

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ХИМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Е.К. Гладышева

*Методами инфракрасной спектроскопии и ядерного магнитного резонанса исследованы структура и химическое строение образцов бактериальной целлюлозы, полученных на синтетической питательной среде и среде ферментативного гидролизата технической целлюлозы плодовых оболочек овса с помощью продуцента *Medusomyces gisevii*. Методом ИК-спектроскопии установлена химическая чистота бактериальной целлюлозы: образцы не содержат примесей, характерных для растительной целлюлозы, т.к. отсутствуют полосы поглощения, указывающие на ароматические соединения. ИК-спектры образцов бактериальной целлюлозы, полученных на синтетической питательной среде и среде ферментативного гидролизата технической целлюлозы плодовых оболочек овса идентичны. Методом ЯМР-спектроскопии подтверждена идентичность химического строения опытных образцов бактериальной целлюлозы и растительной целлюлозы.*

*Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, *Medusomyces gisevii*, инфракрасная спектроскопия, метод ядерного магнитного резонанса, ферментативный гидролизат плодовых оболочек овса.*

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно ведутся исследования по поиску новых материалов, с широким спектром применения. Одним из таких материалов является бактериальная целлюлоза (БЦ).

БЦ, в отличие от растительной целлюлозы, синтезируется микроорганизмами в чистом виде без примесей лигнина и других сопутствующих компонентов [1]. БЦ имеет более высокий модуль Юнга при меньших размерах волокна, чем у растительной целлюлозы [2]. Сетчатая структура БЦ позволяет поглощать в себя воду в 100 раз больше собственного веса [3]. Рентгенографические исследования БЦ показывают более высокую степень кристалличности и преобладание низкосимметричной реакционноспособной фазы I $\alpha$ , в отличие от растительной целлюлозы в которой преобладает фаза I $\beta$  [4, 5].

БЦ используется в пищевой, целлюлозобумажной, электронной, биотехнологической и химической промышленности. Сетчатая нанопористая структура позволяет применять БЦ как основу для раневых покрытий. Такое свойство как биосовместимость позволяет применять БЦ при протезировании кровеносных сосудов и при восстановлении хрящей. Наноконструкции БЦ возможно использовать при восстановлении костных тканей [6].

Однако производство БЦ дорогостоящий процесс, т.к. в качестве питательной среды используется пищевое сырье. Замена пище-

вого сырья на непищевое позволит значительно снизить себестоимость БЦ.

В ИПХЭТ СО РАН разработана технология получения гидролизатов из таких возобновляемых целлюлозосодержащих растительных ресурсов, как биомасса энергетического растения мискантуса (сорта Сорановский, выведенного в Институте цитологии и генетики СО РАН) и плодовых оболочек овса (многоотходного отхода сельского хозяйства в Алтайском крае). Гидролизаты получают в мягких условиях путём ферментативного гидролиза. Показано, что ферментативные гидролизаты являются биологически доброкачественными, пригодными для получения продуктов микробиологического синтеза (на примере биоэтанола) и не нуждаются в дополнительной технологической обработке для освобождения их от вредных примесей [7]. Также в лаборатории ИПХЭТ СО РАН разработан способ получения БЦ, где в качестве питательной среды используется ферментативный гидролизат плодовых оболочек овса, мискантуса и льна-межеумка [8].

В данной работе БЦ получена на синтетической питательной среде и на среде ферментативного гидролизата технической целлюлозы плодовых оболочек овса (ТЦ ПОО). Структура и химическое строение образцов БЦ изучены методами инфракрасной спектроскопии, и ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ХИМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментах использовались: синтетическая питательная среда, приготовленная растворением глюкозы в экстракте черного чая (12 г чая на 1 л воды) и среда ферментативного гидролизата ТЦ ПОО. В качестве инокулята использовалась семидневная симбиотическая культура *Medusomyces gisevii*, выращенная на глюкозной среде и на среде ферментативного гидролизата ТЦ ПОО, доза внесения составляла 10 %. Начальная концентрация субстрата в обеих питательных средах составила 20 г/л, уровень активной кислотности саморегулировался симбиозом [9]. Выбор концентрации глюкозы и активной кислотности обоснован в работе [10]. Культивирование проводилось в статических условиях при 27 °С в течение 14 суток.

