ЕВРАЗИЙСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Л.Н. ГУМИЛЕВА

УДК 579.66 На правах рукописи

**НАГМЕТОВА ГУЛЬДЕН ЖУМАНОВНА**

**Выделение и изучение морфологических, физиологических и биохимических свойств эффективного продуцента биоцеллюлозы**

6D060700-Биология

Диссертация на соискание степени

доктора философии (PhD)

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор А.А. Курманбаев

Зарубежный научный консультант:

профессор Варшавского университета естественных наук,

PhD, Л. Стащак-Рожанская

Республика Казахстан

Нур-Султан, 2022

**СОДЕРЖАНИЕ**

|  |  |
| --- | --- |
| ВВЕДЕНИЕ………………………………………………………………………………. | 6 |
| 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ………………………………………....................................... | 12 |
| * 1. Характеристика биоцеллюлозы……………………………………………………   2. Продуценты биоцеллюлозы………………………………………………………   3. Механизм синтеза биоцеллюлозы…………………………………………………   4. Факторы, влияющие на синтез биоцеллюлозы…………………………………... | 12  17  21  24 |
| * 1. Применение биоцеллюлозы в различных сферах деятельности………………... | 28 |
| 1.5.1Биоцеллюлоза в медицине……………………………………………………… | 29 |
| 1.5.2 Биоцеллюлоза в экологии……………………………………………………… | 36 |
| 1.5.3 Использование биоцеллюлозы в косметологии……………………………… | 42 |
| 1.5.4 Использование биоцеллюлозы в пищевой промышленности………………. | 45 |
| 2 Материалы и методы исследований………………………………………………….. | 49 |
| 2.1 Объекты исследований……………………………………………………………... | 49 |
| 2.2 Методы исследований……………………………………………………………… | 49 |
| 2.2.1 Выделение бактерий продуцентов биоцеллюлозы…………………………… | 49 |
| 2.2.2 Изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств продуцентов бактериальной целлюлозы…………………………………………  2.2.3 Генетическая идентификация бактерий по консервативному локусу 16S rRNA……………………………………………………………………………….  2.2.4 Получение пленок бактериальной целлюлозы……………………………….. | 50  51  53 |
| 2.2.5Методы оптимизации условий культивирования штаммов продуцентов биоцеллюлозы…………………………………………………………………….  2.2.6 Исследование биохимического состава и физических свойств пленок бактериальной целлюлозы…………….…………………………………………  2.2.7Определение антимикробной активности биоцеллюлозы............................... | 53  54  55 |
| 3 Результаты исследований и их обсуждение………………………………………….. | 58 |
| 3.1Выделение активных штаммов бактерий, способных синтезировать биоцеллюлозу……………………………………………………………………… | 58 |
| 3.2 Изучение морфологических, физиологических и культуральных свойств бактерий-продуцентов……………………………………………………………… | 60 |
| 3.3 Идентификация отобранных продуцентов по консервативному локусу 16S rRNA…………………………………………………………………………………. | 63 |
| 3.4 Оптимизация условий культивирования штаммов продуцентов по физико-химическим параметрам……………………………………………………………. | 67 |
| 3.5 Исследование биохимического состава и физических свойств пленок бактериальной целлюлозы, полученных при культивировании штаммов в поверхностных условиях…………………………………………………................ | 74 |
| 3.6 Исследование способности пленок биоцеллюлозы адсорбировать антимикробные соединения и оценка антимикробных свойств………………… | 75 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ…………………………………………………………………………... | 80 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ……………………………………. | 83 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А – Патент на полезную модель……………………………………... | 102 |

# Определения, обозначения и сокращения

В настоящей диссертации применяются следующие сокращения с соответствующими определениями и обозначениями:

Уксуснокислые бактерии **–** микроорганизмы из семейства *Acetobacteraceae,* которые получают энергию, окисляя этанол до уксусной кислоты.

Штамм – чистая культура микроорганизма определенного вида, обладающая особыми физиолого-биохимическими свойствами.

|  |  |
| --- | --- |
| ATCC | – American Type Culture Collection |
| bcsABCD | – специфический оперон синтеза биоцеллюлозы |
| CS | – cellulose synthase |
| FBP | – fructose-1,6-biphosphate phosphatase |
| FK | – fructokinase |
| 1FPk | – fructose-1-phosphate kinase |
| GK | – glucokinase |
| GRAS | – Generally Recognized as Safe |
| G6PDH | – glucose-6-phosphate dehydrogenase |
| HS | – Hestrin Schramm |
| NCBI | – National Center for Biotechnology Information |
| PGA | – phosphogluconic acid |
| PGI | – phosphoglucoisomerase |
| PGM | – phosphoglucomutase |
| PTS | – system of phosphotransferases |
| rRNA | – ribosomal ribonucleic acid |
| SAP | – shrimp alkaline phosphate |
| TCA | – tricarboxylic acid |
| UGP | – pyrophosphorylase uridine diphosphoglucose, |
| UDPGlc | – uridine diphosphoglucose |
| БЦ/Кол | – биоцеллюлоза и коллаген |
| БЦ | – биоцеллюлоза |
| ГОСТ | – государственный стандарт |
| ДНК | – дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ЖКТ | – желудочно-кишечный тракт |
| КЖ | – культуральная жидкость |
| КН | – Комитет науки |
| КОЕ | – колониеобразующие единицы |
| МЛС | – молочная среда |
| ПЦР | – полимеразная цепная реакция |
| РГП | – Республиканское государственное предприятие |
| РКМ | – республиканская коллекция микроорганизмов |
| СЕМ | – сканирующая электронная микроскопия |
| УКБ | – уксуснокислые бактерии |
| ФСБ  ЧС  ЭМО  ЭМ | – фосфатно-солевой буфер  – чайная среда  – эфирное масло орегано  – эфирное масло орегано |

