

УДК 577.114

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПРОДУЦЕНТОМ MEDUSOMYCES GISEVII

Гладышева Е.К.

*ФГБУН «Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения
Российской академии наук», Бийск, e-mail: evg-gladyшева@yandex.ru*

Исследован биосинтез бактериальной целлюлозы на синтетической глюкозной среде с использованием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* в интервале температур от 21 до 36 °С. Установлено, что для синтеза бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* оптимальным является температурный диапазон от 24 до 27 °С, отклонения от оптимума вызывают снижение целлюлозосинтетической способности. Отмечено, что температурные оптимумы для жизнедеятельности *Medusomyces gisevii* и для биосинтеза бактериальной целлюлозы не совпадают, повышение температуры культивирования приводит к интенсификации синтеза органических кислот, при этом снижается выход бактериальной целлюлозы. Установлено, что степень полимеризации бактериальной целлюлозы снижается обратно пропорционально повышению температуры культивирования. Показано, что инфракрасные спектры образцов бактериальной целлюлозы, полученных в исследуемом диапазоне температур, идентичны.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, температура, *Medusomyces gisevii*, степень полимеризации, инфракрасная спектроскопия

TEMPERATURE EFFECT ON BACTERIAL CELLULOSE SYNTHESIS BY MEDUSOMYCES GISEVII

Gladysheva E.K.

*Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian
Academy of Sciences (IPCET SB RAS), Biysk, e-mail: evg-gladyшева@yandex.ru*

Biosynthesis of microbial cellulose in a synthetic glucose broth by using the symbiotic culture *Medusomyces gisevii* in a temperature range of 21 to 36 °C was studied. The optimum temperature for the biosynthesis of microbial cellulose by the *Medusomyces gisevii* culture was found to be between 24 and 27 °C; departure from the optimum causes the cellulose-synthetic capability to decrease. It was noted that temperature optima for the vital activity of *Medusomyces gisevii* and for the biosynthesis of bacterial cellulose are at variance; a rise in cultivation temperature results in intensified synthesis of organic acids, the bacterial cellulose yield decreasing. The degree of polymerization of bacterial cellulose was established to decline in inverse proportion to increasing cultivation temperature. The bacterial cellulose samples obtained within the said temperature range were shown to have identical infrared spectra.

Keywords: bacterial cellulose, temperature, *Medusomyces gisevii*, degree of polymerization, IR spectroscopy

В настоящее время не только за рубежом [11], но и в России широко ведутся исследования свойств, получения и применения бактериальной целлюлозы (БЦ). На основе бактериальной целлюлозы получены карбоксиметильные производные с высокой степенью замещения [4]. Выделены новые эффективные целлюлозосинтезирующие штаммы [5]. Исследовано применение БЦ в целлюлозно-бумажной промышленности [6].

Процесс получения БЦ длительный и сложный, при этом выход целлюлозы низкий, что обусловлено биохимизмом процесса – для микроорганизмов-продуцентов синтез БЦ не является целевым. Изучение влияния различных условий культивирования продуцента на синтез БЦ проводится с целью повышения ее выхода. Основные параметры, влияющие на рост целлюлозосинтезирующих бактерий и образование БЦ – аэрация, температура культивирования, концентрация источника углерода, со-

став питательной среды, солнечный свет. Реакция микроорганизмов на эти факторы объясняется явлениями индукции и репрессии синтеза ферментов, в результате которых изменяется морфология клеток и их биосинтетическая способность [11].