Гель-плёнка, образующаяся в результате биосинтеза, в процессе роста загрязнялась остатками компонентов питательной среды, метаболитами и клетками микроорганизмов. Очистка плёнок может быть проведена разными способами: растворами кислот и щелочей, энзимной обработкой, при этом может изменяться диаметр и распределение микрофибрилл БЦ [11].

В данной работе образцы пленок были очищены следующим способом: в течение двух суток образцы выдерживались в 2 %-ном растворе NaOH для удаления клеток, затем пленка промывалась в дистиллированной воде до нейтральной реакции, далее обрабатывались в течение суток в 2 %-ном растворе HCl для удаления красящих веществ чая, затем пленка промывалась дистиллированной водой до нейтральной реакции среды. Плёнки высушивались при комнатной температуре в расправленном состоянии.

Структура и химическое строение БЦ исследовалась на инфракрасном спектрофотометре «Инфралюм ФТ-801» в таблетках KBr и на спектрометре «Bruker avance 400» с высокотемпературными датчиками высокого разрешения твердого дела (до 300 °С).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 представлено сравнение полос поглощения функциональных групп в образцах БЦ, полученных на синтетической среде и на среде ферментативного гидролизата ТЦ ПОО с литературными данными для бактериальной целлюлозы, выращенной с помощью продуцента *Acetobacter* [12].

Таблица 1 – Отнесение полос поглощения функциональных групп в образце бактериальной целлюлозы.

Отнесение полос поглощения*	БЦ <sup>1</sup>	БЦ <sup>2</sup>	БЦ [12]
$\nu$ OH-групп, участвующих в межмолекулярных и внутримолекулярных Н-связях	3429	3432	3408
$\nu$ связей в группах СН и СН <sub>2</sub>	2920 2854	2921	2897
$\nu$ присутствия аминокислот	2537 2135	2540 2135	–
$\delta$ связей НОН обусловлено присутствием прочно связанной воды	1638 1541	1643 1532	1635
$\delta$ групп СН <sub>2</sub>	1430	1431	–
$\delta$ групп OH в СН <sub>2</sub> OH	1375	1376	1370
$\delta$ групп СН <sub>2</sub> в СН <sub>2</sub> OH	1282 1249	1281 1248	
$\delta$ групп OH	–	1204,3	–
$\nu$ связей С-О (характерные для полисахаридов полосы, обусловленные наличием ацетильных связей С-О-С и связей С-О в спиртах)	1165 1060	1102	1163 1060
$\beta$ -1,4 связи	899	899	899
* $\nu$ – валентные колебания, $\delta$ – деформационные колебания, БЦ <sup>1</sup> получена на синтетической питательной среде, БЦ <sup>2</sup> – на среде ферментативного гидролизата ТЦ ПОО			

Интенсивная полоса в области 3200–3600 см<sup>-1</sup> обусловлена валентными колебаниями OH-групп. Менее интенсивная полоса в области 2800–3000 см<sup>-1</sup> указывает на валентные колебания групп СН<sub>2</sub>, СН. В спектре

целлюлозы интенсивная полоса с максимумом при 1641 см<sup>-1</sup> принадлежит деформационным колебаниям OH-групп прочно связанной воды. Полосы в интервале 1500–1200 см<sup>-1</sup> чувствительные к химическим и структурным

превращениям. Полосы поглощения в области  $1000\text{--}1200\text{ см}^{-1}$  обусловлены в основном валентными колебаниями С-О-С и С-О в спиртах. Полоса при  $899\text{ см}^{-1}$  подтверждает наличие  $\beta\text{-}1,4$  связей [13]. ИК-спектры показывают, что БЦ не содержит примесей, в частности лигнина, присутствующего в растительной целлюлозе, так как отсутствуют полосы поглощения, характерные для ароматических соединений (лигнина). В отличие от литературных данных [12], в спектре присут-

ствуют слабые полосы при  $2135$  и  $2537\text{--}2540\text{ см}^{-1}$ , указывающие на наличие аминокислот, которые могут принадлежать остаткам клеток дрожжей и бактерий [14]. ИК-спектр образца БЦ, полученного на среде ферментативного гидролизата ТЦ ПОО идентичен ИК-спектру образца БЦ, полученного на синтетической питательной среде.

