

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)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнялась на кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии факультета биотехнологии и биологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва».

Научный руководитель: **Ревин Виктор Васильевич,** доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии, биоинженерии и биохимии, декан факультета биотехнологии и биологии ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва».

Официальные оппоненты: **Ефременко Елена Николаевна,** доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией экобиокатализа кафедры химической энзимологии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Гладышева Евгения Константиновна, кандидат технических наук, научный сотрудник лаборатории биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Защита состоится 23 июня 2021 г. в 14.00 на заседании диссертационного совета Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского по адресу: 117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИММИ РАН (117312, Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 года

**Ученый секретарь
диссертационного совета**

доктор биологических наук
Хижняк Татьяна Владимировна

Актуальность работы

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 (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 (Mohammadkazemi et al., 2015).

Кроме того, выход, структура и свойства целлюлозы существенно зависят от условий культивирования продуцента (Cazon and Vázquez, 2021; Reiniati et al., 2016). Поэтому, помимо увеличения количества синтезируемого полимера, важное значение имеют свойства получаемого полисахарида (Fernandes et al., 2020; Shahmohammadi and Almasi, 2016).

Таким образом, проблема высокоэффективного производства БЦ с заданными свойствами является весьма актуальной и не решена до настоящего времени.

БЦ имеет большой потенциал использования в медицине как биоматериал для тканевой инженерии, создания трансдермальных терапевтических систем и раневых покрытий с регенеративными и антибактериальными свойствами (Ahmed et al., 2020). При этом сама бактериальная целлюлоза не обладает антимикробными 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. Поэтому важной задачей является создание новых биокомпозиционных материалов на основе БЦ, обладающих антибактериальными свойствами.

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 биокомпозиционных 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. sucrofermentans* 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. sucrofermentans* 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 конференции 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 14 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 патент.

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 221 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе представлена общая характеристика бактериальной целлюлозы, ее химическое строение и структура, физико-химические и физико-механические свойства. Рассмотрены биохимические и молекулярно-генетические основы биосинтеза бактериальной целлюлозы. Проанализированы условия культивирования, влияющие на биосинтез и свойства бактериальной целлюлозы. Представлены современные данные в области получения биокomпозитов с антибактериальными свойствами на основе бактериальной целлюлозы.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Объекты исследования – бактерия *Komagataeibacter sucrofermentans* B-11267, целлюлоза, полученная при ее культивировании, а также гидрогели, полученные на ее основе.

Культивирование. Выращивание бактерии *K. sucrofermentans* осуществляли при температуре 28 °C в течение 3 суток 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. pH 5,0 – 6,0. Режим стерилизации: 121 °C в течение 15 минут без этанола в автоклаве MLS-3781L (Sanyo, Япония).

Для получения инокулята использовали среду HS следующего состава, г/л: глюкоза – 20,0; пептон – 5,0; дрожжевой экстракт – 5,0; гидрофосфат натрия – 2,7; лимонная кислота – 1,15. Культивирование осуществляли 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°C. Полученным инокулятом в количестве 10 % от объема среды засеивали опытные колбы, содержащие 100 мл среды. Культивирование проводили в шейкере – инкубаторе при температуре 28±1°C и скорости перемешивания 250 об/мин в течение 3-6 суток.

Также культивирование продуцента осуществляли в биореакторах BIOSTAT A, BIOSTAT B и BIOSTAT C plus объемом 1, 3 и 30 литров при температуре 28±1 °C и различных режимах перемешивания и аэрации в течении 3-6 суток. Для культивирования использовали среды, содержащие отходы пищевых производств – мелассу и послеспиртовую барду.

Методы анализа. Определение pH культуральной жидкости проводили потенциометрическим способом на pH-метре S220 SevenCompact (MettlerToledo, Швейцария). Очистка бактериальной целлюлозы и определение ее количества весовым методом. Определение содержания сахаров проводили при помощи высокоэффективного жидкостного хроматографа LC-20A (Shimadzu, Япония) с УФ-детектированием (254 нм). Содержание редуцирующих сахаров определяли с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты (Miller, 1959). Определение кристалличности БЦ осуществляли с использованием двух методов. ИК-Фурье-спектры регистрировали на ИК-спектрометре IRPrestige-21 (Shimadzu, Япония) и рассчитывали индекс кристалличности, а также содержание α и β фазы целлюлозы (Hurtubise and Krassig, 1960). Степень кристалличности определяли методом рентгеноструктурного анализа на рентгеновском дифрактометре EMPYREAN (PANalytical, Netherlands) с детектором PJXcel3D на отражение в фильтрованном излучении медного анода. Ширину волокон БЦ определяли на сканирующем зондовом микроскопе SPM9600 (Shimadzu, Япония). Структуру полученных гидрогелей определяли методом рентгеновской

микротомографии на микрорентгеновском томографе Skyscan 1172 (Bruker, Бельгия). Антибактериальные свойства биоконпозитов изучали диффузионным методом в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-микроорганизмов, а также методом подсчета жизнеспособности клеток.

Математическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программы «Microsoft Exce». Массив экспериментальных данных получен в трех-пятикратной повторности; результаты представлены в виде среднего значения, погрешности – стандартного отклонения по выборке. При статистической обработке данных использовался непараметрический *t* критерий Стьюдента. Представлены статистически достоверные различия при $p < 0,05$.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Изучение биосинтеза бактериальной целлюлозы на стандартной среде HS

Прежде всего важно изучить физиолого-биохимические свойства продуцента, для того чтобы оценить особенности метаболизма *K. sucrofermentans*. Поэтому на первом этапе изучали продуктивность штамма в процессе культивирования на различных питательных средах, потребление сахаров, а также свойства БЦ при использовании стандартной среды HS.

Культивирование проводилось в динамических условиях на среде HS с различными источниками углерода в концентрации 20 г/л. Полученные данные представлены на рисунке 1.

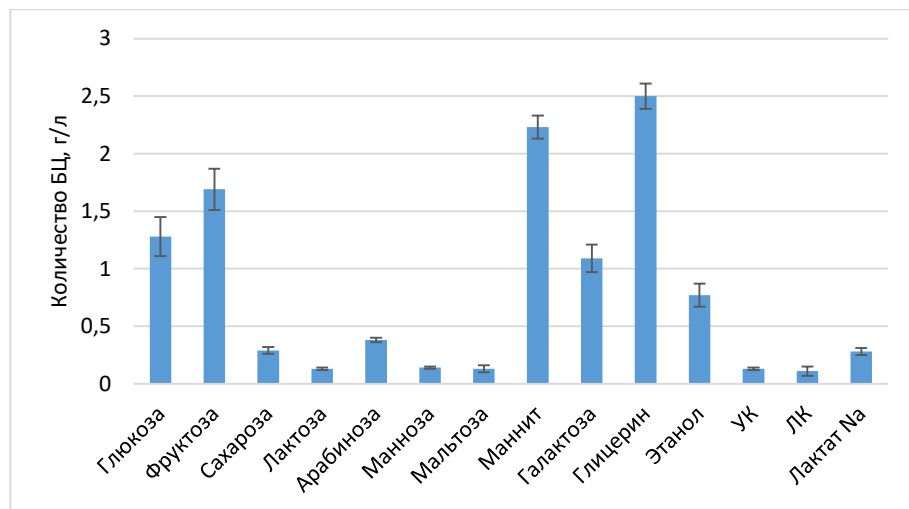


Рисунок 1. Количество БЦ, образуемое *K. sucrofermentans* на среде HS с различными источниками углерода на 3 сутки культивирования.