Единицы измерений СИ:

|  |  |
| --- | --- |
| г/л  кВ  мг/г | – грамм на литр  – киловольт  – миллиграмм на грамм |
| мм | – миллиметр |
| мл | – миллилитр |
| мкл | – микролитр |
| нм  нг/мкл  µm  S/cm | – нанометр  – нанограмм на микролитр  – микрометр  – сименс на сантиметр |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

**Введение**

**Общая характеристика работы.** Настоящая работа посвящена выделению и изучению уксуснокислых бактерий, способных продуцировать биоцеллюлозу.

**Актуальность исследования.** Целлюлоза – наиболее распространенный природный полимер, занимает первое место среди соединений органического происхождения на нашей планете. Из него состоят в основном стенки растительных клеток. В данном полимере больше пятидесяти процентов углерода, который содержится в растениях[1].

Целлюлоза - это полимер, который широко используется в различных промышленных областях. Её применяют в производстве ветеринарных продуктов питания, дерево и бумага, волокна и одежда. Целлюлоза имеет полусинтетические производные, которые широко используются в фармацевтической и косметической промышленности [2]. Простые и сложные эфиры целлюлозы представляют собой две основные группы производных целлюлозы с различными физико-химическими и механическими свойствами.  Из целлюлозы и ее эфиров получают ацетатный шелк, изготавливают ненатуральные волокна, пленку из ацетилцеллюлозы, которая не горит. Изготавливают бездымный порох из пироксилина. Из целлюлозы делают плотную медицинскую плёнку (коллодий) и целлулоид (пластмассу) для игрушек, кинопленки и фотопленки. Делают нитки, канаты, вату, различные виды картона, строительный материал для судостроения и постройки домов. Из клетчатки получают глюкозу (для медицинских целей) и этиловый спирт. Целлюлозу применяют и в качестве сырья, и в качестве вещества для переработки химическим путем [3].

Самым коммерчески используемым природным источником целлюлозы является древесина из-за ее высокой доступности, которая отвечает требованиям бумажной промышленности [4]. Однако многие растения также содержат большое количество целлюлозы, например, конопля, лен или хлопок [5]. В дополнение к этим источникам, целлюлоза может производиться, среди прочего, водорослями, грибами и некоторыми видами бактерий, наиболее примечательными из которых являются непатогенные бактерии рода Komagataeibacter, такие как K. xylinus, ранее *Acetobacter* и *Gluconacetobacter* [6]. Некоторые штаммы K. xylinus продуцируют внеклеточную целлюлозу, образуя биопленку разной толщины с целью поддержания высокой оксигенации колоний у поверхности, которая служит защитным барьером от высыхания, естественных врагов и радиации.

Помимо биоразлагаемости, не токсичности и биосовместимости, одним из основных преимуществ бактериальной целлюлозы (БЦ) перед растительной целлюлозой является ее уникальная природная чистота, которая позволяет напрямую использовать ее. Она химически эквивалентна растительной целлюлозе, но не содержит побочных продуктов, таких как лигнин, пектин, гемицеллюлоза и других компонентов лигноцеллюлозных материалов [7,8]. БЦ образуется путем ферментации и содержит микробные клетки, питательные вещества и другие вторичные метаболиты, которые могут быть легко удалены, давая высокочистую целлюлозу. Хотя молекулярная формула БЦ аналогична растительной целлюлозе, механические и физические свойства биоцеллюлозы обусловлены её уникальной трехмерной структурой, которая значительно отличается от структуры растительного источника, поскольку БЦ формируется с образованием длинных фибрилл шириной 1,5 нм, обеспечивая более высокую площадь поверхности, эластичность, прочность и гибкость. Биоцеллюлоза представляет собой уникальную сетчатую сеть из тонких волокон, диаметр которых более чем в 100 раз меньше, чем у волокон растительного происхождения [4].

В этой связи отмечается рост числа публикаций и конференций, посвященных получению и использованию биоцеллюлозы в различных отраслях биотехнологии.

