

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.124.5:548.734

РЕЗУЛЬТАТЫ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ, СИНТЕЗИРОВАННОЙ ПРОДУЦЕНТОМ *Medusomyces* *Gisevii* Sa-12 НА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТАХ МИСКАНТУСА

© 2019 г. Л. А. Алешина^{1,*}, Е. К. Гладышева², В. В. Будаева^{2,**}, Д. С. Голубев^{2,3},
Е. А. Скиба², Г. В. Сакович²

¹Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

²Институт проблем химико-энергетических технологий СО РАН, Бийск, Россия

³Бийский технологический институт (филиал) ФГБОУ ВО «Алтайский государственный
технический университет им. И.И. Ползунова», Бийск, Россия

*E-mail: alkfit@mail.ru

**E-mail: budaeva@ipcet.ru

Поступила в редакцию 30.01.2019 г.

После доработки 30.01.2019 г.

Принята к публикации 25.02.2019 г.

Представлены результаты рентгеноструктурного анализа бактериальной наноцеллюлозы, синтезированной продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12 на ферментативных гидролизатах мискантуса. Определены характеристики надмолекулярной структуры кристаллической составляющей образцов: степень кристалличности, размеры и форма элементарных фибрилл. Проведена оценка соответствия атомной структуры известным моделям строения целлюлозы и установлено, что синтезированная бактериальная наноцеллюлоза является целлюлозой I α . Определены периоды и углы триклинной элементарной ячейки. Установлено, что состав питательных сред ферментативных гидролизатов мискантуса оказывает влияние на форму и размер элементарных фибрилл и не оказывает влияния на степень кристалличности и содержание алломорфа I α . Использование продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12 позволяет получить бактериальную наноцеллюлозу с высокой степенью кристалличности в диапазоне 86–93% и с преимущественным содержанием алломорфа I α .

DOI: 10.1134/S002347611906002X

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что индекс кристалличности целлюлозы и соотношение кристаллических фаз I α и I β в природной целлюлозе зависят от ее происхождения, видов последующей обработки, степени полимеризации, а также от молекулярных водородных связей внутри и между цепями биополимера [1–3]. Бактериальная наноцеллюлоза (БНЦ), секретируемая различными бактериями родов *Acetobacter*, *Acanthamoeba* и *Achromobacter* spp., отличается от растительной целлюлозы высокой степенью чистоты, ультратонкой структурой микрофибрилл с высокой степенью кристалличности и в то же время содержит в своей структуре равномерно распределенную воду, образуя устойчивый гидрогель в процессе биосинтеза. Как и растительная целлюлоза, БНЦ относится к целлюлозе I, в которой два целлобиозных фрагмента расположены параллельно (или антипараллельно) в элементарной ячейке, но в отличие от растительной она преимущественно содержит алломорф I α [1, 4].

В связи с повышением спроса на БНЦ в различных отраслях промышленности [5] исследователи в мировых научных центрах ищут подходы к удешевлению стоимости питательной среды за счет замены синтетической среды для биосинтеза БНЦ гидролизатами дешевого целлюлозосодержащего сырья [6, 7]. Результаты исследования методом рентгеноструктурного анализа показывают, что замена среды для биосинтеза приводит к изменению структурных характеристик БНЦ [8–12], так что в каждом конкретном случае необходим контроль структурного состояния получаемого объекта. Целью настоящей работы было определение структурных характеристик БНЦ, синтезированной продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12 на ферментативных гидролизатах энергетического растения – мискантуса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мискантус сорта Сорановский, выращенный на экспериментальной плантации ИПХЭТ СО

РАН (Бийск), подвергался химической обработке в стандартном емкостном оборудовании объемом 250 л при атмосферном давлении в опытном производстве ИПХЭТ СО РАН по авторским методикам [13–17]. В качестве химических реактивов использовали разбавленные 4%-ные растворы азотной кислоты и гидроксида натрия. Химическую обработку осуществляли четырьмя способами. Применяли: одностадийную обработку азотной кислотой с получением продукта азотнокислой обработки (ПАО) [13, 14]; дальнейшую обработку ПАО гидроксидом натрия с получением технической целлюлозы азотнокислым способом (ТЦ АС) [15]; одностадийную обработку гидроксидом натрия с получением продукта щелочной делигнификации (ПЩД) [16, 17]; дальнейшую обработку ПЩД азотной кислотой с получением технической целлюлозы комбинированным способом (ТЦ КС) [17].