Согласно полученным данным, максимальное количество БЦ образуется на среде HS с глицерином – $2,50 \pm 0,11$ г/л. Значительное количество целлюлозы обнаружено также 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, что подтверждается значительным понижением значения pH среды культивирования с начального 5,82 до 3,21 на 3 сутки культивирования (рис. 2). На средах с фруктозой, маннитом и глицерином аналогичного повышения кислотности среды не наблюдается (рис. 2).

Для оценки потребления источников углерода в ходе культивирования *K. sucrofermentans* на среде HS с различными источниками углерода, а именно

глюкозой, фруктозой и сахарозой использовали метод ВЭЖХ. Полученные данные представлены на рисунке 3.

Можно отметить, что в ходе жизнедеятельности продуцент плохо потребляет сахарозу в качестве источника углерода. Ее концентрация в среде снижается с начального значения 20 г/л до $14,64 \pm 0,13$ г/л на 3 сутки культивирования.

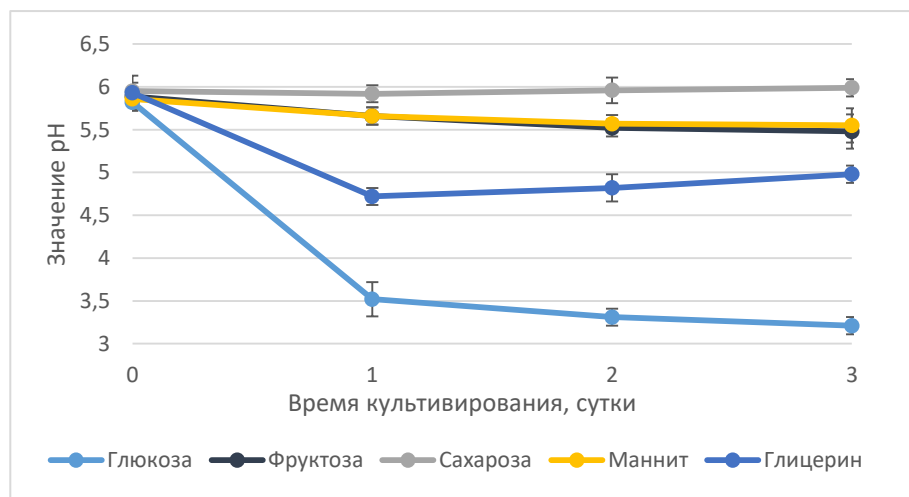


Рисунок 2. Динамика изменения pH в ходе культивирования *K. sacrofermentans* на среде HS с различными источниками углерода.

При использовании фруктозы в качестве сахара в среде наблюдается значительное снижение ее концентрации с начального значения 20 г/л до $5,14 \pm 0,02$ г/л на 3 сутки культивирования. При использовании глюкозы наблюдается максимальное снижение ее концентрации с начального значения 20 г/л до $1,32 \pm 0,05$ г/л на 3 сутки культивирования.

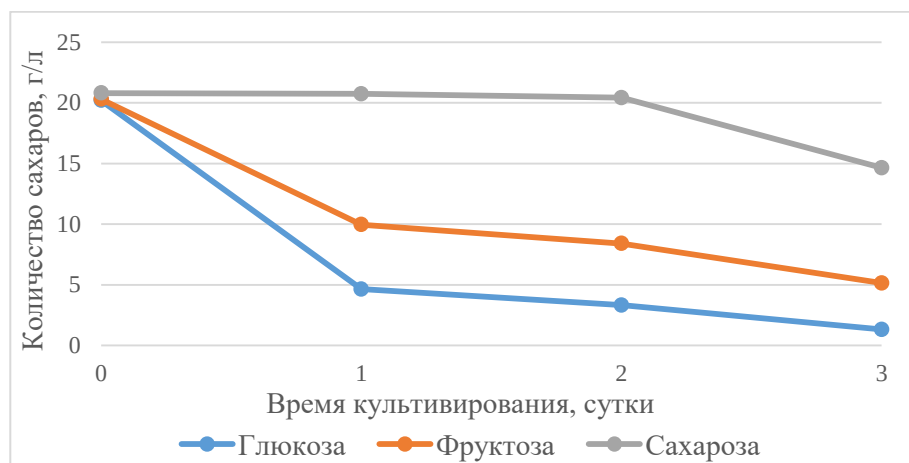


Рисунок 3. Динамика потребления сахаров *K. sacrofermentans* за 3 суток культивирования (ВЭЖХ).

Известно, что физико-химические свойства БЦ зависят от состава культуральной среды. Для оценки влияния источника углерода на структуру БЦ использовали метод ИК-спектроскопии и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Полученные ИК-спектры согласуются с литературными данными и соответствуют целлюлозе I (Szymańska-Chargot et al, 2011).

Также определили индекс кристалличности и содержание α и β фазы целлюлозы в данных образцах, основываясь на соотношении интенсивности пиков (таблица 1).

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.

Таблица 1. Индекс кристалличности, содержание α и β фаз у БЦ, полученной на среде HS с различными источниками углерода.

Источник углерода	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

Ширину волокон целлюлозы определяли с помощью атомно-силовой микроскопии. Полученные данные представлены на рисунке 4.

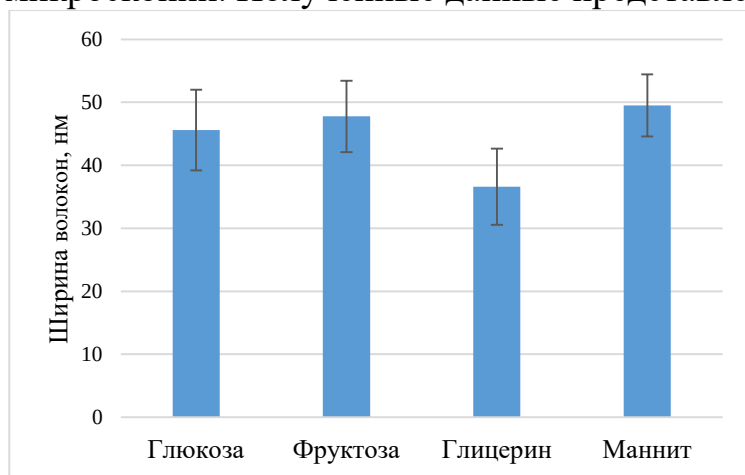


Рисунок 4. Ширина волокон БЦ, полученной на средах с различными сахарами (АСМ).

Согласно представленным данным, значения ширины волокон БЦ отличаются незначительно. При культивировании бактерии 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. Наименьшая ширина волокон 36,61 $\pm$ 6,033 нм наблюдается при культивировании продуцента на среде с глицерином.

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что максимальное количество БЦ с наиболее тонкими волокнами образуется *K. sucrofermentans* в среде HS с глицерином, выход увеличивается на 95% относительно контроля. Значительное количество целлюлозы обнаружено также при культивировании бактерии на среде с маннитом и фруктозой.

Оптимизация питательных сред на основе отходов биотехнологических производств для получения БЦ

Для решения проблемы снижения себестоимости целлюлозы предложено использование отходов биотехнологических производств – мелассы и послеспиртовой барды. Данные по образованию целлюлозы представлены на рисунке 5.

