

УДК 579.67:577.152; 664.764:633.1

EDN [ADYGAS](#)



<https://www.doi.org/10.47813/mip.5.2023.9.75-81>

## Использование гидролизатов растительного сырья в биосинтезе бактериальной целлюлозы

Наталья Анатольевна Погорелова\*, Наталья Анатольевна Сарницкая

Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, г. Омск, Российская Федерация

\*E-mail: [na.pogorelova@omgau.org](mailto:na.pogorelova@omgau.org)

**Аннотация.** Одним из направлений по улучшению технико-экономических показателей биотехнологического производства бактериальной целлюлозы является использование питательных сред на основе модифицированного растительного сырья. Растительные гидролизаты получали биотрансформацией пшеничных отрубей комплексом амилолитических ферментных препаратов: ГлюкоЛюкс А, АмилоЛюкс АТС, ЦеллоЛюкс А. Определено общее содержание моно-и дисахаридов в гидролизате 2,7% и азотистых соединений 0,34 г/л. Биосинтез бактериальной целлюлозы (БЦ) с использованием симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* проводили в статических условиях на полученных пшеничных гидролизатах. Продукция БЦ составила  $2,71 \pm 0,32$  г/л на 21-е сутки биосинтеза. Для структуры гель-пленки синтезированной БЦ характерны длинные фибриллы длиной до 10 мкм с выраженным нанорельефом, которые переплетены под острым углом. Вдоль фибрилл наблюдаются узлы, расстояние между которыми около 0,5 мкм.

**Ключевые слова:** пшеничные отруби, гидролизат, растительные полимеры, ферментные препараты, питательная среда, бактериальная целлюлоза.

## The use of hydrolysates of plant raw materials in the biosynthesis of bacterial cellulose

Natalia Pogorelova\*, Natalia Sarnitskaya

Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk, Russian Federation

\*E-mail: [na.pogorelova@omgau.org](mailto:na.pogorelova@omgau.org)

**Abstract.** One of the directions for improving the technical and economic indicators of biotechnological production of bacterial cellulose is the use of nutrient media based on modified plant raw materials. Vegetable hydrolysates were obtained by biotransformation of wheat bran with a complex of amylolytic enzyme preparations: Glucolux A, Amylolux ATS, CelloLux A. The total content of mono- and disaccharides in hydrolysate 2.7% and nitrogenous compounds 0.34 g/l was determined. Bacterial cellulose (BC) biosynthesis using a symbiotic culture of *Medusomyces gisevii* was carried out under static conditions on the obtained wheat hydrolysates. BC production was  $2.71 \pm 0.32$  g/l on the 21st day of biosynthesis. The structure of the gel film synthesized by BC is characterized by long fibrils up to 10 microns long with a pronounced nanorelief, which are intertwined at an acute angle. Nodes are observed along the fibrils, the distance between which is about 0.5 microns.

**Keywords:** wheat bran, hydrolyzate, vegetable polymers, enzyme preparations, nutrient medium, bacterial cellulose.

## 1. Актуальность темы

Высокая стоимость питательных сред ограничивает экономическое производство бактериальной целлюлозы (БЦ), поскольку такие среды составляют свыше 30% общей стоимости производства [8]. Поэтому поиск новых экономически эффективных питательных сред для получения максимальной производительности БЦ в крупномасштабных промышленных применениях является критическим фактором. В последних исследованиях основное внимание уделяется различным недорогим источникам питательных веществ и дополнительным веществам для эффективного биосинтеза БЦ [12]. Использование в качестве источника углерода полимеров растительного сырья, в том числе и пшеничных отрубей, как способ повышения выхода и снижения затрат на производство БЦ актуально. Современные технологии переработки позволяют использовать сельскохозяйственную продукцию для решения актуальных проблем различных сфер производства. Пшеничные отруби, отходы мукомольного производства, рассматриваются как высокопотенциальный источник крахмало - целлюлозной биомассы для промышленного производства биотоплива, дрожжевой биомассы и других коммерческих биопродуктов, в том числе и БЦ [4, 9]. Основные полисахаридные фракции пшеничных отрубей, крахмал, целлюлоза и гемицеллюлозы, могут подвергаться химическому и/или микробиологическому превращению в биотопливо или химические вещества необходимые для следующего этапа биосинтеза [3, 10, 14]. Гидролиз ферментными препаратами обеспечивает получение желаемой глубиной распада растительных полимеров при варьировании технологических условий [7]. Биотрансформация пшеничных отрубей комплексом амилолитических ферментных препаратов позволяет получить высокий выход моно- и дисахаридов [2]. Кроме того, экстрагирование минеральных веществ и азотистых соединений пшеничных отрубей, позволяет рассматривать такие гидролизаты как альтернативу синтетическим питательным средам в биотехнологии бактериальной целлюлозы. Таким образом, актуальны исследования эффективности применения в биосинтезе БЦ гидролизатов пшеничных отрубей.