Продукты, полученные после химической обработки мискантуса, подвергались ферментативному гидролизу, условия которого были одинаковы для четырех видов субстратов и подробно описаны в [18]. Полученные ферментативные гидролизаты стандартизировали по глюкозе путем разбавления их водой до содержания глюкозы 20–25 г/л, обеспечивающей наибольший выход БНЦ. Гидролизаты, отфильтрованные от остатков субстратов, были использованы в качестве экстрагентов черного байхового чая. Черный байховый чай вносили при 100°C в количестве 10 г/л для получения готовых питательных сред с концентрацией экстрактивных веществ чая 3.2 г/л [19]. Готовые питательные среды отфильтровывали от остатков чая и использовали для биосинтеза БНЦ.

Биосинтез БНЦ на полученных питательных средах проводился в оптимальных условиях, установленных в [19]: температура 27°C, продолжительность 7 сут, стационарные условия. В качестве продуцента использовали симбиотическую культуру *Medusomyces gisevii* Sa-12, доза инокулята составила 10%.

Промывку образцов БНЦ от компонентов питательной среды и клеток осуществляли поэтапно, обрабатывая раствором 2%-ного гидроксида натрия и 0.1%-ным раствором разбавленной соляной кислоты с последующей промывкой дистиллированной водой. Гель-пленки БНЦ высушивали в развернутом состоянии при комнатной температуре.

Таким образом, были синтезированы образцы БНЦ четырех типов: ферментативный гидролизат ПАО мискантуса (образец 1), ферментативный гидролизат ТЦ АС мискантуса (образец 2), ферментативный гидролизат ПЩД мискантуса (образец 3), ферментативный гидролизат ТЦ КС мискантуса (образец 4).

Дифрактограммы образцов БНЦ получены в геометрии на отражение и прохождение (просвет) на дифрактометре ДРОН-6 в интервале углов рассеяния 3°–145° (монохроматическое FeK_{α} -излучение, монохроматор – кристалл пиролитического графита, установленный на пути первичного пучка).

Подробно методика расчета размеров областей кристалличности (блоков мозаики, областей когерентного рассеяния (ОКР)), индекса кристалличности и методика полнопрофильного анализа описаны в [3, 20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены дифрактограммы образцов БНЦ, синтезированных на средах ферментативных гидролизатов мискантуса, полученные в геометрии на отражение и просвет. Зарегистрированные в геометрии на отражение дифрактограммы характерны для БНЦ [21, 22]. В геометрии на просвет наиболее типичными являются дифрактограммы образцов 1 и 4 (рис. 1д, 1з) [23].

Различие дифрактограмм, полученных в геометрии на отражение и просвет, объясняется анизотропией структуры БНЦ. Анизотропия структуры характерна для пленочных объектов и наблюдалась ранее для образцов, полученных на средах ферментативных гидролизатов плодовых оболочек овса [3].

На рис. 2 сравниваются дифрактограммы образца 1, снятые в геометрии на отражение и на просвет, с дифрактограммами, рассчитанными по данным для двух моделей – целлюлозы I α [24–26] и I β [24, 25, 27] с параллельным расположением целлюлозных остатков в элементарной ячейке. Как следует из рис. 2, расстояния между тремя основными отражениями на дифрактограмме образца БНЦ ближе к данным, рассчитанным по характеристикам целлюлозы I α : $a = 6.74$, $b = 5.93$, $c = 10.36 \text{ \AA}$, $\alpha = 117.0^\circ$, $\beta = 113.0^\circ$, $\gamma = 81.0^\circ$ [24]. Результаты расчета полученных в геометрии на отражение дифрактограмм методом полнопрофильного анализа показали, что структура всех исследованных образцов соответствует алломорфу I α .