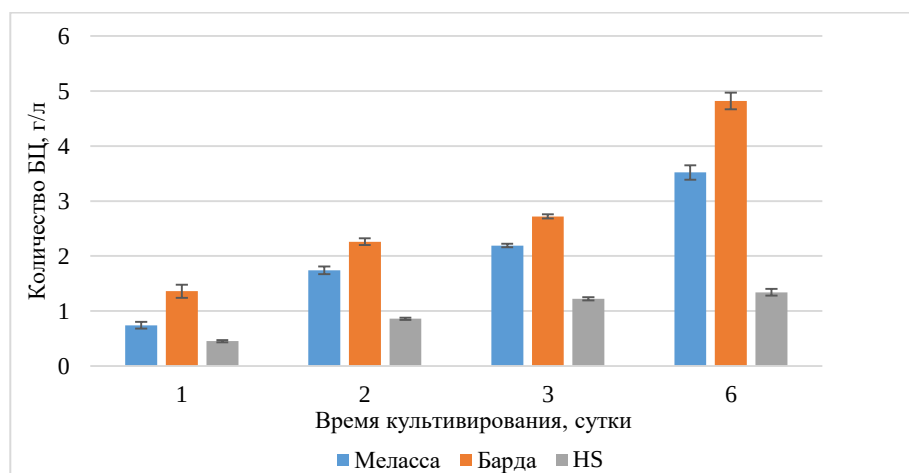


Рисунок 5. Динамика образования целлюлозы на различных средах.

Согласно полученным данным, послеспиртовая барда и меласса способствуют значительно большему образованию БЦ, чем стандартная среда HS: в среднем, в 2 раза больше на 3 сутки культивирования и в 3-4 раза на 6 сутки культивирования.

Изучалась динамика изменения pH культуральной жидкости (рис. 6). Согласно представленным данным, при культивировании продуцента на среде HS происходит понижение значения pH с 5,36 до 3,02, что, вероятно, вызвано образованием глюконовой кислоты. Дальнейшее повышение pH может быть обусловлено потреблением органических кислот.

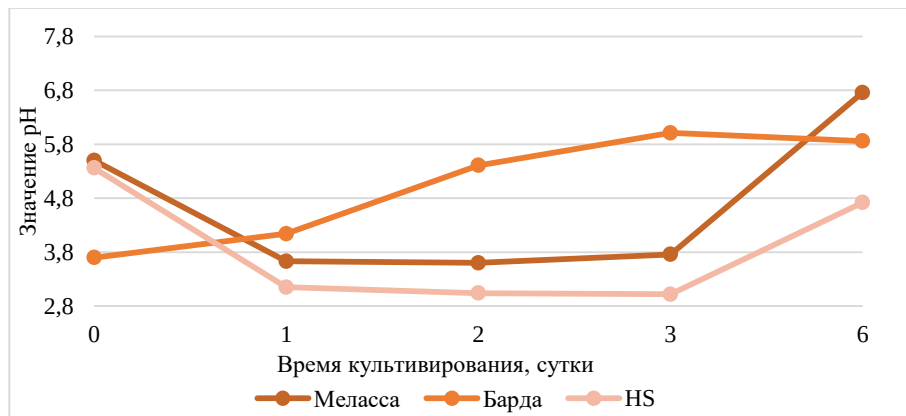


Рисунок 6. Динамика изменения pH при культивировании продуцента на различных средах.

При культивировании продуцента на среде с бардой наблюдается повышение значений pH, вероятно вследствие потребления органических кислот из питательной среды, что подтверждается данными, полученными методом ВЭЖХ: наблюдается снижение концентрации монокарбоновых кислот в культуральной жидкости с $1,55 \pm 0,25$ мг / мл до $0,11 \pm 0,10$ мг / мл (таблица 2).

Таблица 2. Динамика потребления сахаров, монокарбоновых кислот и декстринов, при культивировании *K.sucrofermentans* на среде с бардой

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

В ходе исследования определяли состав питательной среды на основе мелассы концентрацией 5 % при начальном pH 4,5 (таблица 3).

Из полученных данных видно, что при данном значении pH 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 3. 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±0,15	6,02±0,23	8,04±0,02	29,19±0,40
1	14,68±0,06	2,51±0,19	5,69±0,14	22,88±0,39
2	14,05±0,15	2,15±0,15	4,36±0,09	20,56±0,39
3	14,01±0,05	1,81±0,15	3,13±0,15	18,95±0,35

В среде HS единственным источником углерода является глюкоза в концентрации 20 г/л. Динамика изменения концентрации глюкозы приведена в таблице 4.

Таблица 4. Динамика изменения количества глюкозы в среде HS

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

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

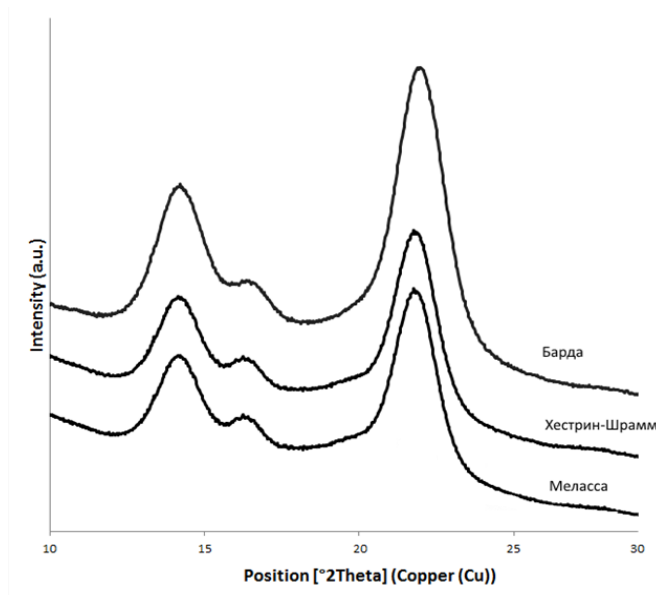


Рисунок 7. Спектры рентгеновской дифракции (режим отражения) БЦ, полученной на среде с мелассой, бардой и стандартной среде HS.

Изучена структура полученной целлюлозы методом ИК-спектроскопии и рентгеноструктурного анализа. Определено содержание α и β фаз, а также индекс кристалличности по ИК спектрам целлюлозы. Данные представлены в таблице 5. Согласно полученным данным наименьший индекс кристалличности наблюдается на среде HS – 1,54±0,06.

Полученные XRD-спектры бактериальной целлюлозы представлены на рисунке 7. На всех полученных спектрах выделяются 3 основных кристаллических пика около 14,4°, 16,7° и 22,4°, что согласуется с литературными данными.

По данным спектрам определили степень кристалличности целлюлозы.

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 %).

Таблица 5. 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 $\pm$ 0,90	56,1 $\pm$ 0,90	1,69 $\pm$ 0,06	83,0
Барда	44,4 $\pm$ 0,41	55,6 $\pm$ 0,41	1,65 $\pm$ 0,08	82,3
HS	44,9 $\pm$ 0,77	55,1 $\pm$ 0,77	1,54 $\pm$ 0,06	79,7

Исследована структура БЦ, полученной на средах с мелассой, бардой и HS с помощью АСМ. Изображения представлены на рисунке 8.