Для каждого продуцента и конкретного штамма необходимо уточнять технологические параметры, основным из них является температура. Изучение влияния температуры на синтез БЦ продуцентом *Acetobacter sp.A9* на среде Хестрима – Шреммана приведено в работе [13]. Для данного штамма оптимальной температурой для синтеза БЦ является 30 °С, снижение температуры культивирования до 25 °С несущественно снижает выход БЦ по сравнению с 30 °С, однако увеличение температуры культивирования до 35 °С значительно снижает выход БЦ. Температура культивирования влияет не только на выход, но и на физико-химические свойства БЦ, а именно строение и кристаллическую структуру. Установ-

лено, что в образцах БЦ, синтезированных штаммом *Acetobacter xylinum* ATCC 23769, при температуре 4 °С преобладает триклинная модификация Iβ [10], характерная для растительной целлюлозы [1]. При культивировании данного штамма при температуре 28 °С в образцах преобладает низкосимметричная метастабильная фаза Ia. Исследовано влияние температуры на выход БЦ, полученной с использованием продуцента *Komagataebacter xylinum* ATCC 53524 [12], и степень полимеризации полученных образцов БЦ. Структура полученных образцов БЦ исследована методом инфракрасной спектроскопии. Установлено, что для данного штамма оптимальной температурой для синтеза БЦ является 33 °С, температура не влияет на степень полимеризации полученных образцов БЦ, при культивировании при более высоких температурах в образцах БЦ преобладает триклинная модификация.

Ранее детально изучалось влияние температуры на рост и жизнедеятельность симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* [8]. Продуцент *Medusomyces gisevii* представляет собой симбиотическую культуру, состоящую из 20–26 видов дрожжей и 8–10 уксуснокислых бактерий. *Medusomyces gisevii* может использоваться как для синтеза БЦ [9], так и для получения освежающего, слегка газированного напитка [7]. Установлено, что оптимальной является температура в диапазоне 25–30 °С. В настоящее время изучено влияние озонирования на содержание этилового спирта в культуральной жидкости *Medusomyces gisevii* при разных температурных режимах культивирования [3]. В данной работе не выявлено существенного влияния озона на количественные показатели этилового

спирта, однако установлено, что при повышении температурных режимов его концентрация в питательной среде значительно снижается.

Целью данной работы является изучение влияния температуры на синтез БЦ продуцентом *Medusomyces gisevii* и исследование структуры полученных образцов.

Материалы и методы исследования

В качестве инокулята использовалась семидневная культура, выращенная на синтетической глюкозной среде, доза внесения составляла 10%. В экспериментах также использовалась синтетическая питательная среда, приготовленная растворением глюкозы в экстракте черного чая. Начальная концентрация субстрата составила 20 г/л, уровень активной кислотности саморегулировался симбиозом [2]. Культивирование проводилось в статических условиях при температурах от 21 до 36 °С с шагом 3 °С в течение 24 суток. Снижение концентрации глюкозы контролировалось спектрофотометрически (спектрофотометр «UNICO UV-2804», США) с использованием динитросалицилового реактива, уровень активной кислотности контролировался с помощью иономера (иономер И-160 МИ), прирост пленки БЦ оценивался гравиметрически (весы лабораторные аналитические Explorer EX-224).

Образцы пленок были очищены с помощью суточного выдерживания в разбавленных растворах гидроксида натрия и соляной кислоты с последующим промыванием в дистиллированной воде до нейтральной реакции среды. Прозрачные гель-пленки, высушивались на воздухе при комнатной температуре в расправленном состоянии.

В полученных образцах определена степень полимеризации по стандартной методике, которая основана на определении времени истечения из капиллярного вискозиметра разбавленных растворов целлюлозы и растворителя (кадоксена). Структура бактериальной целлюлозы была исследована на инфракрасном спектрофотометре «Инфралюм ФТ-801» в таблетках KBr.

