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* // Carbohydrate polymers. – 2012. – Vol. 90, I. 1. – P.116-121.

196. Yassine F., Bassil N., Flouty R., Chokr A., Samrani A.E., Boiteux G., Tahchi M.E. Culture medium pH influence on *Gluconacetobacter physiology*: Cellulose production rate and yield enhancement in presence of multiple carbon sources // Carbohydrate Polymers. – 2016. – Vol. 146. – P.282-291.

197. Young S.Y., Se Y.C., Hyoung-Joon J. Flow-Induced Liquid Crystalline Solutions Prepared from Aspect Ratio-Controlled Bacterial Cellulose Nanowhiskers // Molecular Crystals and Liquid Crystals. – 2010. – Vol. 519, I. 1. – P. 141-148.

198. Zahan K.A., Hedzir M.S.A., Mustapha M. The Potential Use of Papaya Juice as Fermentation Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* 0416 // Tropical Agricultural Science. – 2017. – Vol. 40, I. 3. – P. 343-350.

199. Zeng X., Small D.P., Wan W. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup // Carbohydr Polym. – 2011. – Vol. 85. – P. 506-513.

200. Zheng L.J., Zhu J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights // *Carbohydrate Polymers*. – 2003. – Vol.54. – P. 527-530.
201. Zheng M., Laromaine A., Roig A. Bacterial cellulose films: influence of bacterial strain and drying route on film properties // *Cellulose*. – 2014. – Vol. 21, I. 6. – P. 4455-4469.
202. Zhijun S., Yue Z. Utilization of bacterial cellulose in food // *Food hydrocolloids*. – 2014. – Vol. 35. – P. 539-545.
203. Zhong C., Zhang G.C., Liu M., Zheng X.T., Han P.P., Jia S.R. Metabolic flux analyses of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2013. – Vol. 97, № 1. – P.378-381.
204. Zhou L.L., Sun D.P., Hu L.Y., Li Y.W., Yang J.Z. Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* // *J Ind Microbiol Biotechnol*. – 2007. – Vol.34. – P.483-489.