

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, СИНТЕЗИРОВАННОЙ НА ФЕРМЕНТАТИВНОМ ГИДРОЛИЗАТЕ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО МАТЕРИАЛА ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

Е.К. Гладышева, Е.А. Скиба, Л.А. Алешина

*Исследован процесс культивирования симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* на ферментативном гидролизате лигноцеллюлозного материала плодовых оболочек овса (ПОО). Лигноцеллюлозный материал ПОО получен обработкой сырья разбавленным раствором азотной кислоты в одну стадию на опытном производстве, ферментативный гидролиз лигноцеллюлозного материала ПОО проведен в ферментере объемом 11 л. Установлено, что ферментативный гидролизат лигноцеллюлозного материала ПОО не является доброкачественной средой для синтеза бактериальной целлюлозы (БЦ): к концу культивирования в питательной среде доля неутилизованного субстрата составляет 30 %, выход БЦ не превышает 3 %, а при длительности культивирования свыше 10 суток наблюдается снижение выхода и степени полимеризации БЦ. Исследования полученных образцов БЦ методом ИК-спектроскопии показали соответствие структуры БЦ структуре растительной целлюлозы. Картина рентгенографической дифракции отобразила, что БЦ состоит из триклинной фазы I α .*

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, *Medusomyces gisevii*, инфракрасная спектроскопия, рентгенографические исследования, ферментативный гидролизат, плодовые оболочки овса.

ВВЕДЕНИЕ

Самая распространенная питательная среда для синтеза бактериальной целлюлозы (БЦ) содержит глюкозу как источник углерода и другие питательные вещества [1]. Высокая стоимость питательной среды определяет высокую стоимость БЦ, что ограничивает широкое применение данного материала. В этой связи актуальной задачей является поиск дешевых питательных сред.

Известно об использовании в качестве питательных сред отходов пищевой промышленности, таких как послеспиртовая барда и молочная сыворотка [2, 3]. В работе [4] исследовано использование в качестве питательной среды экстракта виноградной кожицы, подсырной сыворотки, сульфитных щелоков и отходов промышленного производства глицерина. Наибольший выход БЦ получен на питательной среде экстракта виноградной кожицы. Также известно, об использовании в качестве питательной среды для синтеза БЦ – кислотного гидролизата соломы пшеницы, детоксифицированного путем обработки щелочами [5].

В ИПХЭТ СО РАН разработана технология получения ферментативных гидролизатов из такого возобновляемого целлюлозосодержащего сырья, как биомасса плодовых оболочек овса (ПОО) – массового отхода зерно-

переработки. Плодовые оболочки овса составляют до 28 % от массы зерна, содержат 35–40 % целлюлозы и размещаются непосредственно в промышленных районах на элеваторах. ПОО представляют собой калиброванное природой сырье (размеры частиц в диапазоне 0,007–0,012 м), готовое к технологической переработке [6].

Поскольку нативное целлюлозосодержащее сырье характеризуется низкой реакционной способностью к ферментативному гидролизу, оно должно быть подвергнуто предварительной физической, химической или механической обработке. Лигноцеллюлозный материал получают из ПОО в одну стадию обработкой азотной кислотой, что позволяет повысить реакционную способность к ферментативному гидролизу в 8 раз. Показано, что ферментативные гидролизаты, полученные из лигноцеллюлозного материала ПОО являются биологически доброкачественными, и для биосинтеза этанола не нуждаются в дополнительной технологической обработке для освобождения их от вредных примесей [7].

Целью данной работы являлось изучение процесса биосинтеза БЦ на ферментативном гидролизате лигноцеллюлозного материала ПОО и исследование структуры полученных образцов БЦ.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, СИНТЕЗИРОВАННОЙ НА ФЕРМЕНТАТИВНОМ ГИДРОЛИЗАТЕ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО МАТЕРИАЛА ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Лигноцеллюлозный материал ПОО был получен обработкой разбавленным раствором азотной кислоты на опытном производстве ИПХЭТ СО РАН. Лигноцеллюлозный материал ПОО имеет следующий состав: массовая доля золы – 8,19 %; кислотонерастворимого лигнина – 13,78 %, массовая доля α -целлюлозы – 79,44 %, массовая доля пентозанов – 9,22 %. Ферментативный гидролиз лигноцеллюлозного материала ПОО проводился в ферментере объемом 11 м³ в водной среде при 50 °С в течении 3 суток с помощью ферментных препаратов Целлолюкс-А и Брюзайм ВGX, активная кислотность поддерживалась на уровне 4,7 с помощью гидроксида аммония, более подробна методика описана в работе [7].

