

КОНСТАНТИНОВ К. Н., НИЖЕГОРОВОДА Т. С., ПЕСТОВ Н. А.
ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ
АЛЬФА-ФАЗЫ В БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЕ

Аннотация. Проведено исследование влияния условий биосинтеза бактериальной целлюлозы на содержание α -фазы в этом биополимере. Показано, что, в отличие от уровня биосинтеза бактериальной целлюлозы, изменения условий культивирования продуцента этого биополимера не приводят к изменению соотношения α - и β -фаз в бактериальной целлюлозе.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, альфа-фаза, инфракрасная спектроскопия, биосинтез, условия культивирования.

KONSTANTINOV K. N., NIZHEGORODOVA T. S., PESTOV N. A.
THE EFFECT OF CULTURE CONDITIONS
ON ALPHA-PHASE OF BACTERIAL CELLULOSE

Abstract. The article includes a study results of the effect of bacterial cellulose biosynthesis conditions on the level of α -form in this biopolymer. It was shown that unlike the level of bacterial cellulose biosynthesis, the changes of cultivation conditions of the bacterial cellulose producer did not change of the ratio between α - and β -phases in bacterial cellulose.

Keywords: bacterial cellulose, alpha-phase, infrared spectroscopy, biosynthesis, culture conditions.

Химически модифицированные нанопибриллы бактериальной целлюлозы могут найти широкое применение в нанотехнологии, например, в качестве микроскопических электродов [3]. Природная целлюлоза I имеет две полиморфные модификации – α - и β -формы целлюлозы [1]. Считается, что I α -целлюлоза метастабильна и, соответственно, обладает более высокой реакционной способностью по сравнению с I β -формой целлюлозы. Вследствие этого I α -целлюлоза будет являться участком первичной реакции, и соответственно, преобладание α формы в целлюлозе позволило бы проводить химическую модификацию целлюлозы в более мягких условиях. Показано, что наивысший процент I α -фазы (~70%) имеет бактериальная целлюлоза. Yamamoto и Horii [5] обнаружили, что доля целлюлозы I α варьируется от 64% в целлюлозе валония и бактериальной целлюлозе до 20% в рами и хлопковой. Условия культивирования продуцента бактериальной целлюлозы могут значительно изменить уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы. В связи с этим представляет интерес определение влияния условий культивирования на содержание I α -формы целлюлозы в бактериальной целлюлозе.

В качестве продуцента бактериальной целлюлозы использовали бактерии *Gluconacetobacter sucrofermentans* ВКПМ – 11267. Для культивирования штамма продуцента использовали HS (Hestrin–Schramm) среду [4]. Бактериальную целлюлозу получали при культивировании продуцента в стационарных условиях при комнатной температуре в течение 7 суток. Гель-пленку бактериальной целлюлозы очищали последовательной обработкой 0,5%-ным раствором NaOH и 0,2 н соляной кислоты при температуре 80 °С в течении 60 минут. После каждого этапа обработки гель-пленку длительно отмывали от щелочи и кислоты.

Определение Iα-фазы бактериальной целлюлозы проводили с помощью инфракрасной спектроскопии. Расчет содержания Iα-фазы бактериальной целлюлозы проводили с помощью уравнений 1-3 [6].

$$X_{1\alpha} = A_{\alpha} / (A_{\alpha} + A_{\beta}) \quad (1)$$

$$A_{\alpha} = A_{750 \text{ см}^{-1}} - A_{800 \text{ см}^{-1}} \quad (2)$$

$$A_{\beta} = A_{710 \text{ см}^{-1}} - A_{800 \text{ см}^{-1}} \quad (3)$$

где: $A_{750 \text{ см}^{-1}}$ – поглощение в инфракрасном спектре при 750 см⁻¹;

$A_{710 \text{ см}^{-1}}$ – поглощение в инфракрасном спектре при 710 см⁻¹;

$A_{800 \text{ см}^{-1}}$ – поглощение в инфракрасном спектре при 800 см⁻¹.

На уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы оказывают влияние такие параметры как количество используемого источника углерода, дополнительно вносимые в питательную среду вещества, режим культивирования и уровень аэрации. В связи с этим была проведена оценка влияния этих параметров не только на уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы, но и на содержание Iα-фазы в бактериальной целлюлозе.

В качестве источника углерода использовали глюкозу. Содержание глюкозы в питательной среде составляло 5; 6,5; 10 и 20 г/л. Уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы при увеличении концентрации источника углерода возрастал линейно и составлял 0,73 0,82 1,07 и 1,42 г. сухой бактериальной целлюлозы на литр питательной среды соответственно. Однако перерасчет на 1 г используемой сахарозы приводил к обратной линейной зависимости. Степень превращения глюкозы в целлюлозу был максимален при более низкой концентрации глюкозы и составлял 14,6%. При стандартном содержании глюкозы (20 г глюкозы на 1 л. среды) степень превращения глюкозы в целлюлозу составила 7,1%, что в 2 раза меньше, чем при концентрации глюкозы в среде 5 г/л.

Результаты анализа содержания Iα-фазы в бактериальной целлюлозе, полученной при выращивании продуцента на питательных средах с разным содержанием глюкозы с помощью инфракрасной спектроскопии, представлены в таблице 1.

