

УДК 547.88 : 663.1

МИСКАНТУС – СЫРЬЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

© 2020 г. академик Г. В. Сакович¹, Е. А. Скиба¹, Е. К. Гладышева¹, Д. С. Голубев¹, В. В. Будаева^{1,*}

Поступило 21.08.2020 г.

После доработки 13.10.2020 г.

Принято к публикации 21.10.2020 г.

Использован мискантус, выращенный в условиях интродукции Западной Сибири. Впервые показана возможность трансформации мискантуса в бактериальную наноцеллюлозу. Установлено, что микробиологический синтез бактериальной наноцеллюлозы с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* Sa-12 позволяет получить химически чистую бактериальную наноцеллюлозу с исключительно высокими значениями индекса кристалличности и содержания алломорфа Ia.

Ключевые слова: мискантус, *Medusomyces gisevii* Sa-12, бактериальная наноцеллюлоза, физико-химические характеристики

DOI: 10.31857/S2686953520060138

Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ) является химически чистой целлюлозой с уникальной наноархитектурой фибрилл, благодаря чему приобретает ряд специфических свойств, не характерных для целлюлозы растительного происхождения (высокая влагоудерживающая способность, прозрачность, проницаемость для газов и жидкостей, высокая механическая прочность и т.д.). Поэтому БНЦ востребована в различных отраслях, как традиционных для растительной целлюлозы (целлюлозно-бумажная и химическая промышленность), так и новейших (биотехнологическая промышленность, биомедицина, электроника, получение композиционных материалов) [1–4]. Потребность в БНЦ в глобальных масштабах оценивается в 504 т в год [1].

При производстве БНЦ стоимость питательной среды может достигать 65% от общей стоимости процесса [5]. Поэтому замена дорогостоящих синтетических питательных сред на питательные среды из дешевого целлюлозосодержащего сырья (сельскохозяйственных и лесосечных отходов, быстрорастущих растений, отходов целлюлозно-бумажных и текстильных производств) является востребованным мировым технологическим трендом [2, 3].

Потенциальное целлюлозосодержащее сырье для массового биотехнологического производ-

ства должно отвечать критериям доступности, низкой стоимости, ежегодной возобновляемости, стабильности химического и микробиологического состава [2]. В этой связи перспективным источником целлюлозосодержащего сырья для производства БНЦ может стать быстрорастущее растение мискантус. Несмотря на востребованность мискантуса в мире в контексте циркулярной экономики (экономике замкнутого цикла) [6, 7], его использование для получения БНЦ впервые было предложено нами [8, 9] и других примеров в мировой литературе нет. Это высокопродуктивное, простое в агротехнике, устойчивое к заболеваниям растение, которое может успешно выращиваться на бедных почвах в условиях рискованного земледелия, включая континентальную Сибирь [10]. При однократной посадке ежегодно дает стабильные урожаи от 10 до 20 т га⁻¹ в течение 15–20 лет [8, 9].

Обоснование технологической схемы превращений целлюлозосодержащего сырья в БНЦ была нами отработана на шелухе овса [11] и в настоящей работе эта схема использована в экспериментальной части для трансформации мискантуса.

Мискантус подвергали двухстадийной химической обработке 4.0%-ми растворами гидроксида натрия и азотной кислоты с получением технической целлюлозы. Далее проводили ферментативный гидролиз технической целлюлозы при начальной концентрации субстрата 30.0 г л⁻¹. Ферментативный гидролизат отфильтровывали, стандартизировали по концентрации редуцирующих веществ (РВ) – 20.0 г л⁻¹, так как именно при данной концентрации достигается наибольший

¹ Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской Академии наук, Бийск, Россия

*E-mail: budaeva@ipcet.ru

Таблица 1. Химический состав мискантуса и технической целлюлозы из него

Показатели	Мискантус	Техническая целлюлоза
М. д.* α -целлюлозы, %	49.6 \pm 0.2	90.6 \pm 0.3
М. д. кислотонерастворимого лигнина, %	20.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
М. д. золы, %	5.4 \pm 0.05	1.4 \pm 0.05
М. д. пентозанов, %	22.7 \pm 0.2	6.4 \pm 0.1

* м. д. – массовая доля.

выход БНЦ [12], и использовали в качестве питательной среды.