В настоящее время в мировой практике внеклеточная бактериальная целлюлоза получила широкое применение в ряде отраслей производства: для создания биофильтров, для иммобилизации микроорганизмов и ферментов; в бумажной и упаковочной промышленностях. В текстильной промышленности бактериальную целлюлозу используют для создания новых тканей, в медицине для производства искусственной кожи, бинтов, имплантов, сердечных клапанов, контактных хрусталиков и др.; в высокотехничной промышленности для производства новых материалов, нанокомпозитов, в экологии для очистки сточных вод и т.д.

В Казахстане природные микробные штаммы продуценты биоцеллюлозы и их метаболическая активность мало изучены, и данный ценный биотехнологический продукт не производится, что делает задачу их исследования весьма актуальной. Этой темой занимаются КазНУ им аль-Фараби лаборатория прикладной микробиологии и РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК лаборатория экологической биотехнологии.

Таким образом предлагаемая работа позволит восполнить этот пробел и создать основы для технологии производства бактериальной наноцеллюлозы, создать и пополнять коллекцию эффективных штаммов продуцентов биоцеллюлозы.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы являлось выделение и изучение эффективного штамма продуцента биоцеллюлозы. Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Поиск и выделение бактерий продуцентов биоцеллюлозы. Изучение морфологических, физиологических и культуральных свойств бактерий. Идентификация отобранных штаммов бактерий продуцентов;
2. Оптимизация условий культивирования штаммов продуцентов по физико-химическим параметрам;
3. Исследование биохимического состава и физических свойств пленок бактериальной целлюлозы, полученных при культивировании штамма в поверхностных условиях;
4. Изучение способности пленок биоцеллюлозы адсорбировать антимикробные соединения и оценка антимикробных свойств.

**Объекты исследования:** уксуснокислые бактерии, продуценты биоцеллюлозы.

**Методы исследования:** микробиологические методы получения бактерий, продуцентов биоцеллюлозы, молекулярные методы, физико-химические и биохимические методы анализа, статистические методы для обработки данных экспериментов.

**Научная новизна исследований.** Впервые в Казахстане проведены исследования по изучению бактерий, продуцентов биоцеллюлозы. Методом многоступенчатого скрининга с использованием селективных жидких и полужидких сред были выделены новые штаммы продуценты биоцеллюлозы GH1, GH2 и GV1. На основании морфофизиологических, культуральных свойств и молекулярно-генетического анализа установлена их принадлежность к видам *Komagataeibacter sp*. и *Komagataeibacter europaeus.*

Методом сканирующей электронной микроскопии, выявили, что бактериальная целлюлоза, синтезируемая тремя штаммами *Komagataeibacter,* имеет высокую степень кристаличности. Штамм *Komagataeibacter europaeus* GH1 обладает удерживающей способностью эфирного масло орегано до 50%. Нативный полимер трех штаммов содержит 97-98% влаги, 0,65% белка, жиров следы.

При поверхностном культивировании в оптимальных условиях среды максимальный выход биоцеллюлозы штамма *Komagataeibacter europaeus* GH1 составил 12,6 г/л, у штамма *Komagataeibacter sp.* GH2 – 10,04 г/л, у штамма *Komagataeibacter sp.* GV1 – 9,06 г/л.

**Практическая ценность.** Выделенный штамм *Komagataeibacter europaeus* GH1 депонирован в коллекции микроорганизмов РГП «НЦБ» КН МОН РК с коллекционным номеромIMD – B – 352 как продуцент биоцеллюлозы *Komagataeibacter sp.* GH1.

Подобраны оптимальные условия для культивирования штаммов уксуснокислых бактерий. Питательная среда HS следующего состава: 2,0% D-декстрозы, 0,5% дрожжевого экстракта, 0,5% пептона, 0,27% Na2HPO4, 0,115% лимонной кислоты, pH – 4,8, 1% этиловый спирт. Температура культивирования 30 °С.

Доказано, что пленки бактериальной целлюлозы штамма *Komagataeibacter europaeus* GH1, абсорбированные эфирным маслом орегано обладают антимикробными свойствами и могут быть рекомендованы для разработки пищевых упаковок.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту.**

1. Результаты поиска и выделения бактерий, продуцентов биоцеллюлозы. Результаты морфологических, физиологических и культуральных свойств бактерий продуцентов. Результаты идентификации отобранных штаммов продуцентов;
2. Результаты оптимизации условий культивирования штаммов продуцентов по физико-химическим параметрам;
3. Результаты исследования биохимического состава и физических свойств пленок бактериальной целлюлозы, полученных при культивировании штаммов бактерий в поверхностных условиях;
4. Результаты изучения способности пленок биоцеллюлозы адсорбировать антимикробные соединения и оценки антимикробных свойств.

**Связь работы с научно-исследовательскими программами.** Диссертационная работа выполнена в рамках научного проекта «Поиск и получение эффективного продуцента биоцеллюлозы, перспективного для использования в медицине и биотехнологии», (№ гос. рег. 0118РК00900) по бюджетной программе 217 «Развитие науки» подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований», финансируемой МОН РК на 2018-2020 годы.