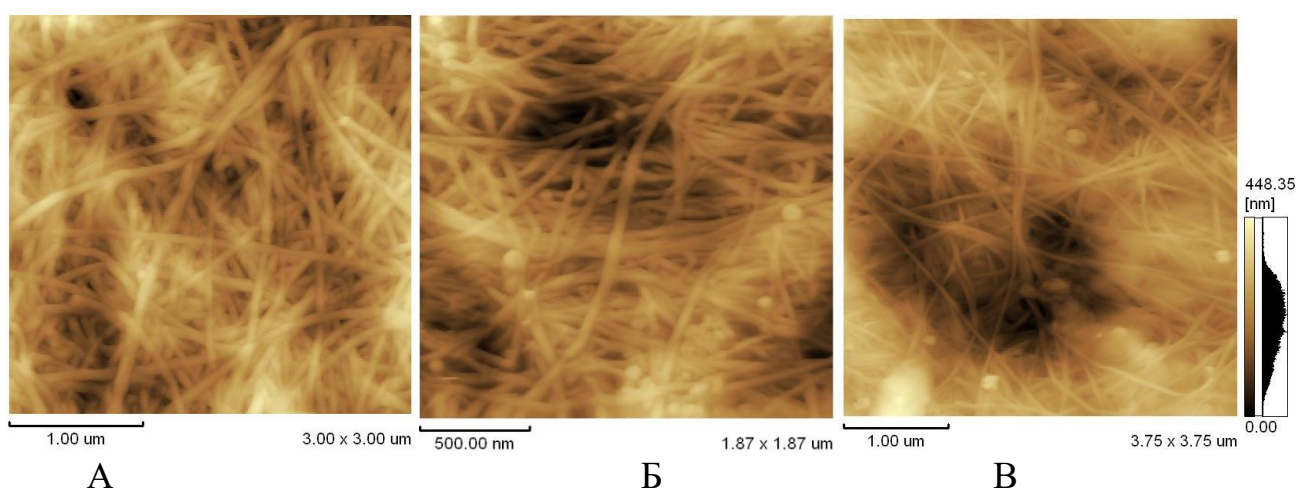


Рисунок 8. АСМ-изображения БЦ, полученной на различных средах: А – меласса, Б – барда, В – HS.

Ширина волокон представлена на рисунке 9. 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 БЦ, сформированных на стандартной среде HS, составляет в среднем 54 $\pm$ 5,5 нм.

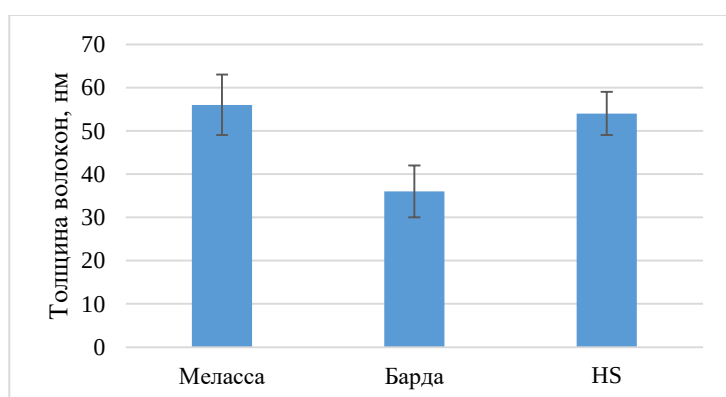


Рисунок 9. Толщина волокон БЦ, полученной на различных средах.

Таким образом, можно отметить, что при использовании отходов биотехнологических производств, а именно мелассы и барды образуется значительно большее количество БЦ, чем на стандартной среде HS. При этом наибольший выход полимера с более тонкими волокнами отмечается на послеспиртовой барде. Кроме того, обнаружено, что степень кристалличности БЦ, образуемой на барде и мелассе, выше, чем на среде HS.

С целью дальнейшего увеличения выхода продукта в среды на основе барды и мелассы вносили дополнительные компоненты, которые согласно представленным ранее результатам положительно влияют на биосинтез БЦ в среде HS. Обнаружено,

что молочная кислота в концентрации 0,5 % увеличивает выход целлюлозы на 43 % и 40 % в среде с бардой и мелассой, соответственно. Показано, что добавление 2 % фруктозы и 1 % мелассы к барде приводит к увеличению выхода продукта на 58 % и 38 %, соответственно.

Таким образом, в ходе проведенных исследований установлено, что такие отходы биотехнологических производств как барда и меласса способствуют увеличению выхода БЦ по сравнению со стандартной средой NS в 3,5 и 2,5 раза, соответственно, и являются перспективным сырьем для производства БЦ.

Масштабирование процесса биосинтеза БЦ на средах с отходами биотехнологических производств

Важными факторами, которые влияют как на структуру, так и на выход БЦ в процессе масштабирования являются условия культивирования. 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). Поэтому важно подобрать оптимальную скорость перемешивания культуральной среды, влияющую не только на степень аэрации, но и на перенос питательных веществ.

Проведено культивирование *K. saccharofermentans* в биореакторе Biostat A plus объемом 1 л в среде с мелассой в течение 3 суток для подбора оптимальных режимов культивирования, а именно скорости перемешивания и режима аэрации. Данные по образованию БЦ представлены в таблице 6.

Таблица 6. Образование БЦ при различных режимах перемешивания и аэрации на третьи сутки в биореакторе Biostat A plus в 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 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 приводит 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 ± 0,13 г/л.

При помощи метода ИК-спектроскопии определен индекс кристалличности и содержание α и β фаз у лиофильно высушенных образцов целлюлозы, полученных при различных условиях культивирования, а также методом АСМ определена ширина волокон (таблица 7).

Таблица 7. Индекс кристалличности, содержание α и β фаз и ширина волокон БЦ, полученной в биореакторе BiostatAplus 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±0,2	57,0±0,2	1,60±0,02	56,3±8,5
0,7 л/л среды·мин ⁻¹ , 300 об/мин	44,4±0,3	55,6±0,3	1,97±0,06	36,9±6,2
0,7 л/л среды·мин ⁻¹ , 350 об/мин	41,1±0,3	58,9±0,3	1,58±0,04	77,3±9,9
0,9 л/л среды·мин ⁻¹ , 250 об/мин	43,3±0,4	56,7±0,4	1,42±0,06	53,3±7,2
0,9 л/л среды·мин ⁻¹ , 300 об/мин	42,6±0,5	57,4±0,5	1,76±0,08	64,5±7,1
0,9 л/л среды·мин ⁻¹ , 350 об/мин	40,2±0,3	59,8±0,3	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).

Показано, что наименьшая ширина волокна – 36,9±6,2 нм наблюдается при оптимальном режиме культивирования.

В следующей серии опытов, с помощью рентгеноструктурного анализа исследована структура БЦ, полученной при степени аэрации – 0,7 л/л среды·мин⁻¹ и скорости перемешивания 250, 300 и 350 об/мин. Значения индекса кристалличности изученных образцов представлены в таблице 8.

Таблица 8. Степень кристалличности целлюлозы, полученной в биореакторе Biostat Aplus при различных режимах культивирования.

Режим аэрации и перемешивания	Степень кристалличности, %
0,7 л/л среды·мин ⁻¹ , 250 об/мин	78,6
0,7 л/л среды·мин ⁻¹ , 300 об/мин	78,8
0,7 л/л среды·мин ⁻¹ , 350 об/мин	69,4

Наибольшая степень кристалличности (78,8 %) наблюдается при степени аэрации 0,7 л/л среды·мин⁻¹ и скорости перемешивания 300 об/мин. При 250 об/мин наблюдается незначительное снижение степени кристалличности до 78,6 %. Показано, что при увеличении скорости перемешивания до 350 об/мин происходит снижение

степени кристалличности до 69,4 %, что вероятно связано с негативным влиянием механического воздействия вследствие разрушения межводородных связей целлюлозы, что может приводить к разрушению ее кристаллической структуры.

Дальнейшее масштабирование процесса получения БЦ проведено в биореакторе Biostat V plus объемом 6л в среде с мелассой (рис. 10).