В качестве продуцента БНЦ использовали симбиотическую культуру *Medusomyces gisevii* Sa-12, концентрация инокулята составила 10.0 об. %. Биосинтез БНЦ проводили стационарным способом в суховоздушном термостате. После завершения культивирования гель-пленки БНЦ отделяли от культуральной среды и промывали разбавленным раствором гидроксида натрия до жемчужно-белого окрашивания, затем проводили декатионирование соляной кислотой [12].

Определение химического состава мискантуса и технической целлюлозы, полученной из него, а также степени полимеризации БНЦ проводили по стандартным методикам [13].

Концентрацию РВ в пересчете на глюкозу определяли с помощью спектрофотометра UNICO UV-2804 (США). Использовали реактив на основе 3,5-динитросалициловой кислоты (Pangras, Испания). Концентрацию пентоз в пересчете на ксилозу определяли с использованием железорсинькового реактива (орсинол моногидрат 99.0%, CAS 6153-39-5; Acros Organics, США).

Выход БНЦ рассчитывали как отношение массы БНЦ, высушенной на воздухе, (весы лабораторные аналитические Explorer EX-224, США) к начальной концентрации редуцирующих веществ в среде. Морфология БНЦ исследована методом

сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с помощью микроскопа JSM-840 (Япония). Прочность БНЦ определяли на термомеханическом анализаторе TMA-60 (Shimadzu, Япония), исследуемый образец растягивался со скоростью 5.0 г мин⁻¹ от 0.0 г до максимальной нагрузки 400.0 г до разрыва, температура проведения опыта 23.0 \pm 2°C.

Рентгеноструктурный анализ (РСА) проводили на дифрактометре ДРОН-6 (Буревестник, Россия). Спектральные характеристики рентгенограмм рассчитывались в программном комплексе PdWin [14]. Подробно методика расчета размеров индекса кристалличности и методика полнопрофильного анализа описаны в [8].

Химический состав мискантуса и технической целлюлозы из него представлены в табл. 1.

По данным табл. 1 предварительная химическая обработка мискантуса приводит к увеличению содержания целлюлозы в 1.8 раза, снижению содержания кислотонерастворимого лигнина в 35 раз, золы – в 3.9 раза, пентозанов – в 3.5 раза.

После ферментативного гидролиза выход РВ составил 81.0% от массы технической целлюлозы, концентрация РВ составила 27.0 г л⁻¹. После стандартизации полученная питательная среда содержала 20.6 г л⁻¹ глюкозы и 0.6 г л⁻¹ ксилозы.

Через 8 суток выход БНЦ достиг 5.7% и далее не изменялся. Аналогичная зависимость зафиксирована при получении БНЦ из плодовых оболочек овса аналогичным способом [11], при этом выход БНЦ составлял 4.8%. Переход на мискантус позволил немного увеличить выход БНЦ (в 1.2 раза), однако, это ниже, чем при использовании полусинтетической глюкозной среды, когда выход составил 9.0% [12].

На рис. 1 представлены микрофотографии образцов БНЦ, полученные из мискантуса и плодовых оболочек овса, по сравнению с контрольным образцом из глюкозы. Во всех случаях получено характерное именно для БНЦ неупорядоченное трехмерное переплетение микрофибрилл БНЦ

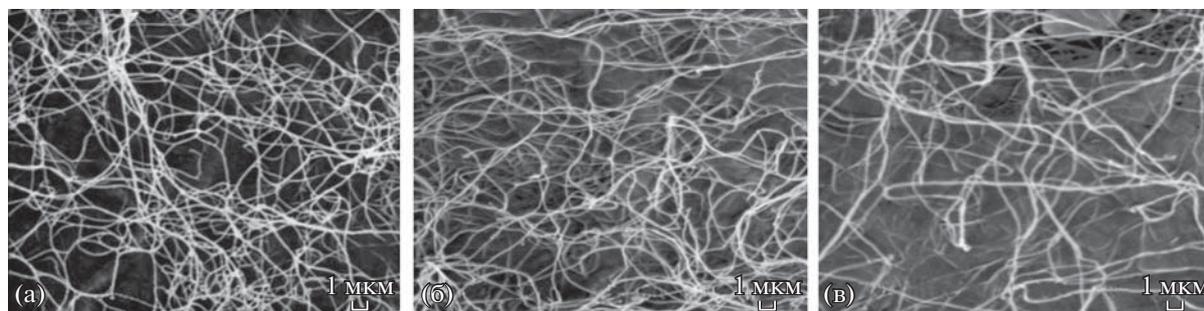
**Рис. 1.** Микрофотографии образцов БНЦ, полученных из мискантуса (а) и плодовых оболочек овса (б) по сравнению с контрольным образцом из глюкозы (в); СЭМ, увеличение \times 5000.