**Результаты исследования.**

1. Отобраны три изолята уксуcнокислых бактерий, способных продуцировать целлюлозу на простых питательных средах с углеводами. Идентификация бактерий по морфолого-физиологическим свойствам и генетическим методом, показала их принадлежность к роду *Komagataeibacter.*
2. Подобраны условия культивирования штаммов продуцентов биоцеллюлозы по физико-химическим параметрам и определено, что штаммы GH1 и GH2 дают наибольший выход биоцеллюлозы при рН 4,8 и температуре 30°С, а штамм GV1 при рН 5,5 и температуре 27°С. Оптимальной питательной средой для максимального выхода целлюлозы у исследуемых штаммов является среда HS (Hestrin-Shramm). Также выход бактериальной целлюлозы увеличивается при добавлении 1% этилового спирта в питательную среду. Накопление биоцеллюлозы в наибольшем количестве достигается при культивовании микроорганизмов на среде с 2% глюкозой. В результате оптимизации условий культивирования выход сухой массы биоцеллюлозы составил 12,6 г/л у штамма GH1; 10,04 г/л – GH2 и 9,06 г/л – GV1.
3. Биохимический состав и физические свойства биоцеллюлозы показали, что в пленке БЦ, продуцируемой разными штаммами, после ее очистки содержание общего белка у GH1 - 0,66%; GH2 – 0,65%; GV1 – 0,64%, содержание жиров – следы, а степень конверсии целлюлозы в глюкозу составило от 45-63%, количество влаги в нативном полимере у трех штаммов составила 97-98%. Разные штаммы вырабатывают БЦ различной морфологии сети и толщины волокон. Морфология пленок биоцеллюлозы методом сканирующей электронной микроскопии показала, что образцы состоят из трехмерных пористых сетчатых структур, состоящие из случайно расположенных ленточных ультрадисперсных фибрилл.
4. Исследована способность пленок биоцеллюлозы адсорбировать антимикробные соединения, и в результате работы было выявлено, что пленки БЦ, пропитанные эфирным маслом орегано обладают хорошей удерживающей способностью и составило 50 %. Оценка антимикробных свойств против штаммов рода *Cronobacter* показала, что БЦ продуцируемая *Komogataeibacter europaeus* GH1, пропитанная ЭМО, проявляет сильный антимикробный эффект против всех штаммов *Cronobacter* от 16,39 ± 0,7 мм до 32,75 ± 2,8 мм зоны ингибирования.

**Апробация работы.** Основные положения и результаты диссертации представлены: в сборнике тезисов 23-ей международной Пущинской школе конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Пущино, 2019); Материалах Международной научной конференции «Europеan Biothecnology Congress» (Valencia, 2019); в научном журнале Eurasian journal of Applied Biotechnology (Нур-Султан, 2019); в сборнике тезисов Всероссийской международной конференции «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019); Polymers (Basel, 2020); Microbiology Resource Announcements (USA, 2020).

**Публикации.** Результаты научной работы опубликованы в 7 печатных изданиях, в том числе 1 в издании по перечню Комитета по контролю в сфере образования и науки министерства образования и науки Республики Казахстан, 3 в сборниках международных научно-практических конференций, 2 в изданиях, входящие в базу данных компании Web of Science (Polymers, IF-4,329) и Scopus (Microbiology Resource Announcements, процентиль 19) и 1 патент Республики Казахстан на полезную модель «Штамм *Komogataeibacter sp*. GH1, продуцирующий биоцеллюлозу, для использования в медицине и биотехнологии».

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из списка обозначений и сокращений, введения, обзор литературы, материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения и списка использованных источников.

**1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

**1.1 Характеристика биоцеллюлозы**

Целлюлоза – один из самых распространенных биополимеров в природе. В промышленности целлюлоза используется как в исходной, так и в модифицированной форме, последние называются производными целлюлозы. Эти производные используются в различных отраслях промышленности, таких как фармацевтика, пищевая промышленность, косметология, и могут применяться в твердой или полутвердой форме. Одно из важных применений - это использование некоторых типов производных целлюлозы в качестве адсорбентов как для ионов металлов, так и для других молекул. Примером может служить обеззараживание сточных вод, так как с развитием промышленности некоторые источники воды подвергаются опасности, и обеззараживания обычными средствами зачастую недостаточно, отсюда и необходимость в новых методах. Основное преимущество использования натуральных полимеров в том, что они поддаются биологическому разложению, так как очень важно, чтобы продукт исчез после выполнения своего предназначения. Примером природного полимера является синтезируемая бактериями целлюлоза, также известная как бактериальная целлюлоза (БЦ). За последнее десятилетие БЦ была предметом многих исследований, в первую очередь то, что это чистый полимер, который сильно отличается по физическим и химическим свойствам от растительной целлюлозы, а также потому, что его легко производить [9].

Бактериальная целлюлоза, является одним из природных и экологически чистых биополимеров, производимых отдельными видами уксуснокислых бактерий, и является многообещающим нанобиоматериалом с уникальными свойствами [10,11].