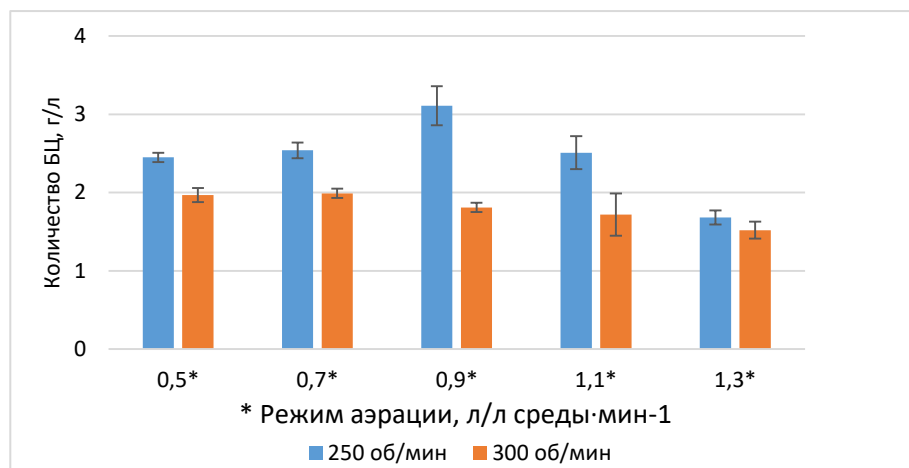


Рисунок 10. Образование БЦ на среде с 5 % мелассы на третьи сутки культивирования в биореакторе Biostat V plus при различных режимах культивирования.

Согласно полученным данным наибольший выход БЦ (3,11 г/л) наблюдается при следующем режиме: степень аэрации – 0,9 л/л среды·мин⁻¹ и скорость перемешивания – 250 об/мин. При увеличении скорости перемешивания и аэрации наблюдается снижение образования продукта (рис. 10).

Исследовано влияние условий культивирования продуцента в биореакторе BiostatVplus на структуру БЦ с помощью рентгеноструктурного анализа. Значения степени кристалличности целлюлозы, а также индекс кристалличности представлены в таблице 9.

Таблица 9. 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±0,6	55,2±0,6	1,6±0,1	61,0
1,1 л/л среды·мин ⁻¹ , 250 об/мин	46,5±0,6	53,5±0,6	1,4±0,11	50,2

Обнаружено резкое уменьшение степени кристалличности БЦ при увеличении степени аэрации. При режиме аэрации 0,5 л/л среды·мин⁻¹ степень кристалличности составляла 61,0 %, а при 1,1 л/л среды·мин⁻¹ – 50,2 %. Кроме того, происходит снижение индекса кристалличности с 1,6 до 1,4.

Дальнейшее масштабирование процесса получения БЦ проведено в биореакторе Biostat C plus объемом 30 л. Оптимизированы режимы культивирования продуцента на среде с мелассой в концентрации 5 %. Данные представлены на рисунке 11.

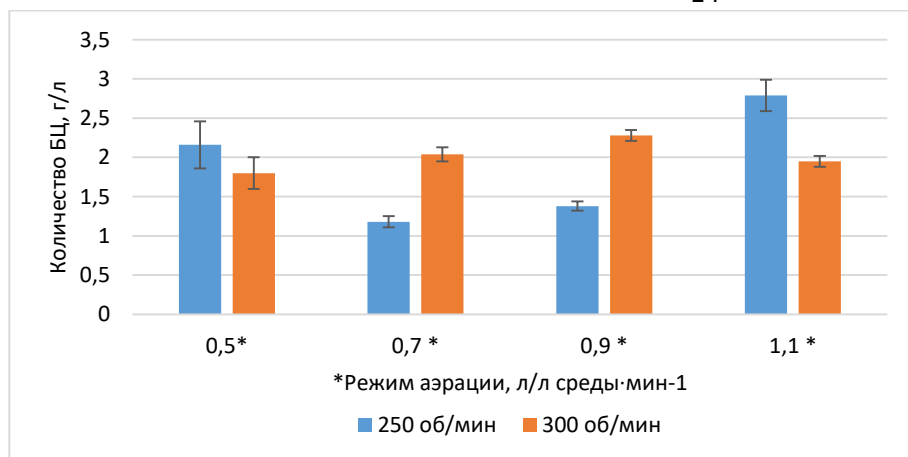


Рисунок 11. Образование БЦ при различных условиях культивирования на третьи сутки в биореакторе объемом 30 л на среде с мелассой.

Показано, что увеличение степени аэрации при скорости перемешивания 250 об/мин приводит к повышению уровня образования БЦ. Наибольший выход полимера достигнут при степени аэрации 1,1 л/л среды·мин⁻¹ – 2,8 г/л. При увеличении скорости перемешивания до 300 об/мин происходит увеличение выхода продукта. Однако при степени аэрации 1,1 л/л среды·мин⁻¹ наблюдается снижение продуктивности, что вероятно говорит о негативном влиянии большого количества растворенного кислорода.

Исследована структура целлюлозы, полученной при наилучшем режиме культивирования. Значения степени кристалличности целлюлозы, а также индекс кристалличности представлены в таблице 10. Показано, что степень кристалличности изученного образца целлюлозы составляет 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.

Таблица 10. Индекс кристалличности, содержание α и β фаз и степень кристалличности БЦ, полученной в биореакторе Biostat Cplus.

Режим аэрации и перемешивания	Iα, %	Iβ, %	Индекс кристалличности	Степень кристалличности, %
1,1 л/л среды·мин ⁻¹ , 250 об/мин	43,8±0,5	56,2±0,5	1,57±0,07	54,6

В биореакторе объемом 1 л наибольшее количество БЦ образуется в среде с мелассой при скорости перемешивания 300 об/мин и степени 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: степень аэрации – 0,9 л/л среды мин⁻¹ и скорость перемешивания – 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 степени аэрации 0,5 л/л среды мин⁻¹ 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 степени 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.

Получение гидрогелевых композитов на основе БЦ, обладающих антибактериальными свойствами

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.

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.

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.

На рисунке 12 показаны ИК-спектры БЦ и высушенных гидрогелей БЦ и хитозана в соотношении 80:20, 50:50 и 20:80, а также чистого хитозана.