Полученный ферментативный гидролизат отфильтровывали от остатков субстрата под вакуумом. Общее количество редуцирующих веществ (РВ) составило 35 г/л, из них ксилозы 4,5 г/л. Для получения концентрации сахаров, обеспечивающий максимальный выход БЦ [8] ферментативный гидролизат лигноцеллюлозного материала ПОО был разбавлен до начальной концентрации РВ для синтеза БЦ – 25 г/л.

В качестве продуцента для синтеза БЦ, использовалась симбиотическая культура *Medusomyces gisevii*. Предварительно проводилась адаптация культуры на исследуемой

питательной среде. Инокулят вносился в питательные среды в количестве 10 % от объема питательной среды, культивирование проводилось в статических условиях при 27 °С в течение 24 суток. Условия культивирования выбраны на основании проведенных ранее работ [9, 10].

Прирост пленки БЦ оценивался гравиметрически (весы лабораторные аналитические Explorer EX-224). Концентрация редуцирующих веществ (РВ) контролировалась спектрофотометрически (спектрофотометр «UNICOUV-2804», США) с использованием динитросалицилового реактива. Концентрация ксилозы и степень полимеризации определялись по стандартной методике. Структура бактериальной целлюлозы была исследована на инфракрасном спектрофотометре «Инфралюм ФТ-801» в таблетках KBr. Рентгенографические исследования образцов БЦ проводились на дифрактометре ДРОН-6 на монохроматизированном кристаллом пиролического графита Fe-K _{α} излучении в интервале углов рассеяния от 3 до 145° в Петрозаводском государственном университете.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлен синтез БЦ, сопряженный со снижением концентрации РВ в процессе культивирования *Medusomyces gisevii*.

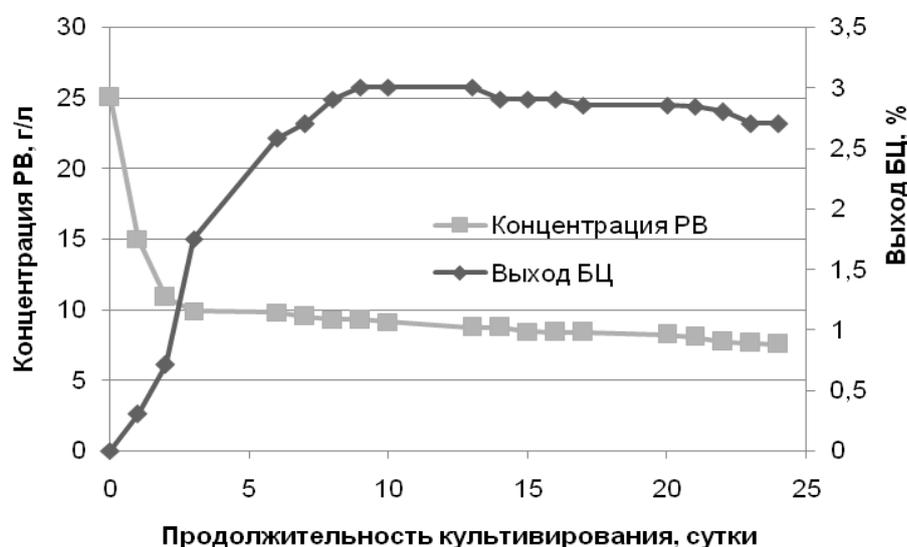


Рисунок 1 – Изменение концентрации РВ в процессе культивирования *Medusomyces gisevii*, сопряженное с синтезом БЦ

Константа скорости утилизации субстрата рассчитана по формуле 1 [11]:

$$K_{y.c.} = \frac{\ln\left(\frac{s_1}{s_2}\right)}{\tau_2 - \tau_1}, \quad (1)$$

где $K_{y.c.}$ – константа утилизации субстрата (РВ), сут^{-1} ; s_1, s_2 – концентрация РВ в начальный и конечный моменты времени; T_1, T_2 – начальный и конечный моменты времени.