Биоцеллюлоза была впервые описана Muhlethalerin в 1949, где автор показал, что волокна бактериальной целлюлозы примерно в 100 раз меньше, чем у растительной целлюлозы [12].

Биосинтез БЦ был впервые обнаружен у древних китайцев, производящих чайный гриб – ферментированный напиток, производимый симбиотической колонией уксуснокислых бактерий и дрожжей, заключенных в целлюлозный мат, образованный на поверхности напитка [13]. Некоторые возможные объяснения образования целлюлозы этими микроорганизмами заключаются в том, что бактериальная целлюлоза образуется как механизм самозащиты бактерий от разрушающего воздействия ультрафиолетового света или для того, чтобы помочь бактериям плавать на границе раздела воздух-жидкость, чтобы обеспечить достаточное поступление кислорода [14].

Биоцеллюлоза существует как основная структура фибрилл, которая состоит из β-1→4 глюкановой цепи с молекулярной формулой (C6H10O5)n. Цепи глюкана удерживаются вместе за счет меж- и внутриводородных связей и имеют линейное строение, вследствие чего она легко образует волокна (рисунок 1) [15].

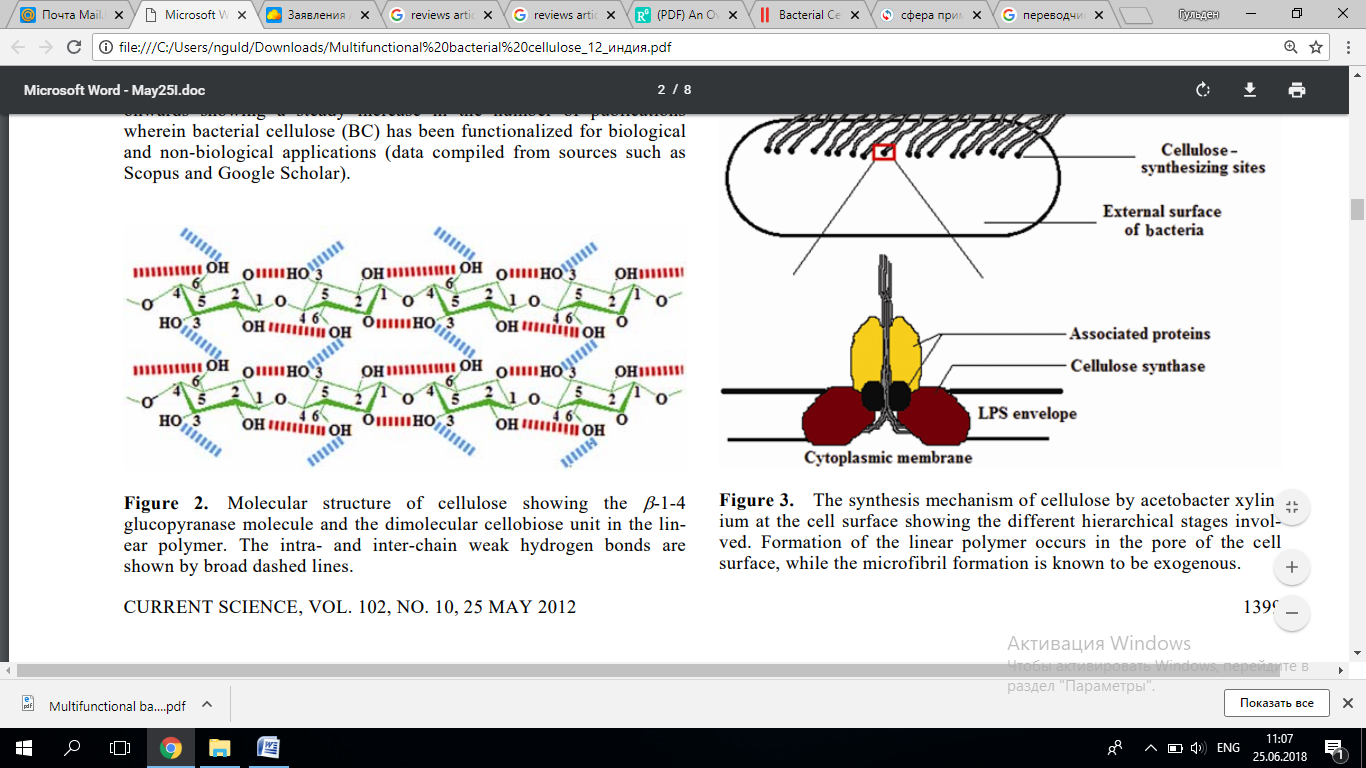


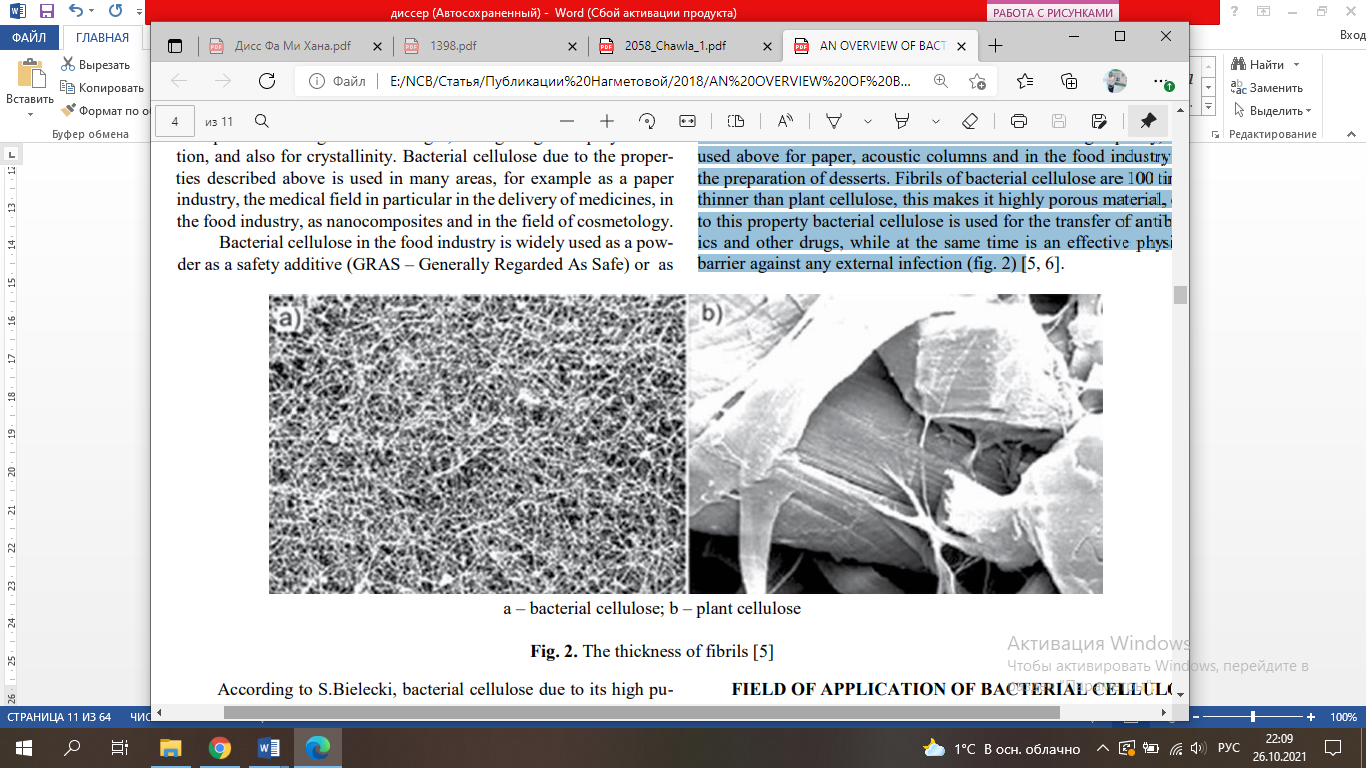
Рисунок 1**-** Молекулярная структура целлюлозы, демонстрирующая молекулу β-1-4 глюкопираназы, и блок из димолекулярной целлобиозы в линейном полимере. Внутри- и межцепочечные водородные связи показаны широкими пунктирными линиями [15]