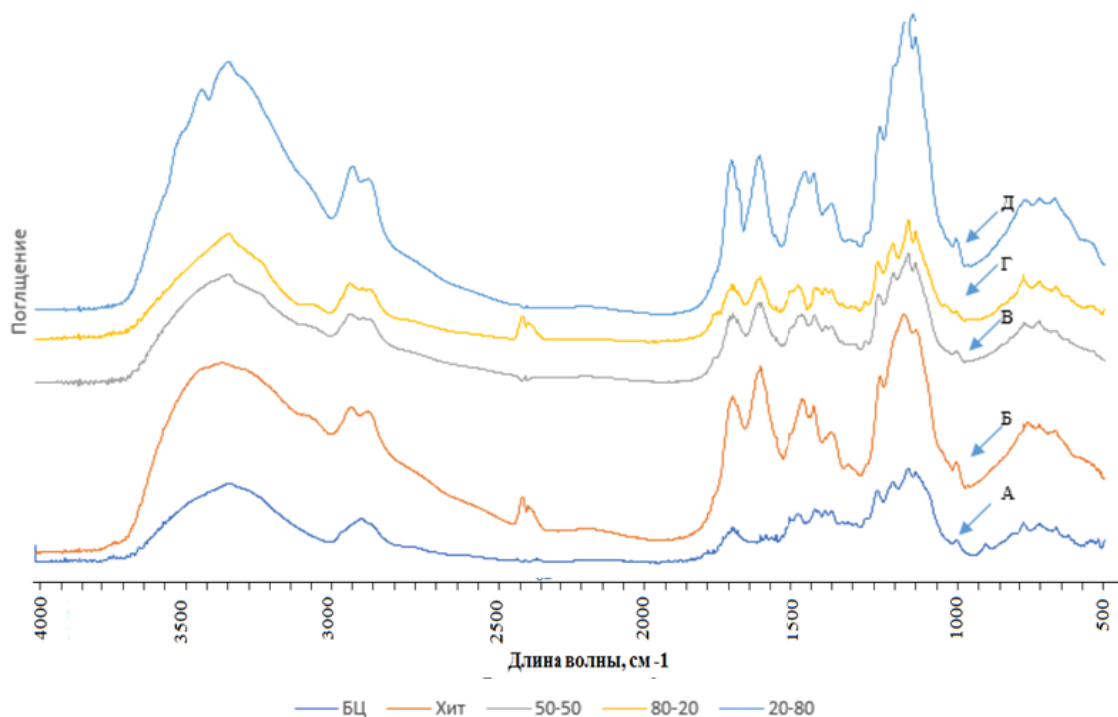


Рисунок 12. ИК-спектры пленки БЦ, хитозана и композитов БЦ-хитозан в соотношении 80:20, 50:50, 20:80.

В частности, на ИК-спектрах чистых пленок БЦ обнаружена область поглощения при $3200\text{--}3500\text{ см}^{-1}$ 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 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 (Cacicedo et al., 2019). 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 хитозана (Povea et al., 2011).

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 (Lin et al., 2013). 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 (Aranaz et al., 2016). Кроме того, пик, относящийся к растяжению О-Н, стал шире, что позволяет предположить, что молекулы хитозана вмешиваются в водородные связи между цепями целлюлозы (Jia et al., 2017). Характерные полосы хитозана смещены в присутствии целлюлозы, что указывает на

межмолекулярную связь между аминогруппами хитозана и гидроксильными остатками БЦ с образованием водородных связей (Phisalaphong and Jatupaiboon, 2008).

Для дополнительного изучения структуры полученных композиционных материалов использовали метод компьютерной микротомографии. Результаты представлены на рисунке 13.

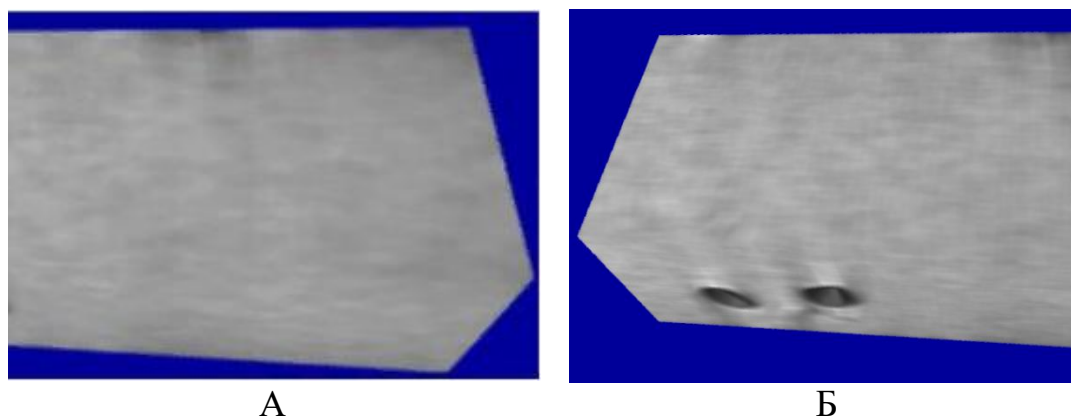


Рисунок 13. Рентгеновские микротомографии гидрогелей:
А – БЦ : хитозан (50:50); Б – БЦ : хитозан (20:80).

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 14, все гидрогели представлены микропористыми структурами, что справедливо для всех видов лиофильно высушенных гидрогелей и соответствует литературным данным (Wahid et al., 2018).

У изученных образцов наблюдаются различия в структуре, а именно размере пор. Чистый гидрогель хитозана характеризуется наибольшим размером пор (рис. 14А), в то время как размер пор уменьшается путем введения БЦ в гидрогели (BC-20 и BC-50), как показано на рисунке 14Б и 14В. Это может быть вызвано, более упорядоченной и тонкой структурой волокон БЦ (рис. 14Г).

Изучена влагосвязывающая способность, полученных гидрогелевых композитов (рис. 15). Согласно полученным данным, наибольшая влагосвязывающая способность наблюдается у гидрогеля чистого хитозана, причем максимум ($139,12 \pm 7,2$ %) наблюдается на 3 час, 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.

После проведенных исследований предположили о возможности уменьшения концентрации сшивающего агента. В связи с чем, были получены два аналогичных композита при использовании 1 % глутарового альдегида.

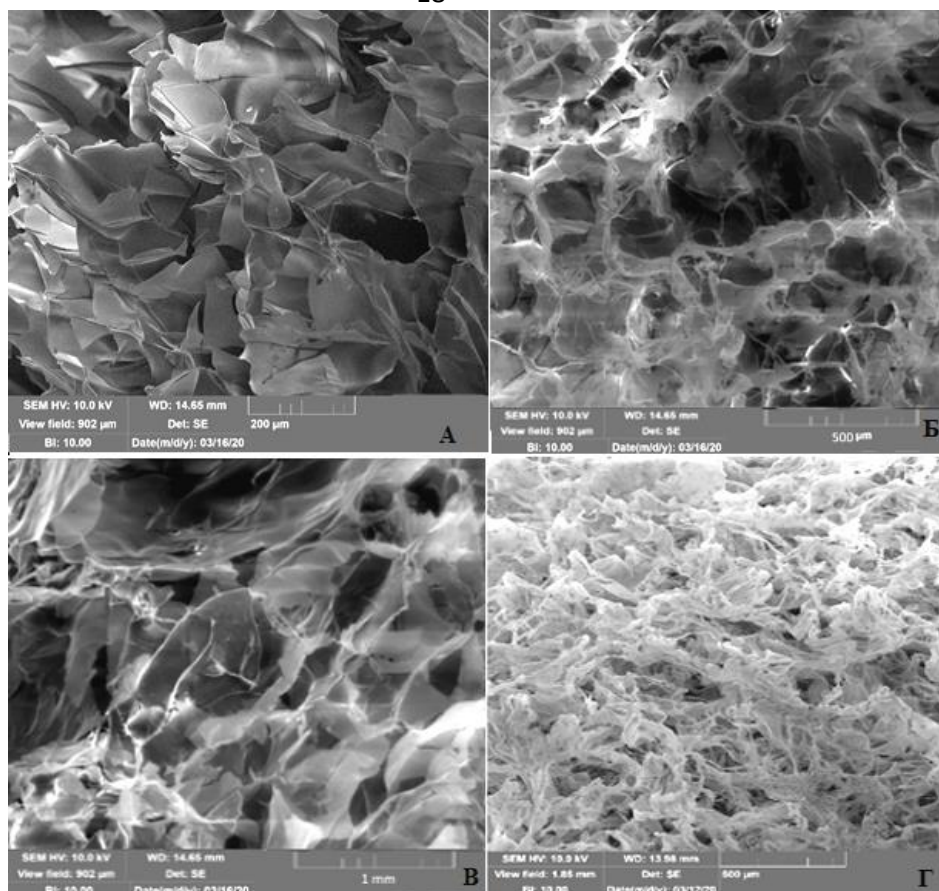


Рисунок 14. СЭМ–изображения структуры гидрогелей БЦ-хитозан: А – Хитозан (200 мкм), Б – БЦ-хитозан 20:80 (500 мкм), В – БЦ-хитозан 50:50 (1 мм), Г – БЦ (500 мкм)