## 2. Материалы и методы

Проведены исследования биосинтеза бактериальной целлюлозы на гидролизате пшеничных отрубей.

- В соответствии с исследуемым составом пшеничных отрубей [1] для ферментации подобрали комплекс ферментных препаратов: ГлюкоЛюкс А (1 %), АмилоЛюкс АТС (0,5 %), ЦеллоЛюкс А (0,5 %).
- Гидролиз пшеничных отрубей проводили при температуре 50°C и применяемый гидромодуль 1:8. Гидролизат фильтровали от твердых нерастворимых частиц и термостатировали в течение 15 минут при T=100°C. В гидролизат вносили 20% об. инокулята симбиотической культуры *Medusomyces gisevii*, биосинтез проводили в статических условиях. Ферментные препараты АмилоЛюкс АТС, ГлюкоЛюкс А, ЦеллоЛюкс А производства ООО ПО «Сиббиофарм» г. Бердск, Новосибирской области. Препараты соответствует санитарным нормам и правилам, разрешены Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации Таможенного Союза стран ЕВРАЗЭС для применения их в пищевой промышленности.
- Определение редуцирующих сахаров в экстрактах пшеничных отрубей по ГОСТ 54905-2012. Препараты ферментные. Методы определения ферментативной активности бета-глюканазы.
- Определение аминного азота проводили методом йодометрического титрования по методу Попе-Стевенса (ОФС.1.2.3.0022.15 - Определение аминного азота методами формольного и йодометрического титрования).
- Информация о топологии поверхности образца и фибриллярной структуре была получена с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) NTEGRA Prima (NT-MDT Spectrum Instruments, Россия) в полуконтактном режиме. Сканирование проводилось в воздухе с помощью кантилевера серии HA-NC Etalon с характерной твердостью 3,5Н/м. Полученный сигнал измерялся как изменение фототока (пА) между его верхней и нижней секциями оптического датчика. Обработка изображений производилась с использованием программного обеспечения Gwyddion, разработанного Дэвидом Нечасом и Петром Клапетеком и распространяемого по лицензии GNU GPL [11].