В табл. 1 представлены уточненные значения периодов (a , b , c) и объема (V) элементарной ячейки, значения весового профильного (R_{wp}) и профильного (R_p) факторов недостоверности, фактора надежности (Goff), а также параметр текстуры T и индексы оси текстуры (преимущественной ориентации кристаллитов) $\langle uvw \rangle$.

Рассчитанные для образцов БНЦ, синтезированных на средах ферментативных гидролизатов мискантуса, размеры элементарных ячеек соответствуют ранее опубликованным результатам

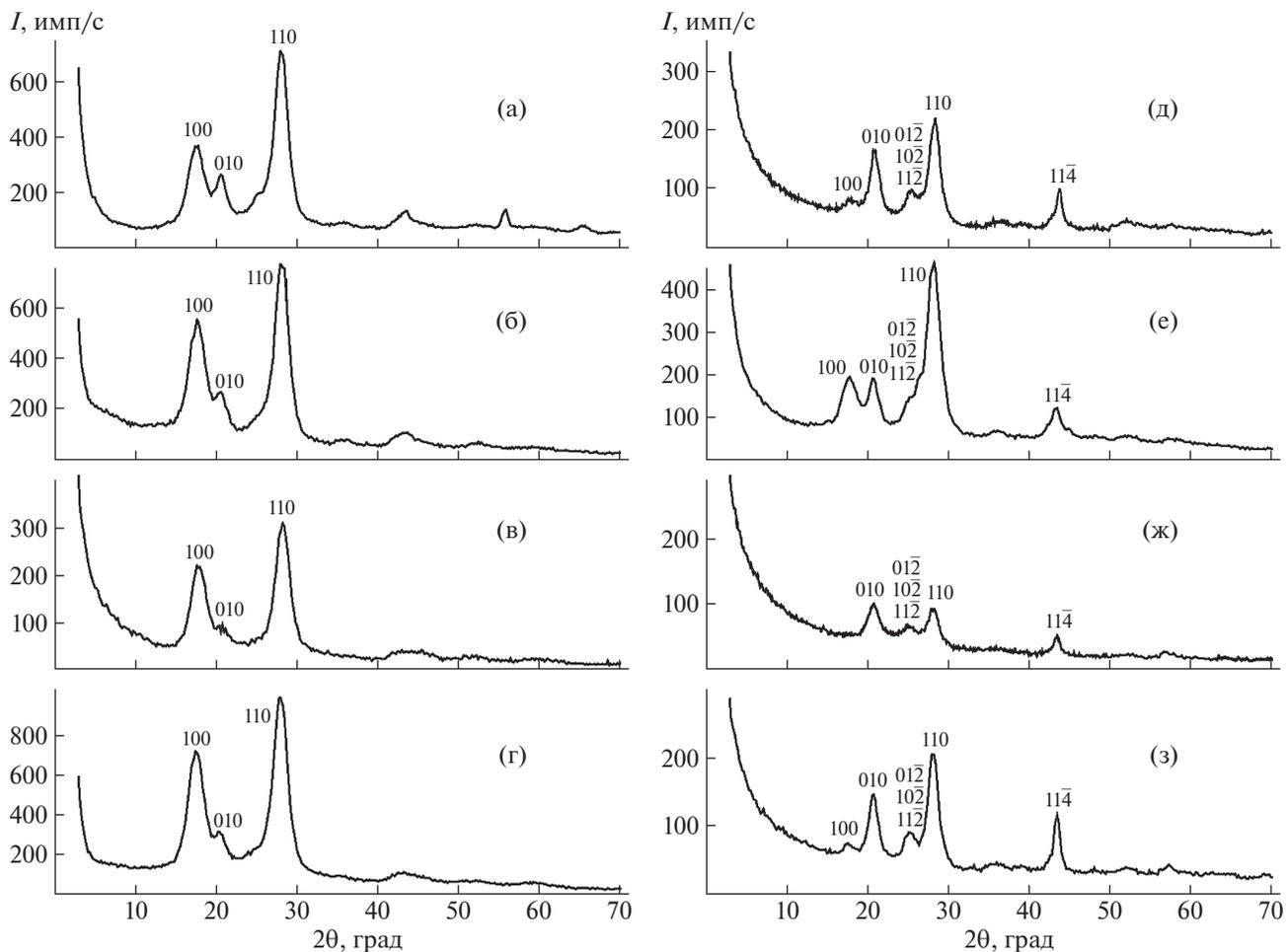


Рис. 1. Дифрактограммы образцов БНЦ 1 (а, д), 2 (б, е), 3 (в, ж), 4 (г, з), снятые в геометрии на отражение (а–г) и про-свет (д–з).

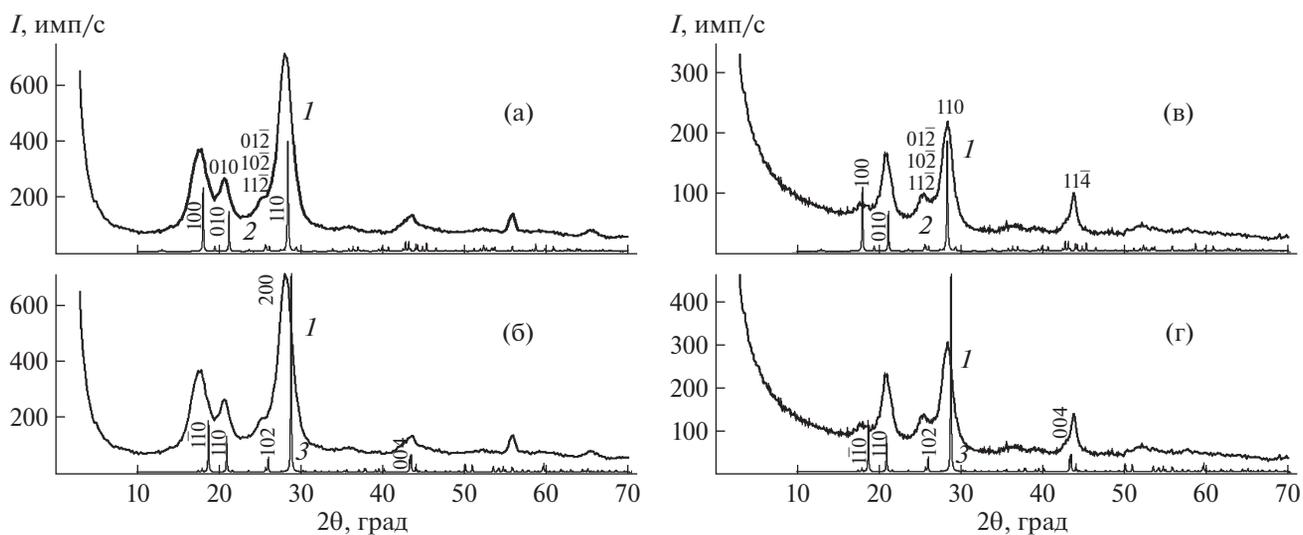


Рис. 2. Дифрактограмма образца 1 (*I*), снятая в геометрии на отражение (а, б) и на просвет (в, г) в сравнении с рентгенограммами, рассчитанными для моделей целлюлозы Iα (2) и целлюлозы Iβ (3).