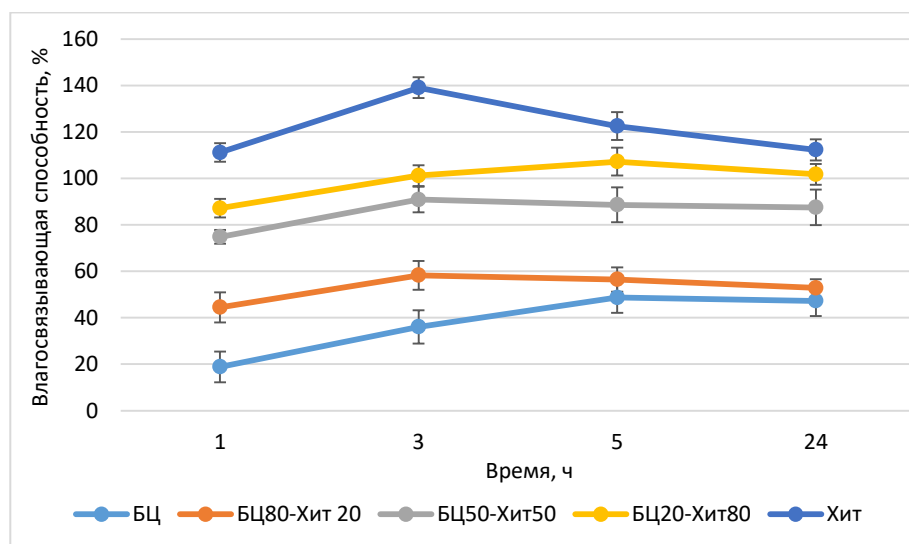


Рисунок 15. Влагосвязывающая способность гидрогелей на основе целлюлозы и хитозана.

Влагосвязывающая способность гелей была определена при использовании воды в течение 24 ч и показана на рисунке 16.

Согласно представленным данным, наибольшая влагосвязывающая способность наблюдается у образца с соотношением БЦ-хитозан 20:80 – 297,8 % на 24 ч. Тогда как у образца с большим содержанием целлюлозы (50:50) наблюдается также, как и ранее меньшее значение влагосвязывающей способности – 175,2 %.

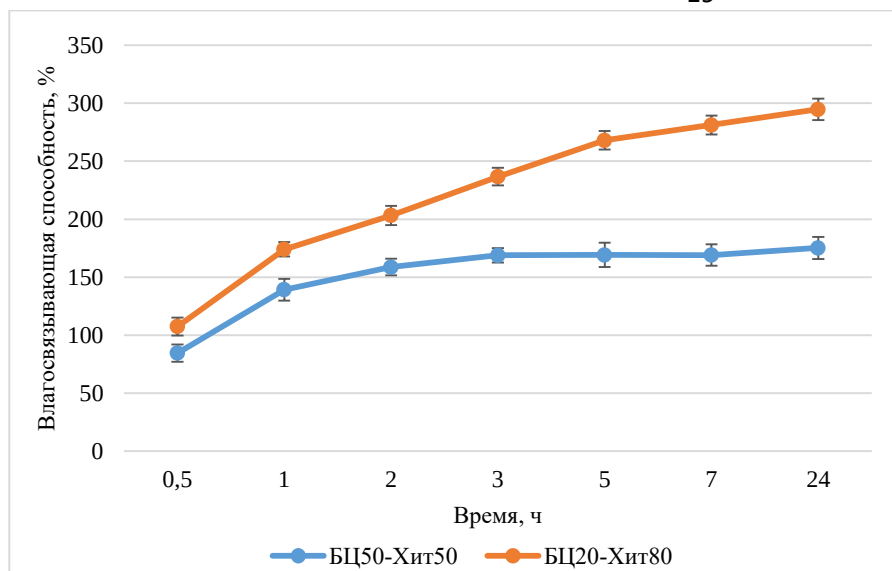


Рисунок 16. Влагосвязывающая способность гидрогелей на основе целлюлозы и хитозана с 1% глутарового альдегида.

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. 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, которая увеличивалась при уменьшении количества сшивающего агента с 2 % до 1 %.

Для дальнейшего исследования были отобраны образцы БЦ-хитозан 50:50 и 20:80, поскольку они обладали наилучшими обобщающими характеристиками.

Антибактериальная активность контрольных гидрогелей без антибиотика была протестирована на тест-культурах *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis* и *Escherichia coli*. В таблице 11 показаны площади зон задержки роста. Все образцы продемонстрировали антибактериальную активность против данных бактериальных штаммов, которая 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.

Так же, можно заметить, что при тестировании гидрогелей по отношению к *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 *B. licheniformis*, наибольшая активность проявляется при использовании 1 % ГА. Это вероятно вызвано тем, что хитозан находится в менее сшитом состоянии и содержит большее число заряженных групп.

Для усиления антибактериальных свойств композитов использовали фузидин натрия, который добавляли в гидрогели в концентрации 20 мкг/г.

Фузидин натрия эффективен в отношении стафилококков, устойчивых к пенициллинам, стрептомицину, хлорамфениколу, эритромицину. Препарат эффективен в лечении системных и местных стафилококковых инфекций кожи и мягких тканей, костей и суставов, крови, эндокарда, глаз, в том числе вызванных метициллинорезистентными штаммами. Кроме того, помимо антибактериального

фузидовая кислота обладает слабым иммуномодулирующим действием, которое связывают с подавлением продукции и секреции цитокинов, особенно интерлейкинов и фактора некроза опухолей. Изложенное позволяет включить фузидовую кислоту в один ряд с современными антибактериальными препаратами и рекомендовать ее к более широкому использованию, особенно при инфекциях, вызванных метициллинорезистентными штаммами *S. aureus*.

Таблица 11. Антибактериальная активность контрольных гидрогелевых композитов 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

Антибактериальная активность гидрогелевых композитов была проверена на тест-микроорганизмах: грамположительных бактериях *S. aureus* и грамотрицательных бактериях *E. coli*. Полученные результаты представлены в таблице 12 и рисунке 17. Все образцы продемонстрировали антибактериальную активность в отношении исследуемых тест-культур.

Таблица 12. Антибактериальная активность гидрогелевых композитов с антибиотиком.

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 высокую активность в отношении *S. aureus*.

Кроме того, определяли антибактериальную активность методом подсчета колониеобразующих единиц, помещая 0,5 г гидрогеля в пробирку с 5 мл бактериальной суспензии. Данные представлены в таблице 13.

Согласно полученным результатам, образцы, содержащие фузидин 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.