Как показано на рисунке 2, в первые 2 суток утилизация РВ была высокой, что может быть связано с активным потреблением сахаров дрожжами. Константа скорости утилизации субстрата с 0 по 2 сутки культивирования составила $0,416 \text{ сут}^{-1}$. После этого скорость поглощения сахаров снижалась. Константа скорости утилизации субстрата с 2 по 24 сутки культивирования составила $0,012 \text{ сут}^{-1}$. Стоит отметить, что концентрация ксилоты в гидролизате в нулевой момент времени составила $3,3 \text{ г/л}$, т.е. полученные гидролизаты преимущественно состоят из глюкозы, концентрацией других сахаров можно пренебречь. На 7 сутки культивирования общая концентрация РВ составила $9,5 \text{ г/л}$, при этом количество ксилоты в гидролизате практически не изменилось и составило $2,9 \text{ г/л}$. На 24 сутки культивирования концентрация РВ в питательной среде составила $7,5 \text{ г/л}$, из них концентрация ксилоты составила $2,2 \text{ г/л}$. Из этого можно сделать вывод, что микроорганизмы, входящие в симбиоз, предпочтительнее потребляют глюкозу. Доля неутилизованного субстрата составила 30 %, что на 21 % больше, чем при культивировании симбиоза на синтетической глюкозной среде с идентичной начальной концентрацией субстрата [8]. Это свидетельствует о наличии ингибиторов синтеза БЦ в ферментативном гидролизате лигноцеллюлозного материала ПОО. Скорость синтеза продукта (бактериальной целлюлозы) рассчитана по формуле 2:

$$K_{c.n.} = \frac{\ln\left(\frac{c_2}{c_1}\right)}{\tau_2 - \tau_1}, \quad (2)$$

где $K_{c.n.}$ – константа синтеза продукта (БЦ), сут^{-1} ; c_1, c_2 – масса продукта в начальный и конечный момент времени; T_1, T_2 – начальный и конечный моменты времени.

В первые сутки культивирования на поверхности питательной среды наблюдались тонкие нити БЦ. Тонкая гель пленка БЦ образовывалась на 2 сутки культивирования. Основной прирост биомассы происходил с 2 по 6 сутки культивирования – выход БЦ увели-

чился с 0,7 % до 2,6 %. Константа скорости синтеза продукта с 2 по 6 сутки составила $0,327 \text{ сут}^{-1}$, с 6 по 10 сутки – $0,035 \text{ сут}^{-1}$. На 10 суток культивирования выход БЦ составил 3,0 %. Сравнивая полученные результаты с выращиванием БЦ на синтетической глюкозной среде [8], можно констатировать снижение выхода БЦ в 2,4 раза.

При культивировании свыше 10 суток происходила деструкция пленок БЦ, о чем свидетельствует снижение выхода к концу культивирования, кроме того наблюдалось снижение степени полимеризации БЦ. В таблице 1 представлена степень полимеризации образцов БЦ, синтезированных на ферментативном гидролизате лигноцеллюлозного материала ПОО, на 7, 14 и 21 сутки культивирования.

Таблица 1 – Степень полимеризации образцов БЦ

Степень полимеризации	Продолжительность культивирования, сутки		
	7	14	21
БЦ	1090	970	750

Наибольшую степень полимеризации имеет образец БЦ синтезированный 7 суток, далее наблюдается снижение степени полимеризации, что свидетельствует о деструкции. Степень полимеризации образцов БЦ, синтезированных на ферментативном гидролизате лигноцеллюлозного материала ниже, чем у образцов БЦ, синтезированных на синтетической питательной среде [12]: например на 14 сутки 970 против 2000 соответственно. Полученные данные свидетельствуют о низкой биологической доброкачественности ферментативного гидролизата лигноцеллюлозного материала ПОО для биосинтеза БЦ.

На рисунке 2 представлена структура образца БЦ, синтезированного на на ферментативном гидролизате лигноцеллюлозного материала ПОО, на 7 сутки культивирования исследованная с помощью ИК-спектроскопии.

В ИК-спектре образца БЦ присутствует интенсивная полоса при 3384 см^{-1} , которая указывает на валентные колебания ОН-групп. Менее интенсивная полоса при 2896 см^{-1} обусловлена валентными колебаниями групп CH_2, CH . В спектре бактериальной целлюлозы слабые полосы при 1649 и 1537 см^{-1} принадлежат деформационным колебаниям ОН-групп прочно связанной воды. Слабые полосы поглощения в диапазоне: $1370\text{--}1430 \text{ см}^{-1}$ обусловлены деформационным колебаниям групп CH_2 ; $1360\text{--}1320 \text{ см}^{-1}$ – деформацион-

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, СИНТЕЗИРОВАННОЙ НА ФЕРМЕНТАТИВНОМ ГИДРОЛИЗАТЕ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО МАТЕРИАЛА ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

ные колебания групп OH в CH_2OH . Полосы в диапазоне $1290\text{--}1240\text{ см}^{-1}$ указывают на деформационные колебания OH-групп в спиртах. Полоса при 1204 см^{-1} указывает на деформационные колебания OH-групп. Полосы поглощения в области $1000\text{--}1200\text{ см}^{-1}$ обу-

словлены в основном валентными колебаниями C-O-C и C-O в спиртах [13]. Химическая структура полученной БЦ соответствует структуре БЦ, синтезированной на синтетической питательной среде [10], и структуре растительной целлюлозы [13].