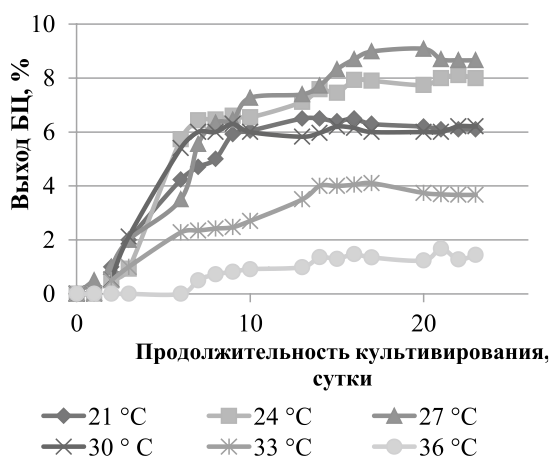


Рис. 1. Зависимость выхода БЦ от температуры культивирования

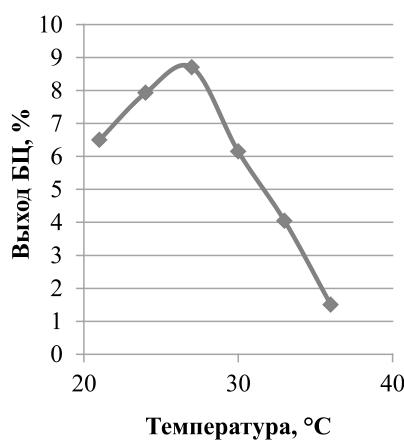


Рис. 2. Зависимость выхода БЦ от температуры на 16-е сутки культивирования

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 представлена зависимость выхода БЦ от различных температурных режимов культивирования, на рис. 2 – зависимость выхода БЦ от температуры на 16-е сутки культивирования.

Рост гель-пленок БЦ происходит до 16 суток, далее наблюдается стационарная фаза и после 20-х суток – деградация БЦ. Температура от 24 до 27°C наиболее благоприятна для синтеза БЦ, так как обеспечивает наибольший выход – 9%. При температуре 30°C и выше отмечается значительное снижение выхода БЦ: например при 36°C выход составляет 1,5%, что в 6 раз ниже, чем при 27°C. Вероятно, при температуре выше 30°C начинают происходить конформационные изменения ферментов, входящих в целлюлозосинтезирующий энзимный комплекс. Температура ниже 24°C является недостаточной, так при 21°C выход БЦ снижается и составляет 6,5%, это явление может быть объяснено правилом Вант-Гоффа: при изменении температуры на каждые 10 градусов скорость большинства реакций изменяется в 2–4 раза.

В табл. 1 представлены данные по изменению концентрации редуцирующих веществ

в процессе культивирования *Medusomyces gisevii* при разных температурах.

В исследованном диапазоне температур скорость убыли редуцирующих веществ при культивировании *Medusomyces gisevii* тем больше, чем выше температура, т.е. температурные оптимумы для утилизации субстрата и для синтеза БЦ не совпадают.

На рис. 3 представлено изменение уровня активной кислотности при культивировании *Medusomyces gisevii* при разных температурах.

Повышение температуры от 21 до 36°C при культивировании симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* приводит к снижению уровня активной кислотности в обратно пропорциональной зависимости. Снижение уровня активной кислотности свидетельствует об образовании таких метаболитов, как уксусная, янтарная, глюконовая, молочная и яблочная кислоты [8]. Концентрация кислот возрастает прямо пропорционально повышению температуры культивирования в исследуемом диапазоне. Это не противоречит повышению скорости утилизации субстрата, таким образом, при повышении температуры выше 30°C снижение выхода БЦ объяснено расходом субстрата на биосинтез кислот.

Таблица 1
Снижение концентрации редуцирующих веществ при культивировании *Medusomyces gisevii*

Температура, °C	Продолжительность, сутки											
	0	1	2	3	6	7	10	13	15	17	20	24
21	20,0	20,0	16,2	12,8	4,9	3,8	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
24	20,0	20,0	16,4	12,0	3,2	2,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
27	20,0	20,0	15,4	10,0	3,2	1,8	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
30	20,0	18,9	12,2	8,4	3,1	2,1	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
33	20,0	19,8	12,0	6,0	3,1	2,0	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
36	20,0	18,8	13,1	3,0	1,5	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3