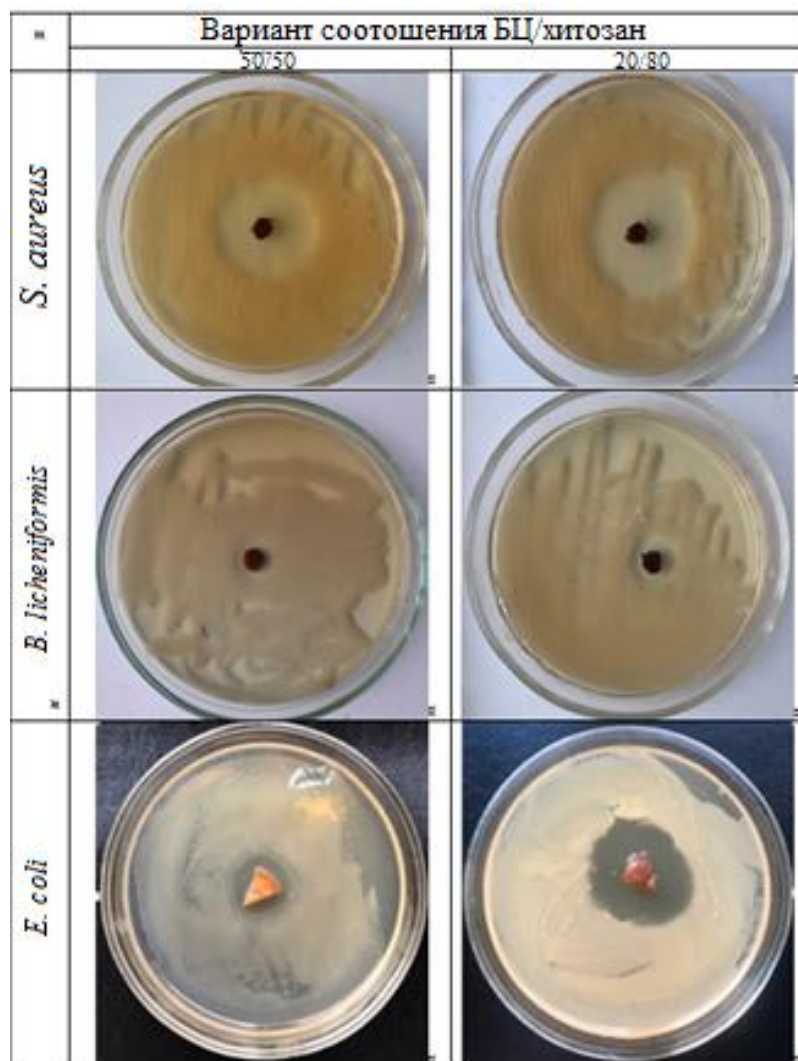


Рисунок 17. Антибактериальная активность гидрогелевых композитов БЦ-хитозан с соотношениями 50:50 и 20:80 с антибиотиком.

Таблица 13. Количество жизнеспособных клеток (КОЕ / мл) и снижение жизнеспособности клеток микроорганизмов (%) при динамическом контакте с гидрогелевыми композитами БЦ/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

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. sucrofermentans* в стандартной среде HS 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 фузицина 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. sucrofermentans* 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. sucrofermentans* на стандартной среде HS с различными источниками углерода. Показано, что максимальное количество БЦ с наиболее тонкими волокнами образуется на среде HS с глицерином, выход полимера при этом увеличивается на 95 % относительно контроля.

2. Впервые разработаны технологические основы получения БЦ с помощью штамма *K. sucrofermentans* на средах с отходами биотехнологических производств: мелассой и бардой, что позволяет снизить себестоимость готового продукта и увеличить выход полисахарида по сравнению со стандартной средой HS в 3,5 и 2,5 раза, соответственно. Выход полимера составляет на среде HS – 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 HS: степень кристалличности полисахарида на стандартной среде – 79,7 %, на мелассе – 83,0 %, на барде – 82,3 %.

4. Впервые изучено влияние условий культивирования *K. sucrofermentans* 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. sucrofermentans* 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах Перечня ВАК РФ и международных цитатно-аналитических баз.

1. Сапунова Н.Б., **Богатырева А.О.**, Щанкин М.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальной целлюлозы на среде с мелассой // Вестник технологического университета. – 2016. – Т. 19. – № 24. – С.154-156.
2. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Сапунова Н.Б., **Богатырева А.О.** Выделение и характеристика штаммов - продуцентов бактериальной целлюлозы // Микробиология. – 2020. – Т. 89. – № 1. – С. 88-98.
3. Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., **Bogatyreva A.**, Schankin M. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products // Brazilian journal of microbiology. – 2018. – Vol. 49. – I. 4. – P. 788-796.

Патенты:

1. Патент № 2733137, Российская Федерация. Способ получения биокомпозита с регенерационными свойствами на основе гидрогеля бактериальной целлюлозы / Лияськина Е.В., **Богатырева А.О.**, Ревин В.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва» (RU) – опубл. 29.09.2020

Тезисы докладов на российских и международных конференциях:

1. **Богатырева А.О.**, Лияськина Е.В., Ревин В.В. Изучение влияния органических кислот на образование бактериальной целлюлозы // Сборник статей Международной научно-практической конференции. Инновационная наука и современное общество. – Уфа: Общество с ограниченной ответственностью «Аэтерна». – 2014. – С. 19-21.
2. Ревин В.В., Лияськина Е.В., Назаркина М.И., **Богатырева А.О.**, Щанкин М.В. Получение бактериальной целлюлозы на отходах пищевой промышленности // Актуальная биотехнология. – 2014. – Т 10. – № 3. – С.112.
3. **Богатырева А.О.**, Лияськина Е.В., Ревин В.В., Сапунова Н.Б. Оптимизация питательных сред для получения бактериальной целлюлозы // Перспективы развития химических и биологических технологий в 21-м веке: Материалы всеросс. науч. конф. с междунар. участием. (Саранск, МГУ им. Н.П. Огарева, 23-25 сентября 2015 г.). – Саранск: Типография ООО «Референт». – 2015. – С. 20-22
4. Liyaskina E.V., Revin V.V., Nazarkina M.N., **Bogatyreva A.O.**, Shchankin M.V. Cost-effective production of bacterial cellulose using food industry by-products // Journal of Biotechnology. – 2015. – Vol. 28. – P.117.
5. **Богатырева А.О.**, Лияськина Е.В., Ревин В.В. Оптимизация питательных сред для получения бактериальной целлюлозы // Тезисы докладов 69-й Всероссийской школы-конференции молодых ученых, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского Институт биологии и биомедицины. – Нижний Новгород: Издательство: Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 2016. – С. 17.
6. Лияськина Е.В., Ревин В.В., **Богатырева А.О.**, Сапунова Н.Б., Парамонова Е.Н., Щанкин М.В. Получение бактериальной целлюлозы и материалов на ее основе // Актуальная биотехнология. – 2016. – Т.3. – №18. – С. 38-39.
7. **Богатырева А.О.**, Щанкин М.В., Сапунова Н.Б., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Получение бактериальных экзополисахаридов // XV Международная конференция молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии» (г. Казань, 13-14 апреля 2016 г.). Сборник материалов конференции. – Казань: Издательство «БРИГ». – 2016. – С. 154-155.
8. Сапунова Н.Б., **Богатырева А.О.**, Ревина Н.В., Лияськина Е.В., Ревин В.В. Биоматериалы на основе бактериальной целлюлозы для регенеративной медицины // Гены и клетки. – 2019. – Т. XIV. – № 3. – С. 205-206.
9. Sapunova N.B., **Bogatyreva A.O.**, Liyaskina E.V., Revin V.V. Production of bacterial cellulose using distillery wastewater // Journal of Biotechnology. – 2019. – Vol. 305. – P. 51.
10. Лияськина Е.В., Ревин В.В., Сапунова Н.Б., **Богатырева А.О.**, Лияськина А.Ю. Продуценты бактериальных экзополисахаридов // 2-й Российский микробиологический конгресс (г. Саранск, 23–27 сент. 2019 г.): Материалы конгресса. – Саранск. – 2019. – С. 77.