Таблица 1. Кристаллографические характеристики и факторы недостоверности, достигнутые в результате расчета методом Ритвельда по снятым на отражение дифрактограммам

Образец	$a, \text{Å}$	$b, \text{Å}$	$c, \text{Å}$	$\alpha, \text{град}$	$\beta, \text{град}$	$\gamma, \text{град}$	$V, \text{Å}^3$	$R_{wp}, \%$	$R_p, \%$	Goff	T	$\langle uvw \rangle$
1	6.74(5)	5.99(8)	10.30(3)	118.0(2)	113.0(1)	82.0(5)	340.0(1)	8.0	5.6	0.9	1.0	—
2	6.82(2)	6.00(6)	10.46(1)	117.2(2)	114.1(1)	81.0(5)	347.1(2)	8.8	6.8	1.0	0.7	100
3	6.78(1)	5.96(6)	10.36(1)	116.6(1)	114.0(1)	81.3(1)	343.0(4)	8.7	6.3	0.8	0.4	100
4	6.74(4)	5.93(8)	10.36(8)	117.0(3)	113.0(05)	81.0(1)	339.0(3)	10.3	8.2	1.4	2.3	100

для образцов БНЦ, синтезированных на синтетической питательной среде и на средах ферментативных гидролизатов плодовых оболочек овса [3], а также данным, приведенным в [24, 25, 28, 29] для целлюлозы I α . Отметим, что в образце 1 текстура отсутствует, а для всех остальных образцов ось текстуры одна и та же: $\langle 100 \rangle$.

Преобладание в образцах БНЦ триклинной модификации целлюлозы I α хорошо согласуется с литературными данными, свидетельствующими о том, что в отличие от растительной целлюлоза примитивных организмов характеризуется высоким содержанием триклинной модификации [1, 30].

Результаты расчета размеров областей и индексов кристалличности по дифрактограммам, снятым на отражение и просвет, приведены в табл. 2. Индексы hkl указаны для целлюлозы I α .

На рис. 3а показана связь между моноклинной и триклинной элементарными ячейками целлюлозы I β и I α соответственно [22, 31], а на рис. 3б — расположение цепочек целлюлозы I в плоскости, перпендикулярной оси c , т.е. оси фибриллы. С направлением оси фибриллы совпадают направления $[11\bar{4}]$ в триклинной и $[001]$ в моноклинной решетках целлюлозы I. Из рис. 3 следует, что линейные размеры и форма поперечного сечения элементарных фибрилл определяются по размерам кристаллитов в направлениях $[100]$,

$[010]$ и $[110]$ кристаллической решетки целлюлозы I α , размер ОКР вдоль элементарной фибриллы — по размеру кристаллитов в направлении $[11\bar{4}]$. В решетке целлюлозы I β этим направлениям, как указано на рис. 3 и в [31], соответствуют оси $[11\bar{0}]$, $[110]$, $[100]$ и $[001]$.

На рис. 4 схематически изображены формы поперечного сечения элементарных фибрилл, построенные на основе данных табл. 2 с учетом размеров и проекции элементарной ячейки целлюлозы I α на плоскость ab . Использована программа Mercuro. Поперечное сечение элементарных фибрилл БНЦ из мискантуса — искаженный шестиугольник. Все фибриллы имеют разную форму и размеры. Предположительно, это связано с разным составом питательных сред, используемых для биосинтеза БНЦ.

Сравнение полученных и литературных данных показало, что поперечные размеры элементарных фибрилл, определенные в настоящей работе, согласуются с моделями, предложенными в [32] на основе рентгеновского и нейтронографического экспериментов, и данными атомно-силовой спектроскопии для целлюлозы Валония со структурой I α [33] и для волокон кукурузы [34]. Отметим, что поперечные размеры элементарных фибрилл исследованной БНЦ, лежащих в плоскости пленки, заметно больше, чем фибрилл, перпендикулярных поверхности (рис. 4).