Химическая структура бактериальной целлюлозы аналогична структуре растительной целлюлозы, но степень полимеризации отличается примерно от 13 000 до 14 000 для растений и 2000-6000 для бактериальной целлюлозы [16]. Единицы глюкозы в целлюлозе связаны вместе, образуя длинную прямую неразветвленную полимерную цепь и способность образовывать межмолекулярные водородные связи между соседними цепями глюкана чрезвычайно высоки.

С помощью рентгеноструктурного анализа Stainbuchel A. c соавторами показал, чтомолекулы бактериальной целлюлозы имеют нитевидную форму. Биоцеллюлоза разделена на 10–15 полимерных цепей, в результате чего образуются нановолокна, которые затем последовательно выстраиваются с образованием микрофибрилл. Затем микрофибриллы связываются вместе, образуя пучки. Группировка пучков микрофибрилл образует ленты из целлюлозы, которые имеют толщину 3–4 нм и ширину 70–80 нм. Эти ленты затем случайным образом переплетаются друг с другом, образуя плотную матрицу из целлюлозных волокон, которые образуются за счет прочного меж-и внутрихимического связывания [17].

Форма пленки микробной целлюлозы, по-видимому, поддерживается гидрофобными связями. Сообщается, что с течением времени в каждой пленке целлюлозы сначала возникают межмолекулярные и внутримолекулярные водородные связи, а затем формируется кристаллическая структура целлюлозы с развитием водородных связей между пленками целлюлозы [18].