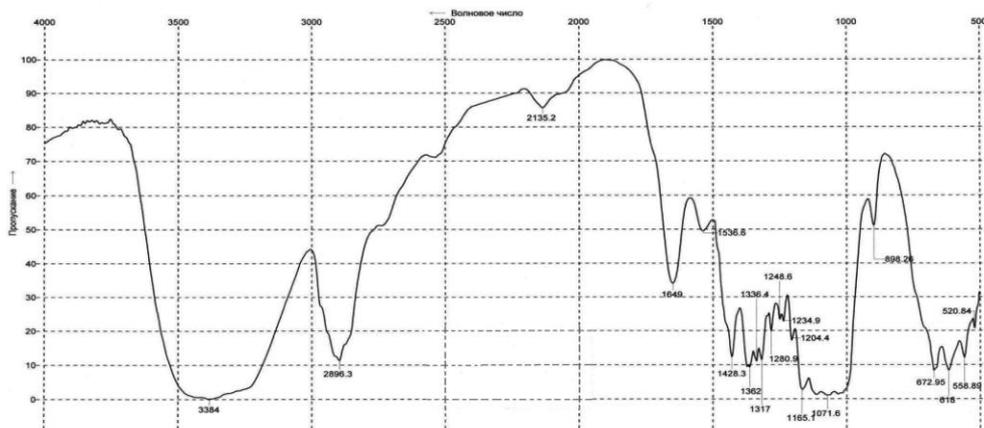


Рисунок 2 – Ик-спектр образца БЦ

На рисунке 3 представлены результаты полнопрофильного анализа рентгенограмм БЦ, синтезированных на ферментативном

гидролизате лигноцеллюлозного материала ПОО, отснятых на отражение.

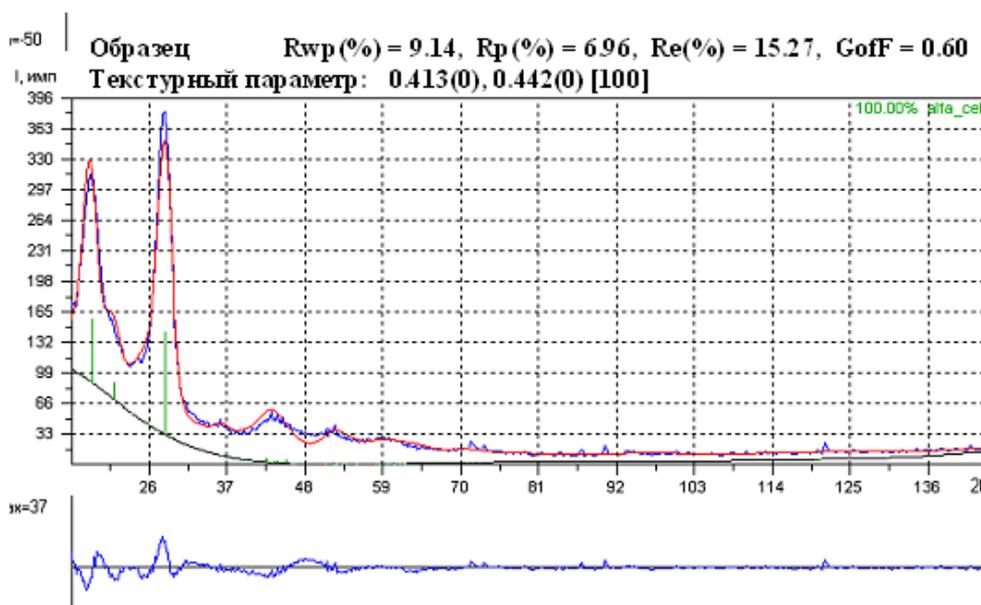


Рисунок 3 – Полнопрофильный анализ рентгенограммы, отснятой на отражение

Расчеты выполнены в предположении, что образец содержит только фазу $I\alpha$. Попытки включить в расчет фазы $I\beta$ и целлюлозу II, привели к очень маленькому (не более 2–3 %) их содержанию и большому размытию их отражений. Преобладание низкосимметричной фазы $I\alpha$ в экспериментальном образце хорошо согласуется с литературными данными, свидетельствующими, что, в отличие от рас-

тительной целлюлозы, целлюлозы примитивных организмов характеризуются высоким процентом фазы $I\alpha$ (~70 %) [14].