Таблица 2. Физико-химические характеристики образцов БНЦ, полученных из мискантуса (образец 1) и плодовых оболочек овса (образец 2) по сравнению с контрольным образцом из глюкозы

Характеристика	Образец 1	Образец 2 [11]	Контроль [12]
Степень полимеризации БНЦ через 7 суток биосинтеза	1800	2010	4800
Прочностные характеристики			
Прочность при разрыве, МПа	25.4	45.3	33.2
Условный предел текучести, МПа	3.0	4.4	5.6
Относительное удлинение при максимальной нагрузке, %	1.8	1.7	1.5
Относительное удлинение при пределе текучести, %	0.5	0.8	0.6
Модуль Юнга, МПа	640.0	550.0	933.0
Концентрации алломорфов целлюлозы и индекс кристалличности, определенные методом РСА			
I α алломорф, %	100.0	99.0	98.0
I β алломорф, %	0.0	1.0	2.0
Индекс кристалличности, %	85.0	88.0	86.0

[1], значимых отличий между образцами не выявлено.

При получении БНЦ на гидролизных средах можно отметить снижение степени полимеризации в 2.5 раза по сравнению с глюкозной средой (табл. 2). Тем не менее, значения степени полимеризации всех образцов БНЦ соответствуют средним показателям в мировой литературе: 300–10000 [1]. Также модуль Юнга образца БНЦ из мискантуса ниже, чем модуль Юнга контрольного образца в 1.5 раза, но выше, чем образца БНЦ из плодовых оболочек овса в 1.2 раза. Это вполне закономерно, так как модуль Юнга зависит от толщины образца, то есть по сути, от выхода БНЦ. В мировой литературе приведены как более высокие (15–138 ГПа [1]), так и более низкие значения данного показателя (10–17 МПа [15]).

Интересно, что структура всех образцов БНЦ, исследованная методом РСА, оказалась идентичной. Концентрация алломорфа I α составила 98–100%, а индекс кристалличности составил 85–88%, что менее погрешности определения ($\pm 5\%$). Идентичность структурных показателей свидетельствует о том, что, независимо от используемого сырья, культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 способна синтезировать БНЦ стандартного качества. При этом, БНЦ характеризуется экстраординарно высокими содержанием алломорфа I α и степенью кристалличности. В мировой литературе содержание алломорфа I α варьирует от 64.0% до 90.0% [1], а степень кристалличности от 46.0% до 95.6% [3].

Таким образом, показана возможность трансформации мискантуса в бактериальную наноцеллюлозу, характеризующуюся 100%-м соответствием структуры алломорфу I α и высоким индексом кристалличности равным 85.0%. Полученные данные могут стать основой для разработки техноло-

гии биосинтеза БНЦ с последующим созданием крупномасштабного производства.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при использовании оборудования Бийского регионального центра коллективного пользования СО РАН (Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, г. Бийск, Россия).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Потенциальные и явные конфликты интересов, связанные с рукописью, отсутствуют.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gama M., Dourado F., Bielecki S., eds.* Bacterial Nanocellulose from biotechnology to bio-economy / Amsterdam: Elsevier, 2016. 240 p. <https://www.elsevier.com/books/bacterial-nanocellulose/gama/978-0-444-63458-0?aaref=https%3A%2F%2Fyandex.ru%2F>
2. *Hussain Z., Sajjad W., Khan T., Wahid F.* Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. // *Cellulose*. 2019. V. 26. № 5. P. 2895–2911. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02307-1>
3. *Velásquez-Riaño M., Bojacá V.* Production of bacterial cellulose from alternative low-cost substrates // *Cellulose* 2017. V. 24. P. 2677–2698. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1309-7>
4. *Рубина М.С., Пигалева М.А., Бутенко И.Е., Будников А.В., Наумкин А.В., Громовых Т.И., Луценко С.В., Васильков А.Ю.* Эффект взаимодействия бактериальной целлюлозы с наночастицами золота, полу-