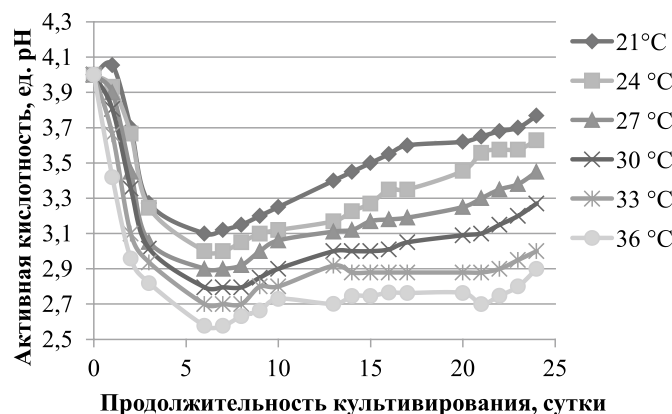


Рис. 3. Изменение уровня активной кислотности при культивировании *Medusomyces gisevii*

Таблица 2

Степень полимеризации образцов бактериальной целлюлозы, синтезированных при различных температурах

Температура, °C	21	24	27	30	33	36
Степень полимеризации	2470	2880	2600	2200	2000	1390

Таблица 3

Отнесение полос поглощения функциональных групп в образцах бактериальной целлюлозы

Отнесение полос поглощения*	Максимум полосы поглощения, см ⁻¹					
	21 °C	24 °C	27 °C	30 °C	33 °C	36 °C
ν OH-групп, участвующих в межмолекулярных и внутримолекулярных H-связях	3426	3424	3429	3419	3423	3354
ν связей в группах CH и CH ₂	2919	2918	2920 2854	2896	2896	2897
δ связей HOH обусловлено присутствием прочно связанной воды	1654	1654	1654 1638	1654 1540	1639 1541	1631
δ групп CH ₂	1430 1373	1430 1373	1430 1375	1429 1372	1429 1372	1429 1371
δ групп OH в CH ₂ OH	—	1320	—	1337 1318	1337 1318	1337 1318
δ групп CH ₂ в CH ₂ OH	1282 1235	1282 1235	1282 1235	1281 1235	1281 1235	1281 1235
δ групп OH	—	1201	—	1205	1204	1204
ν связей C-O (характерные для полисахаридов полосы, обусловленные наличием ацетильных связей C-O-C и связей C-O в спиртах)	1060	1165 1059	1165 1060	1166 1113 1058	1166 1059	1164 1112 1060
β -1,4 связи	898	898	899	899	898	898

* ν – валентные колебания, δ – деформационные колебания, БЦ – бактериальная целлюлоза

Степень полимеризации образцов БЦ, синтезированных при различных температурах, на 10-е сутки культивирования, представлена в табл. 2.

Наибольшую степень полимеризации имеет образец, синтезированный при температуре 24 °C. При температурах выше 24 °C степень полимеризации снижается. Обнаруженная зависимость имеет нелинейный характер и сопоставима с зависимостью выхода БЦ от температуры. Таким образом, установлено, что условия культивирования влияют на свойства конечного продукта. Полученные данные раскрывают возможность контролировать процесс биосинтеза БЦ и получать материал с заданными свойствами.

Методом инфракрасной спектроскопии была установлена структура бактериальной целлюлозы. Сравнение полос поглощения функциональных групп в образцах бактериальной целлюлозы, полученных при различных температурах на 10-е сутки культивирования, представлено в табл. 3.

Интенсивная полоса 3200–3600 см⁻¹ обусловлена валентными колебаниями OH-групп. Менее интенсивная полоса в области

2800–3000 см⁻¹ обусловлена валентными колебаниями групп CH₂, CH. Ряд полос различной интенсивности в диапазоне 2000–1500 см⁻¹ – чувствителен к химическим и структурным превращениям. Полосы поглощения в области 1000–1200 см⁻¹ обусловлены в основном валентными колебаниями C-O-C и C-O в спиртах. Полоса при 899 см⁻¹ подтверждает наличие β -1,4 связей [14]. Спектральные характеристики образцов БЦ, синтезированных в исследуемом диапазоне температур, идентичны.