ВЫВОДЫ

Исследован процесс культивирования симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* на ферментативном гидролизате лиг-

ноцеллюлозного материала ПОО. Установлено, что лигноцеллюлозный материал ПОО не является благоприятной средой для синтеза БЦ, т.к. к концу культивирования в питательной среде доля неутилизованного субстрата составляет 30 %, а выход БЦ не превышает 3 %. Снижение степени полимеризации БЦ при продолжительном культивировании указывает на деструкцию полученных образцов. Исследования полученных образцов БЦ методом ИК-спектроскопии показали, что структура БЦ соответствует структуре БЦ, синтезированной на синтетической питательной среде, и структуре растительной целлюлозе. Рентгенографические исследования полученных образцов показали, что БЦ преимущественно состоит из триклинной фазы Ia.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hestrin, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose / S. Hestrin, M. Schramm // *Journal of Biochemistry*. – 1954. – № 58. – P. 345–352.
- Пат. 2536973, Россия. Способ получения бактериальной целлюлозы / Ревин В. В., Лияськина Е. В., Назаркина М. И. – № 2013154403/10; заявл. 06.12.2013; опубл. 27.12.2014, Бюл. № 36. – 6 с.
- Пат. 2536257, Россия. Способ получения бактериальной целлюлозы / Ревин В. В., Лияськина Е. В., Назаркина М. И., Киреев Н. В. – № 2013127538/10; заявл. 17.06.2013; опубл. 20.12.2014, Бюл. № 35. – 5 с.
- Carreira, P., Utilization of residues from agroforest industries in the production of high value bacterial cellulose / P. Carreira, J. A. S. Mendes, E. Trovatti, L. S. Serafim, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre // *Bioresource technology*. – 2011. – № 102. – P. 7354–7360.
- Hong, F. Wheat straw acid hydrolysate as a potential cost-effective feedstock for production of bacterial cellulose / F. Hong, Y. X. Zhu, G. Yang, X. X. Yang // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2011. – № 86. – P. 675–680.
- Будаева, В. В. Новые сырьевые источники целлюлозы для технической химии / В. В. Будаева, Р. Ю. Митрофанов, В. Н. Золотухин, Г. В. Сакович // *Вестник Казанского технологического университета*. – 2011. – № 7. – С. 205–212.
- Skiba, E. A. Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Materials in Aqueous Media and the Subsequent Microbiological Synthesis of Bioethanol / E. A. Skiba, V. V. Budaeva, O. V. Baibakova, E. V. Udoratina, E. G. Shakhmatov, T. P. Shcherbakova, A. V. Kuchin, G. V. Sakovich // *Catalysis in Industry*. – 2016. – Vol. 8, № 2. – P. 168–175.
- Гладышева, Е. К. Изучение биосинтеза бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* J. Lindau на средах с различной начальной концентрацией глюкозы / Е. К. Гладышева // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 2-1. – С. 13–17.
- Гладышева, Е. К. Биосинтез бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* / Е. К. Гладышева, Е. А. Скиба // *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*. – 2015. – № 3. – С. 149–156.
- Гладышева, Е. К. Исследование влияния температуры на синтез бактериальной целлюлозы продуцентом *Medusomyces gisevii* / Е. К. Гладышева // *Современные наукоемкие технологии*. – 2016. – № 8-1. – С. 36–40.
- Яровенко, В. Л. Технология спирта / В. Л. Яровенко, В. А. Маринченко, В. А. Смирнов. – Москва: Колос, 1999. – 464 с.
- Гладышева, Е. К. Исследование физико-химических свойств бактериальной целлюлозы, продуцируемой культурой *Medusomyces gisevii* / Е. К. Гладышева // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – № 5-1. – С. 53–57.
- Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Ч. II. – СПб.: НПО «Профессионал», 2006. – 1142 с.
- Алешина, Л. А. Современные представления о строении целлюлоз (обзор) / Л. А. Алешина, С. В. Глазкова, Л. А. Луговская, М. В. Подойникова, А. Д. Фофанов, Е. В. Силина // *Химия растительного сырья*. – 2001. – № 1. – С. 5–35.

Гладышева Евгения Константиновна, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), e-mail: evggladysheva@yandex.ru, тел.: (3854) 30-14-15.

Скиба Екатерина Анатольевна, к.т.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), e-mail: eas08988@mail.ru, тел.: (3854) 30-59-85.

Алешина Людмила Александровна, к.ф.-м.н., доцент кафедры физики твердого тела, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Петрозаводский государственный университет (ПетрГУ), e-mail: ale-shina@psu.karelia.ru, тел.: (8142)719654.