Из дифрактограмм, зарегистрированных в геометрии на отражение, нельзя сделать выводы о длине ОКР вдоль оси фибриллы, так как отражение $11\bar{4}$ лучше выявляется на дифрактограммах, полученных на просвет. То есть самые длинные фибриллы располагаются параллельно поверхности образца. Это явление характерно не только для БНЦ [20, 29]. Поэтому в табл. 1 расчеты длины области кристалличности выполнены по дифрактограммам, снятым в геометрии на просвет. Полученные результаты свидетельствуют о высоких индексах кристалличности: от 86 до 94%. Индекс кристалличности образцов БНЦ, синтезированных продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12 на синтетической питательной среде и на средах ферментативных гидролизатов плодовых оболочек овса, находится в том же диапазоне и составляет от 86 до 93% [3].

Таблица 2. Результаты расчета индекса кристалличности (ИК) и размеров блоков кристалличности для целлюлозы I α

Образец	1		2		3		4	
	отр	пр	отр	пр	отр	пр	отр	пр
ИК $\pm 5\%$	86	94	94	92	88	89	85	92
hkl								
100	47	89	46	79	47	*	46	165
010	87	86	61	88	64	108	87	88
110	61	77	47	62	48	95	47	87
$11\bar{4}$	*	161	*	94	*	140	*	159

Примечание. Отражения, которые отсутствуют на соответствующих дифрактограммах, отмечены звездочкой; отр — геометрия на отражение, пр — геометрия на прохождение.

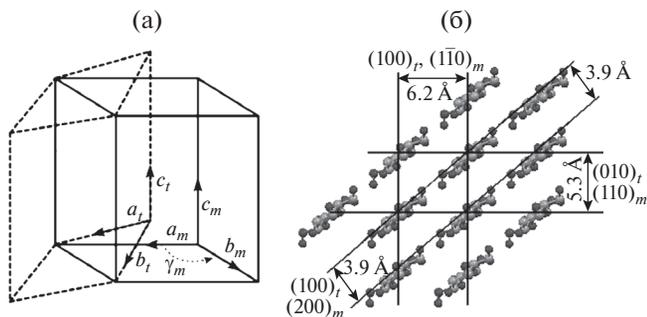


Рис. 3. Взаимная ориентация в решетке целлюлозы I: а – моноклинной (m) и триклинной (t) элементарных ячеек; б – цепочек, перпендикулярных плоскости рисунка. Указаны межплоскостные расстояния и плоскости.

Основываясь на полученных данных для образцов БНЦ, синтезированных на синтетической питательной среде и на ферментативных гидролизатах плодовых оболочек овса и мискантуса, можно утверждать, что при использовании продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12 состав питательной не оказывает влияния на индекс кристалличности и содержание алломорфа I α . Синтезированные образцы БНЦ являются высококристаллическими и преимущественно состоят из целлюлозы триклинной фазы I α .

Настоящие исследования важны для определения области применения БНЦ. Например, изучение гемостатической активности БНЦ, синтезированной *Medusomyces gisevii* Sa-12, показало, что время остановки кровотечения и масса кро-