На рисунке 1 представлены ЯМР-спектры образцов БЦ, полученных на двух питательных средах.

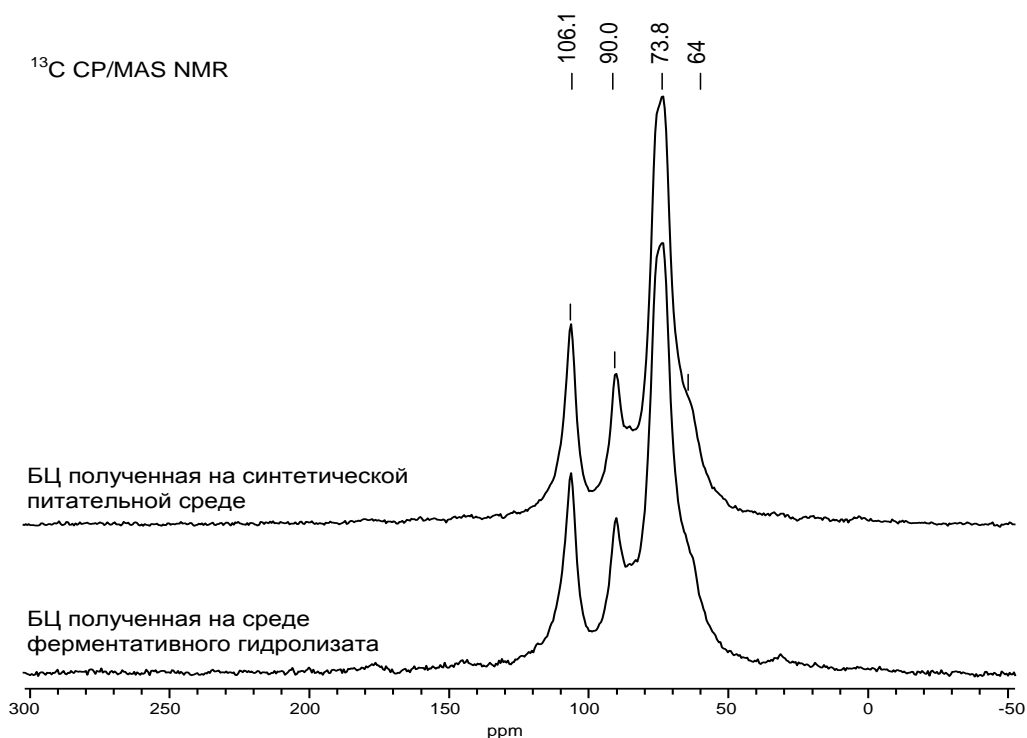


Рисунок 1 – ЯМР( $^{13}\text{C}$ )-спектры образцов БЦ, полученных на разных питательных средах

Как показано на рисунке 1, резонансные линии для образцов бактериальной целлюлозы соотносятся с углеродами С1 –  $106,1$  м.д., С4 –  $90,0$  м.д. и С6 –  $64,0$  м.д. со стороны слабого поля, за исключением кластера резонансов при  $70\text{--}80$  м.д., которые принадлежат углеродам С2, С3 и С5. Можно сделать вывод, что образцы БЦ полученные на синтетической среде и на среде ферментативного гидролизата ТЦ ПОО имеют идентичные химическое строение и структуру.

Сравнение опытных ЯМР-спектров с данными, приведенными в литературе для растительных целлюлоз [13] показало совпадение химических сдвигов с разницей  $\pm 1$  м.д., что является достаточным для подтверждения идентичности структуры и химического строения образцов БЦ и растительной целлюлозы.