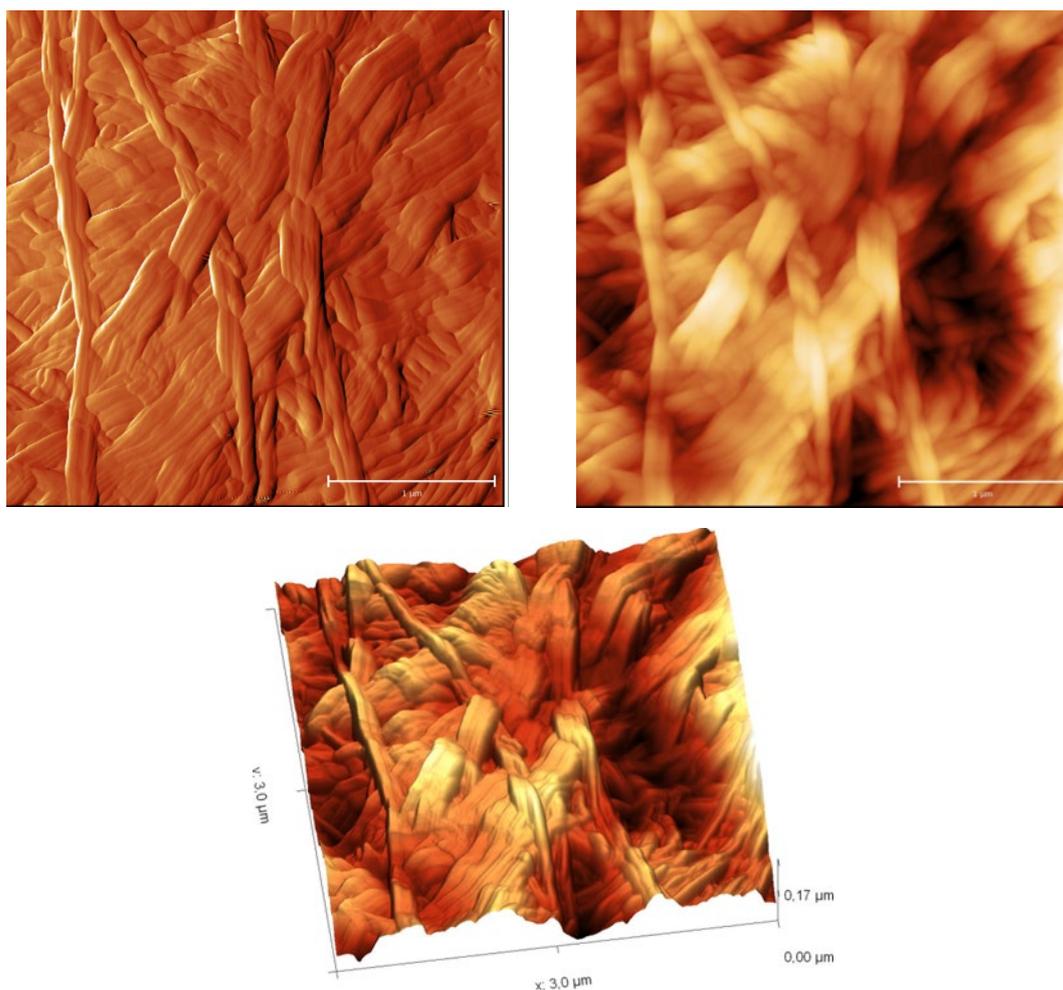
### 3. Результаты исследований

Биосинтез бактериальной целлюлозы осуществляли в статических условиях на гидролизате пшеничных отрубей. Для ферментации растительных полимеров пшеничных отрубей использовали наиболее эффективный в отношении производства

моно- и дисахаридов ферментный комплекс ГлюкоЛюкс А (1%), АмилоЛюкс АТС (0,5 %), ЦеллоЛюкс А (0,5 %). Общее содержание моно-и дисахаридов в гидролизате составило 2,7%. Гидролизат пшеничных отрубей, используемый в качестве питательной среды, содержит большое количество азотистых соединений – 0,34 г/л, и других факторов роста, это может стимулировать биосинтез бактериальной целлюлозы. Образование геля пленки БЦ происходило на 6-е сутки культивирования и через 21 сутки определяли выход бактериальной целлюлозы на объем культуральной жидкости. Отмечено, что полученный гидрогель обладал меньшей прозрачностью в сравнении с образцами, полученными на питательной среде, содержащий экстракт зеленого чая [12, с. 3].

Установлено, что продукция бактериальной целлюлозы на гидролизатах пшеничных отрубей составила  $2,71 \pm 0,32$  г/л на 21-е сутки. Этот результат согласуется с предыдущими исследованиями Мохаммад Каземи, Азина, and Ashori (2015), Се, Ван Лай, и Лю (2016), и Zhao et al (2018) при использовании различных источников углерода. Уксуснокислые бактерии способны полностью окислять различные источники углерода, такие как сахароза, глюкоза, фруктоза, галактоза, маннитол, глицерин, инозитол и спирты для синтеза целлюлозы [13]. Бактерии используют более длинный путь для синтеза целлюлозы, чтобы метаболизировать углеводы гидролизата пшеничных отрубей отличные от глюкозы. В результате, определен более низкий выход целлюлозы на этапе биосинтеза от 4 до 16 суток, в сравнении культивированием на питательной среде с источником углерода - глюкозой [6].

Микрофотографии целлюлозы, синтезированной на гидролизатах пшеничных отрубей представлены на рисунке 1. Наблюдаются длинные фибриллы с выраженным нанорельефом, которые переплетены под острым углом. Фибриллы длинные до 10 мкм, имеют структуру в виде переплетенных против часовой стрелки нитей. Вдоль фибрилл наблюдаются узлы, расстояние между которыми около 0,5 мкм. На поверхности образца бактериальной целлюлозы встречается множество впадин диаметром около 1,2 мкм.



**Рисунок 1.** Морфология поверхности бактериальной целлюлозы, синтезированной на гидролизатах пшеничных отрубей: а – двумерное изображение рельефа поверхности, б – амплитуда колебания зонда, с – трехмерное изображение рельефа поверхности.