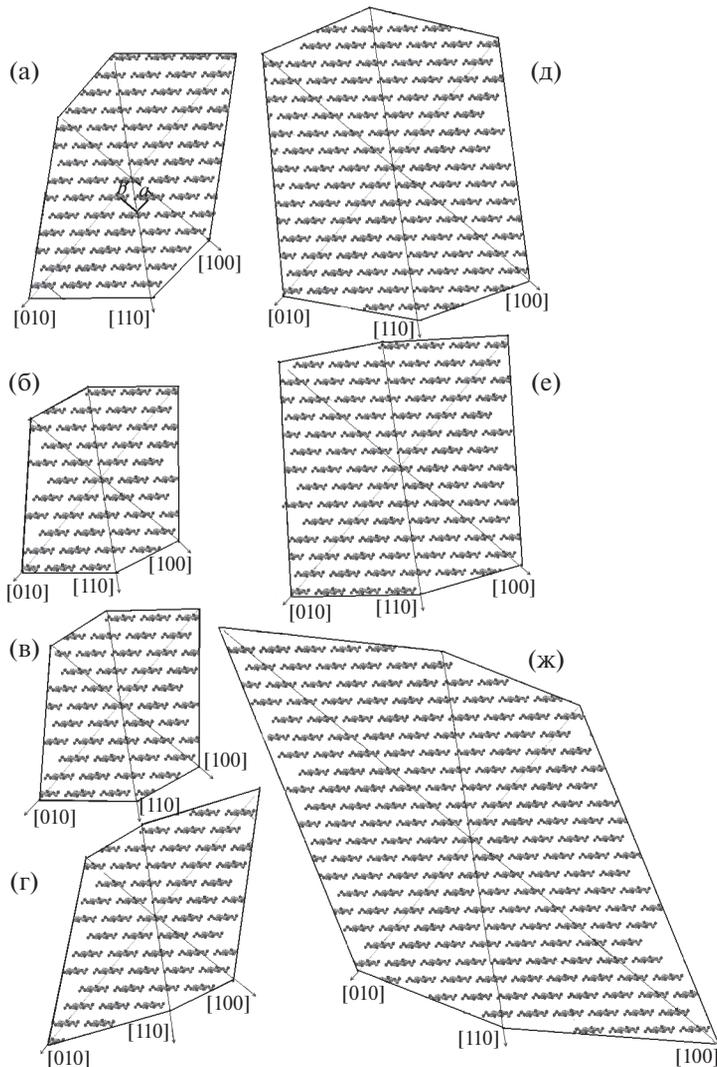


Рис. 4. Схемы поперечного сечения элементарных фибрилл образцов: 1 (а, д), 2 (б, е), 3 (в), 4 (г, ж), исследованных в геометрии на отражение (а–г) и просвет (д–е). Масштаб в ангстремах соответствует данным табл. 2. На схеме поперечного сечения образца 1 показана базисная плоскость элементарной ячейки целлюлозы I α .