W. Czaja с соавторами [19] изучали различия микрофибриллярной структуры бактериальной и растительной целлюлозы используя сканирующий электронный микроскоп (СЭМ), которая показана на рисунке 2.



a – бактеральная целлюлоза, b – растительная целлюлоза

Рисунок 2 – Микрофибриллярная структура целлюлозы [19]

Микробная целлюлоза, наблюдаемая с помощью СЭМ, показала значительную разницу во внешнем виде наружной и внутренней поверхностей пленок. Внешний вид имел неправильные скопления фибрилл, тогда как внутренняя поверхность была организована в виде пор. При большем увеличении было обнаружены пористые слои в бактериальной целлюлозе диаметром около 7 мм [20].

Бактериальная целлюлоза предпочтительнее, чем растительная целлюлоза, так как она может быть получена с более высокой чистотой и более высоким индексом кристалличности. Она также имеет более высокую прочность на разрыв и влагоудерживающую способность, чем у растительной целлюлозы, что делает ее более подходящим сырьем для производства высококачественных акустических систем, высокого качества бумаги и многое другое [21].

Фибриллы бактериальной целлюлозы примерно в 100 раз тоньше, чем у растительной целлюлозы, что делает его очень пористым материалом, что позволяет переносить антибиотики или другие лекарства в рану в то же время выступая в качестве эффективного физического барьера против любых внешних инфекций, поэтому широко используется при заживлении ран [22].

Электронно-микроскопические наблюдения показали, что целлюлоза, продуцируемая *Acetobacter xylinum*, встречается в форме волокон. Бактерии сначала секретировали структурно однородное слизистое вещество, внутри которого после непродолжительного времени образовались целлюлозные волокна. *Acetobacter xylinum* производит две формы целлюлозы: (Iα) целлюлоза I, ленточный полимер и (Iβ) целлюлоза II. Было выявлено, что целлюлоза Iα обладает более прочной кристаллической структурой, чем ленточный полимер Iβ. В бактериальной целлюлозе количество формы Iα составляет приблизительно 60 %, тогда как у некоторых представителей растительной целлюлозы такие как хлопок и рамах составляет всего лишь 30 %. В растительной целлюлозе доминирует форма Iβ [23].

Отличия в сборке целлюлозы I и целлюлоза II вне цитоплазматической мембраны описаны на рисунке 3.

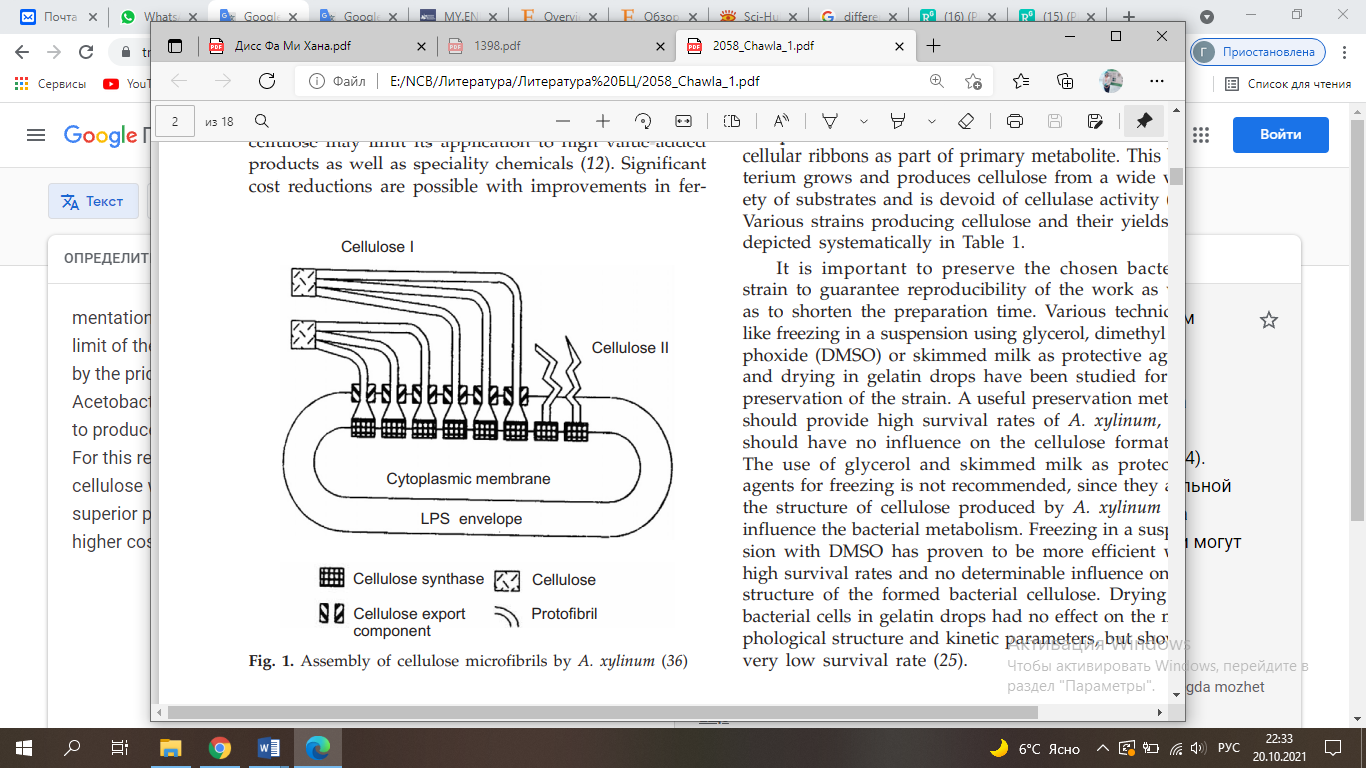


Рисунок 3 – Структура целлюлозы *Acetobacter xylinum* [24]