Выводы

Исследован биосинтез БЦ на синтетической глюкозной среде с использованием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* в интервале температур от 21 до 36 °C. Установлено, что для синтеза БЦ культурой *Medusomyces gisevii* оптимальным является температурный диапазон от 24 до 27 °C, отклонения от оптимума вызывают снижение целлюлозосинтетической способности. Отмечено, что температурные оптимумы для жизнедеятельности *Medusomyces gisevii* и для биосинтеза БЦ не совпадают, повышение температуры куль-

тивирования приводит к интенсификации синтеза органических кислот. Установлено, степень полимеризации БЦ снижается обратно пропорционально повышению температуры культивирования. Показано, что инфракрасные спектры образцов БЦ, полученных в исследуемом диапазоне температур, идентичны.

Список литературы

1. Алешина Л.А., Глазкова С.В., Луговская Л.А., Подойникова М.В., Фофанов А.Д., Силина Е.В. Современные представления о строении целлюлоз (обзор) // Химия растительного сырья. – 2001. – № 1. – С. 5–35.
2. Гладышева Е.К., Скиба Е.А. Биосинтез бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* // Вестник ВГУИТ. – 2015. – № 3. – С. 149–156.
3. Добрыня Ю.М., Бондарева Н.И., Аванесян С.С., Тимченко Л.Д., Симечёва Е.И., Ржепаковский И.В. Влияние озонирования на содержание этилового спирта в культуральной жидкости *Medusomyces gisevii* (чайный гриб) при разных температурных режимах культивирования // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 7–3. – С. 454–457.
4. Кезина Е.В., Парчайкина О.В., Кадималиев Д.А., Ревин В.В., Котина Е.А. Получение карбоксиметильных производных бактериальной целлюлозы с высокой степенью замещения // Актуальная биотехнология. – 2014. – № 3. – С. 37.
5. Петухова Н.И., Колобова С.А., Назмутдинова Р.Р., Зорин В.В. Синтез целлюлозы изолятами уксуснокислых бактерий из «Чайного гриба» // Башкирский химический журнал. – 2016. – Т. 33, № 1. – С. 7–13.
6. Смирнова Е.Г. Повышение устойчивости бумаги к старению формированием ее композиционного состава: дис...докт. тех. наук: 05.21.03 / Смирнова Екатерина Григорьевна. – Санкт-Петербург, 2014. – 32 с.
7. Федорова Р.А., Головинская О.В. О возможности использования *Medusomyces gisevii* при производстве пшеничного хлеба // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2010. – № 19. – С. 60–64.
8. Юркевич Д.И., Кутышенко В.П. Медузомицет (Чайный гриб): научная история, состав, особенности физиологии и метаболизма // Биофизика. – 2002. – № 6. – С. 1116–1129.
9. Goh W.N., Rosma A., Kaur B., Fazilah A., Karim A.A., Rajeev B. Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose // International Food Research Journal. – 2012. – № 19 (1). – P. 109–117.
10. Hirai A., Tsuji M. and Horii F. Culture conditions producing structure entities composed of Cellulose I and II in bacterial cellulose // Cellulose. – 1997. – № 4. – P. 239–245.
11. Koon-Yang Lee, Gizem Buldum, Anthanasios Mantalaris, Alexander Bismarck. More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites // Macromolecular Bioscience. – 2014. – № 6. – P. 10–32.
12. Paavo A. Penttila, Junji Sugiyama, Tomoya Imai. Effects of reaction conditions on cellulose structures synthesized in vitro by bacterial cellulose synthases // Carbohydrate Polymers. – 2016. – № 136. – P. 656–666.
13. 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* // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2001. – Vol. 33, № 1. – P. 1–5.
14. Xueqiong Yin, Changjiang Yu, Xiaoli Zhang, Jianxin Yang, Qiang Lin, Jinbang Wang, Qingmei Zhu. Comparison of succinylation methods for bacterial cellulose and adsorption capacities of bacterial cellulose derivatives for Cu^{2+} ion // Polymer Bulletin. – 2011. – № 67. – P. 401–412.