- ченными методом металло-парового синтеза // ДАН. 2019. Т. 488. № 4. С. 391-396.
<https://doi.org/10.31857/S086956524884391396>
5. Jozala A.F., Pértile R.A.N., Santos C.A., Carvalho Santos-Ebinuma V., Seckler M.M., Gama F.M., Pessoa A., Jr. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015. V. 99. P. 1181–1190.
<https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3>
 6. Xue S., Lewandowski I., Wang X., Yi Z. Assessment of the production potentials of *Miscanthus* on marginal land in China // Renew. Sust. Energ. Rev. 2016. V. 54. P. 932–943.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.040>
 7. Ben Fradj N., Rozakis S., Borzęcka M., Matyka M. *Miscanthus* in the European bio-economy: A network analysis // Ind. Crop. Prod. 2020. V. 148. P. 112281.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112281>
 8. Aleshina L.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V., Golubev D.S., Skiba E.A., Sakovich G.V. X-ray diffraction study of bacterial nanocellulose produced by *Medusomyces gisevii* Sa-12 cultured in enzymatic hydrolysates of *miscanthus* // Crystallogr. Rep. 2019. V. 64. № 6. P. 914–919.
<https://doi.org/10.1134/S1063774519060026>
 9. Kashcheyeva E.I., Gismatulina Y.A., Budaeva V.V. Pre-treatments of non-woody cellulosic feedstocks for bacterial cellulose synthesis // Polymers. 2019. V. 11. № 10. P. 1645.
<https://doi.org/10.3390/polym11101645>
 10. Дорогина О.В., Васильева О.Ю., Нурждина Н.С., Буглова Л.В., Гисматулина Ю.А., Жмудь Е.В., Зуева Г.А., Комина О.В., Цыбченко Е.А. Ресурсный потенциал некоторых видов рода *Miscanthus anderss.* в условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 5. С. 553-559.
<https://doi.org/10.18699/VJ18.394>
 11. Sakovich G.V., Skiba E.A., Budaeva V.V., Gladysheva E.K., Aleshina L.A. Technological fundamentals of bacterial nanocellulose production from zero prime-cost feedstock // Dokl. Biochem. Biophys. 2017. V. 477. № 1. P. 357-359.
<https://doi.org/10.1134/S1607672917060047>
 12. Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V. Study of the conditions for the biosynthesis of bacterial cellulose by the producer *Medusomyces gisevii* Sa-12 // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 2. P. 179–187.
<https://doi.org/10.1134/S0003683818020035>
 13. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы / Москва: Экология, 1991. С. 71–168.
 14. Ahvenainen P., Kontro, I., Svedström K. Comparison of cellulose crystallinity determination methods // Cellulose. 2016. V. 23. P. 1073–1086.
<https://doi.org/10.1007/s10570-016-0881-6>
 15. Abol-Fotouh D., Hassan M.A., Shokry H., Roig A., Azab M.S., Kashyout A.B. Bacterial nanocellulose from agro-industrial wastes: low-cost and enhanced production by *Komagataeibacter saccharivorans* MD1 // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 3419.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-60315-9>

MISCANTHUS IS THE FEEDSTOCK FOR BACTERIAL NANOCELLULOSE PRODUCTION

Academician of the RAS G. V. Sakovich^a, E. A. Skiba^a, E. K. Gladysheva^a,
 D. S. Golubev^a, and V. V. Budaeva^{a,#}

^a Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
 Biysk, Russian Federation

[#]E-mail: budaeva@ipcet.ru

Miscanthus introduced to and grown in West Siberia was used herein. The possibility of transformation of *miscanthus* into bacterial nanocellulose has been shown for the first time. It has been established that microbiological synthesis of bacterial nanocellulose using a symbiotic culture of *Medusomyces gisevii* Sa-12 makes it possible to obtain chemically pure bacterial nanocellulose with exceptionally high values of the crystallinity index and the content of allomorph Ia.

Keywords: *miscanthus*, *Medusomyces gisevii* Sa-12, bacterial nanocellulose, physicochemical characterization