вопоти при использовании БНЦ в 7 раз меньше, чем в случае марлевого тампона [35]. Таким образом, установлена самостоятельная гемостатическая активность БНЦ. Полученные результаты можно объяснить уникальной структурой образцов БНЦ, что, в свою очередь, связано с преобладанием триклинной модификации I α и расположением наиболее крупных элементарных фибрилл и элементарных фибрилл с наиболее длинными ОКР вдоль оси фибриллы параллельно поверхности пленки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что состав питательных сред ферментативных гидролизатов мискантуса оказывает влияние на форму и размер элементарных фибрилл и не оказывает влияния на степень кристалличности и содержание алломорфа I α . Показано, что использование продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12 позволяет получить БНЦ с высокой степенью кристалличности в диапазоне 86–93% и с преимущественным содержанием алломорфа I α вне зависимости от используемой питательной среды.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Heinze T., El Seoud O.A., Koschella A.* Cellulose Derivatives. Synthesis, Structure, and Properties. Switzerland: Springer, 2018. 552 p.
2. *Baklagina Y.G., Klechkovskaya V.V., Kononova S.V. et al.* // Crystallogr. Rep. 2018. V. 63. № 3. P. 303.
3. *Aleshina L.A., Gladysheva E.K., Budaeva V.V. et al.* // Crystallogr. Rep. 2018. V. 63. № 6. P. 955.
4. *Kuila A., Sharma V.* Principles and Applications of Fermentation Technology. Beverly: Scrivener Publishing, 2018. 480 p.
5. *Barud H., Silva R.R., Barud H. et al.* // Carbohydr. Polym. 2016. V. 153. P. 406.
6. *Islam U.M., Ullah M.W., Khana S. et al.* // Int. J. Biol. Macromol. 2017. V. 102. P. 1166.
7. *Gama M., Dourado F., Bielecki S.* Bacterial Nanocellulose from Biotechnology to Bio-Economy. Amsterdam: Elsevier, 2016. 240 p.
8. *Luo M.T., Zhao C., Huang C. et al.* // Indian. J. Microbiol. 2017. V. 57. № 4. P. 393.
9. *Velasquez-Riano M., Bojaca V.* // Cellulose. 2017. V. 24. P. 2677.
10. *Vazquez A., Foresti M.L., Cerrutti P., Galvagno M.* // J. Polym. Environ. 2013. V. 21. № 2. P. 545.
11. *Molina-Ramírez C., Castro C., Zuluaga R., Gañán P.* // J. Polym. Environ. 2018. V. 26. № 2. P. 830.
12. *Mohammadkazemi F.* // Am. J. Appl. Indr. Chem. 2017. V. 1. № 1. P. 10.
13. *Budaeva V.V., Skiba E.A., Baibakova O.V. et al.* // Catal. Industry. 2016. V. 8. № 1. P. 81.
14. *Skiba E.A., Budaeva V.V., Baibakova O.V. et al.* // Catal. Industry. 2016. V. 8. № 2. P. 168.
15. *Gismatulina Y.A., Budaeva V.V.* // Ind. Crop. Prod. 2017. V. 109. P. 227.
16. *Байбакова О.В., Скиба Е.А., Будаева В.В., Золотухин В.Н.* // Ползуновский вестн. 2016. Т. 1. № 4. С. 147.
17. *Budaeva V.V., Makarova E.I., Gismatulina Yu.A.* // Key Eng. Mater. 2016. V. 670. P. 202.
18. *Denisova M.N., Makarova E.I., Pavlov I.N. et al.* // Biotechnol. Appl. Biochem. 2016. V. 178. № 6. P. 1196.
19. *Gladysheva E.K., Skiba E.A., Zolotukhin V.N., Sakovich G.V.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. № 2. P. 179.
20. *Torlopov M.A., Mikhaylov V.I., Udoratina E.V. et al.* // Cellulose. 2018. V. 25. № 2. P. 1031.
21. *Chandrasekaran P.T., Bari N.K., Sinha S.* // Cellulose. 2017. V. 24. P. 4367.
22. *Khandelwal M., Windle A.H., Hessler N.* // J. Mater. Sci. 2016. V. 5. P. 4839.
23. *Faria-Tischer P.C.S., Tischer C.A., Heux L. et al.* // Mat. Sci. Eng. C-Bio. S. 2015. V. 51. № 1. P. 167.
24. *Sugiyama J., Vuong R., Chanzy H.* // Macromolecules. 1991. V. 24. P. 4168.
25. *French A.D.* // Cellulose. 2014. V. 21. P. 885.
26. *Nishiyama Y., Sugiyama J., Chanzy H., Langan P.* // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 14300.
27. *Nishiyama Y., Langan P., Chanzy H.* // J. Am. Chem. Soc. 2002. V. 124. P. 9074.
28. *Poma A.B., Chwastyk M., Cieplak M.* // Cellulose. 2016. V. 23. № 3. P. 1573.
29. *Алешина Л.А., Глазкова С.В., Луговская Л.А. и др.* // Химия растительного сырья. 2001. № 1. С. 5.
30. *Cheng K., Catchmark J., Demirci A.* // J. Biol. Eng. 2009. V. 3. № 12. P. 1.
31. *Moon R.J., Martini A., Nairn J. et al.* // Chem. Soc. Rev. 2011. V. 40. P. 3941.
32. *Thomas L.H., Forsyth V.T., Šturcová A. et al.* // Plant Physiol. 2013. V. 161. P. 465.
33. *Baker A.A., Helbert W., Sugiyama J. et al.* // Biophys. J. 2000. V. 79. P. 1139.
34. *Ding S.-Y., Shuai S., Yining Y.* // Cellulose. 2014. V. 2. P. 863.
35. Патент № 2624242 (РФ). Раневое покрытие с гемостатическим действием и способ его получения / ФГБУ ГНИ Минздрава РФ, ООО Фирма “Технология-Стандарт”, ИПХЭТ СО РАН. *Савченко В.Г., Белозерская Г.Г., Макаров В.А. и др.* // заявл. 10.08.2016; опубл. 03.07.2017, Бюл. № 19. 19 с.