## ВЫВОДЫ

Методами инфракрасной спектроскопии и ядерного магнитного резонанса исследованы структура и химическое строение образцов БЦ, полученных на синтетической питательной среде и среде ферментативного гидролизата ТЦ ПОО с помощью продуцента *Medusomyces gisevii*. Методом ИК-спектроскопии установлена химическая чистота БЦ: образцы не содержат примесей, характерных для растительной целлюлозы, т.к. отсутствуют полосы поглощения, указывающие на ароматические соединения. ИК-спектры образцов БЦ, полученных на синтетической питательной среде и среде ферментативного гидролизата ТЦ ПОО идентичны. Методом ЯМР-спектроскопии подтверждена идентичность химического строения опытных образцов БЦ и растительной целлюлозы.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ХИМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Автор выражает благодарность и глубокую признательность сотруднику Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук (ИК СО РАН), доктору химических наук Степанову Александру Григорьевичу в проведении исследований БЦ методом ЯМР-спектроскопии.

Работа выполнена при финансовой поддержке ведущей научной школы РФ НШ-6322.2014.10.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belgacem, M. N. Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources / M. N Belgacem, A. Gandini. – Amsterdam : Elsevier. – 2008. – 553 p.
2. Hsieh, Y.-C. An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments / Y.-C. Hsieh, H. Yano, M. Nogi, S. J. Eichhor // Cellulose. – 2008. – № 15. – P. 507–513.
3. Meftahi, A. The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose / A. Meftahi, R. Khajavi, A. Rashidi, M. Sattari, M. E. Yazdanshenas, M. Torabi // Cellulose. – 2010. – № 17. – P. 199–204.
4. Шипина, О. Т. Рентгенодифракционный анализ различных видов целлюлозы / О. Т. Шипина, З. Т. Валишина, А. В. Косточко // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18, № 17. – С. 166–170.
5. Гладышева, Е. К. Результаты рентгенографических исследований бактериальной целлюлозы / Е. К. Гладышева // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 7-2. – С. 240–244.
6. Гладышева, Е. К. Обоснование выбора питательной среды для синтеза бактериальной целлюлозы / Е. К. Гладышева // Вестник Алтайской науки. – 2014. – № 1. – P. 307–310.
7. Скиба, Е. А. Изучение устойчивости штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1693 к ферментативным гидролизным средам / Е. А. Скиба, О. В. Байбакова // Ползуновский вестник. – 2013. – № 3. – С. 214–219.
8. Будаева В. В., Гладышева Е. К., Скиба Е. А., Сакович Г. В. Способ получения бактериальной целлюлозы – заявка на изобретение. Регистрационный № 2015129304 от 16.07.2015.
9. Гладышева Е. К., Судакова О. А. Культивирование *Medusomyces gisevii* J.Lindau при различных значениях активной кислотности / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, 21-23 мая 2014 г., г. Бийск. – Бийск : Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2014. – С. 284–286.
10. Гладышева, Е. К. Изучение биосинтеза бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* J. Lindau на средах с различной начальной концентрацией глюкозы / Е. К. Гладышева // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 2-1. – С. 13–17.
11. Виноградова В. Р., Болотова К. С. Влияние химической и ферментативной обработки бактериальной целлюлозы на ее структуру и состав / Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием (21-23 мая 2014 г., г. Бийск). – Бийск : Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2014. – С. 216–218.
12. Xueqiong, Yin. Comparison of succinylation methods for bacterial cellulose and adsorption capacities of bacterial cellulose derivatives for Cu<sup>2+</sup> ion / Xueqiong Yin, Changjiang Yu, Xiaoli Zhang, Jianxin Yang, Qiang Lin, Jinbang Wang, Qingmei Zhu // Polymer Bulletin. – 2011. – № 67. – С. 401–412.
13. Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Ч. II. – Спб. : НПО «Профессионал», 2006. – 1142 с.
14. Беллами, Л. Новые данные по ИК спектрам сложных молекул / Л. Беллами. – М. : Мир, 1971. – 320 с.

**Гладышева Е.К.** – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), [evg-gladysheva@yandex.ru](mailto:evg-gladysheva@yandex.ru), тел. (3854) 30-59-85.