Таблица 1

**Влияние содержания источника углерода на содержание α -фазы
в бактериальной целлюлозе**

Содержание глюкозы в среде, г/л	Содержание α – фазы в бактериальной целлюлозе, %
5	34 $\pm$ 3
6,5	38 $\pm$ 2
10	36 $\pm$ 3
20	35 $\pm$ 2

Из представленной таблицы следует, что содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе не изменялось при изменении количества сахарозы в питательной среде.

Известно, что этиловый спирт увеличивает уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы. Предполагается, что это связано со снижением уровня образования мутантов, не способных к синтезу бактериальной целлюлозы. Содержание этилового спирта в среде варьировали от 0,5 до 2%. При выращивании продуцента в условиях отсутствия этилового спирта уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы составляет 0,73 г/л по истечению 7 суток статического культивирования. Добавление этилового спирта к питательной среде в количестве 2% приводило к увеличению уровня биосинтеза бактериальной целлюлозы до 2,17 г/л. Использование этилового спирта в количестве 0,5 и 1% приводило к увеличению уровня биосинтеза целлюлозы до 1,71 и 2 г/л соответственно. Результаты анализа содержания α -фазы в бактериальной целлюлозе, полученной при выращивании продуцента при различных концентрациях спирта с помощью инфракрасной спектроскопии, представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе в зависимости
от концентрации этилового спирта в питательной среде**

Концентрация этилового спирта, %	Содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе, %
0	40 $\pm$ 3
0,5	39 $\pm$ 2
1	37 $\pm$ 2
1,5	37 $\pm$ 3
2	38 $\pm$ 2

Из данной таблицы следует, что содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе не меняется при добавлении этилового спирта в концентрации от 0,5 до 2%. В связи с этим можно сделать вывод, что несмотря на то, что этиловый спирт приводит к значительному

увеличению уровня биосинтеза бактериальной целлюлозы, тем не менее, он не влияет на содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе.

При использовании в качестве источника углерода глюкозы происходит образование глюконовой кислоты, которая является побочным продуктом, снижающим pH и, как результат, уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы. Известно, что образование глюконовой кислоты снижается, а производство бактериальной целлюлозы увеличивается при добавлении в среду лигносульфонатов. Это объясняется наличием антиоксидантов и полифенольных соединений в лигносульфонатах. Как следует из таблицы 3, добавление лигносульфоната в питательную среду не приводит к изменению содержания α -фазы в бактериальной целлюлозе.

Таблица 3

**Изменение содержания α -фазы в бактериальной целлюлозе
в зависимости от концентрации лигносульфоната в питательной среде**

Концентрации лигносульфоната, %	Содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе, %
0,5	37 $\pm$ 2
1	35 $\pm$ 2
1,5	36 $\pm$ 2

В статических условиях культивирования уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы несколько выше чем в динамических условиях выращивания продуцента бактериальной целлюлозы. Результаты анализа содержания $I\alpha$ -фазы в бактериальной целлюлозе, полученной при культивировании в стационарных и динамических условиях с помощью инфракрасной спектроскопии, представлены в таблице 4.

Таблица 4

**Влияние статических и динамических условий культивирования
на содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе**

Условия культивирования	Содержание α – фазы в бактериальной целлюлозе, %
Статические условия	37 $\pm$ 2
Динамические условия	36 $\pm$ 2

Из данной таблицы следует, что содержание α -формы целлюлозы в бактериальной целлюлозе не меняется при использовании статических или динамических условий культивирования продуцента этого полисахарида.

На уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы большое влияние оказывает уровень аэрации. В связи с этим было рассмотрено влияние уровня аэрации при глубинном выращивании продуцента бактериальной целлюлозы на изменение содержания α -формы целлюлозы в синтезируемой бактериальной целлюлозе (см. табл. 5).

Таблица 5

Зависимость содержания α -фазы бактериальной целлюлозы от интенсивности аэрации при динамических условиях культивирования

Условия аэрации	Содержание α -фазы в бактериальной целлюлозе, %
0,9 м ³ /мин 300 об/мин	31±1
1,5 м ³ /мин 300 об/мин	33±2
2 м ³ /мин 300 об/мин	29±1

Из приведенной таблицы можно сделать заключение, что изменение условий аэрации не приводит к какому либо значительному снижению содержания α -фазы в бактериальной целлюлозе.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что исследуемые условия культивирования продуцента бактериальной целлюлозы, влияющие на уровень биосинтеза бактериальной целлюлозы, практически не влияют на содержание альфа-фазы в бактериальной целлюлозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешина Л. А., Глазкова С. В., Луговская Л. А. Современные представления о строении целлюлоз // Химия растительного сырья. – 2001. – № 1. – С. 5–36.
2. Лияськина Е. В., Ревин В. В., Грошев В. М., Лияськин Ю. К. Биотехнология бактериальных экзополисахаридов: учеб. пособие. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2010. – 120 с.
3. Ревин В. В., Лияськина Е. В., Пестов Н. А. Получение бактериальной целлюлозы и нанокompозитных материалов. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2014. – 128 с.
4. Hestrin S, Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* // Biochemical Journal. – 1954. – Vol. 58. – P. 345–352.
5. Yamamoto H., Horii F. Structural changes of native cellulose crystals induced by annealing in aqueous alkaline and acidic solutions at high temperatures // Macromolecules. – 1989. – Vol. 22. – P. 4130–4132.
6. Wada M., Kondo T., Okano T. Thermally induced crystal transformation from cellulose I α to I β // Polymer Journal. – 2003. – Vol. 35. – P. 155–159.