#### 4. Выводы

Ферментативная обработка пшеничных отрубей способствовала увеличению как азотистых соединений, так и моно и дисахаридов гидролизатов. Бактериальная целлюлоза, синтезированная на гидролизатах пшеничных отрубей, имела фибриллярное строение.

#### Благодарности

Работа выполнена в рамках реализации гранта Российского научного фонда «Фундаментальные исследования структуры и свойств наноматериала и его биотехнологические аспекты производства в предлагаемом биореакторе» №23-24-10052 от 20.04.2023 года.

## Список литературы

1. Погорелова Н.А. Конверсия пшеничных отрубей в целевые продукты биосинтеза / Н.А. Погорелова, Н.Б. Гаврилова // Техника и технология пищевых производств. – 2023. – Т. 53. – № 1. – С. 49-59. <http://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2414>
2. Сарницкая Н.А. Амилолитические ферментные препараты в технологии производства функциональных ингредиентов из растительного сырья / Н.А. Сарницкая, Н.А. Погорелова // В сборнике: Рынок Фуднет: актуальные проблемы, перспективы и решения. Материалы Международной научно-практической конференции посвящённой 90-летию кафедры продуктов питания и пищевой биотехнологии. – 2021. – С. 64-66. eLIBRARY ID: 44902985.
3. Сарницкая Н.А. Практические аспекты применения биотрансформированного растительного сырья / Н.А. Сарницкая, Н.А. Погорелова, Е.А. Рогачев // В сборнике: Агробиоинженерия 2021. Сборник статей Всероссийской конференции-конкурса молодых исследователей. Москва. – 2021. – С. 240-246. eLIBRARY ID: 46404669.
4. Clifton-Brown J. Breeding progress and preparedness for mass-scale deployment of perennial lignocellulosic biomass crops switchgrass, miscanthus, willow and poplar / J. Clifton-Brown, A. Harfouche, M.D. Casler et al. // GCB Bioenergy. – 2018. – 11(1). – P. 118-151. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12566>
5. Pogorelova N. Bacterial cellulose nanocomposites: morphology and mechanical properties / N. Pogorelova, E. Rogachev, I. Digel, S. Chernigova, D. Nardin // Materials. – 2020. – Т. 13(12). – P. 1-16. <https://doi.org/10.3390/ma13122849>
6. Digel I. Bacterial cellulose produced by medusomyces gisevii on glucose and sucrose: biosynthesis and structural properties / I. Digel, N. Akimbekov, E. Rogachev, N. Pogorelova // – 2023. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2607212/v1>
7. Procentese A. Deep Eutectic Solvents pretreatment of agro-industrial food waste / A. Procentese, F. Raganati, G. Olivieri et al. // Biotechnology for Biofuels and Bioproducts. – 2018. – V. 11(37). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1034-y>
8. Rivas B. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* / B. Rivas, Ana B. Moldes, José M. Domínguez, Juan C. Parajó // International Journal of Food Microbiology. – 2004. – V. 97(1). – P. – 93-98. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.006>

9. Wang L. Effects of acid treatment on the physicochemical and functional properties of wheat bran insoluble dietary fiber / L. Wang, Y. Tian, Y. Chen, J. Chen // *Cereal Chemistry*. – 2022. – V. 99(2). – P. 343–354. <https://doi.org/10.1002/cche.10494>
10. Bhatia L. Lignocellulose derived functional oligosaccharides: production, properties, and health benefits / L. Bhatia, A. Sharma, R. K. Bachheti, A.K Chandel // *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. – 2019. – V. 49(8). – P. 744-758. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1608446>
11. Nečas, D. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis / D. Nečas, P. Klapetek // *Central European Journal of Physics*. – 2012. – V. 10(1). – P. 181-188. <https://doi.org/10.2478/s11534-011-0096-2>
12. Kiziltas E.E. Preparation and characterization of transparent PMMA-cellulose-based nanocomposites / E.E. Kiziltas, A. Kiziltas, Sh.C. Bollin, D.J. Gardner. // *Carbohydrate Polymers*. – 2015. – V. 127. – P. 381-389. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.029>
13. Ruka D.R. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose / D.R. Ruka, G.P. Simon, K.M. Dean // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – V. 89(2). – P. 613-622. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.059>
14. Jia M. Structural characteristics and functional properties of soluble dietary fiber from defatted rice bran obtained through *Trichoderma viride* fermentation / M. Jia, J. Chen, X. Liu et al. // *Food Hydrocolloids*. – 2019. – V. 94. – P. 468-474. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.047>