ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. ХИМИЯ, НАУКИ О МАТЕРИАЛАХ, 2020, том 495, с. 42–45

ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 547.88 : 663.1

МИСКАНТУС – СЫРЬЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

© 2020 г. академик Г. В. Сакович[1], Е. А. Скиба[1], Е. К. Гладышева[1], Д. С. Голубев[1], В. В. Будаева[1,*]

Поступило 14.10.2020 г.
После доработки 30.10.2020 г.
Принято к публикации 02.11.2020 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 Iα.

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 производства 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 (экономики 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 было нами отработано 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 ± 0.2	90.6 ± 0.3
М. д. кислотонерастворимого лигнина, %	20.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1
М. д. золы, %	5.4 ± 0.05	1.4 ± 0.05
М. д. пентозанов, %	22.7 ± 0.2	6.4 ± 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 (Panreac, Испания). Концентрацию пентоз в пересчете на ксилозу определяли с использованием железоорсинового 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 ± 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 содержаний 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 сут 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

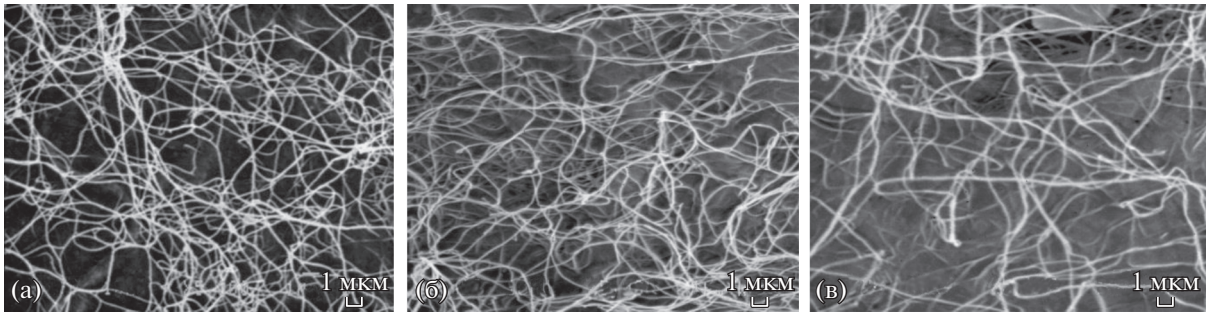

Рис. 1. Микрофотографии образцов БНЦ, полученных из мискантуса (а) и плодовых оболочек овса (б) по сравнению с контрольным образцом из глюкозы (в); СЭМ, увеличение ×5000.

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 сут 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			
Iα алломорф, %	100.0	99.0	98.0
Iβ 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, т.е. 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 Iα составила 98–100%, а индекс кристалличности составил 85–88%, что менее погрешности определения (±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 Iα и степенью кристалличности. В мировой литературе содержание алломорфа Iα 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 Iα и высоким индексом кристалличности, равным 85.0%. Полученные данные могут стать основой для разработки технологии 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 / Amsterdsm: 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.* Pretreatments 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., Нуждина 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.* Comparision 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 Iα.

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