Микрофибриллярная структура бактериальной целлюлозы отвечает за большинство своих свойств, таких как она обладает высокой прочностью на разрыв, более высокую степень полимеризации и индекс кристалличности. Бактериальная целлюлоза используется как диетическое питание и в производстве новых материалов для высококачественных диафрагм, динамиков, медицинских прокладок [25] и искусственной кожи [26]. Так как бактериальная целлюлоза отличается от растительной, это позволило сравнить их некоторые свойства (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнение бактериальной и растительной целлюлозы

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Свойства | Растительная  целлюлоза | Бактериальная целлюлоза | Литература |
| Кристалличность | 59-64% | 65-79% | Mishra и др. 2018 |
| Степень полимеризации | ≥500 | 80-10 000 | Klemm и др. 2005 |
| Ширина волокна | 85-225 нм | 70-80 нм | Klemm и др. 2005 |
| Модуль юнга | 39-78 ГПа | 15-30 ГПа | Klemm и др. 2005 |
| Чистота | низкая | высокая | Pecoraro др. 2008 |
| Содержание влаги | 60% | 98,5% | Pecoraro др. 2008 |

По мнению S.Bielecki, [18] бактериальная целлюлоза благодаря своей высокой чистоте, высокой степени кристалличности (ее плотность колеблется от 300 до 900 г / м3), высокой абсорбционной и удерживающей способности является уникальным полимером. Что касается токсичности, были проведены тесты in vitro, измеряющие уровни токсичности бактериальной целлюлозы, не было выявлено побочных эффектов ни на культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека, ни на фибробласты, ни на хондроциты. Что касается нановолокон целлюлозы, полученные результаты были такими же [27,28]. Кроме того, на основании экотоксикологических оценок ряда водных пород, таких как дафния, радужная форель и плоскоголовая рыба, нанокристаллы целлюлозы несут более низкие уровни токсинов, а также минимальный риск для окружающей среды [29].

Макроскопическая морфология целлюлозы строго зависит от условий культивирования, которые легко адаптируется к физико-химическим свойствам.

Wanichapichart P. с соавторами [30] показали, что целлюлозное волокно имело степень полимеризации 793 с соответствующей молекулярной массой приблизительно 142,73 кДа. Целлюлоза растворима в концентрированных кислотах, таких как серная, соляная или азотная кислота. Она также растворима в 8,5% раствор NaOH. Растворимость целлюлозы в щелочи можно увеличить, добавив в раствор 1% мочевины [31]. При более высоких температурах (> 300 °C) биополимер разрушается, хотя целлюлозная мембрана, обработанная щелочью, более устойчива (между 343 и 370 °C). Композиты, приготовленные путем добавления бактериальной целлюлозы и микрофибриллированной целлюлозы, обработанной путем фибрилляции крафт-целлюлоза сравнивалась по механическим свойствам и было обнаружено, что прочность на изгиб увеличилась до 425 МПа, а модуль Юнга увеличился с 19 до 28 ГПа, практически сохраняя модуль упругости у бактериальной целлюлозы [32,33]. Механические свойства биоцеллюлозы обусловлены ​​уникальностью однородной наносетевой структуры.

J. George и др. [34] исследовали свойство набухания целлюлозы в разных условиях. Раствор NaOH при более низкой концентрации вызывала большее набухание волокон по сравнению с другими щелочами при тех же концентрациях. Было обнаружено, что процент увеличения массы целлюлозными мембранами после погружения в различные щелочные растворы находится в следующем порядке: NaOH> KOH> Na2CO3 > K2CO3.

Характеристики первапорации депротеинизированной микробной целлюлозной мембраны были исследованы в широком диапазоне исходных водно-этанольных составов, и было обнаружено, что она перспективна для дегидратации азеотропов этанола. [35].

Хорошо описаны основные характеристики целлюлозной мембраны в качестве среды для разделения молекул в водных условиях и с модификацией структуры путем химической обработки для контроля характеристики молекулярной проницаемости [36]. Наиболее привлекательной особенностью производства бактериальной целлюлозы является возможность контролировать и изменять не только физические характеристики, но и химический состав целлюлозного волокна [37]. Структуру целлюлозного узла можно изменить с помощью прямых красителей (амидный черный, трипановый красный), флуоресцентных осветляющих агентов (конго красный) или производных, таких как карбоксиметилцеллюлоза [38,39,40]. *Acetobacter xylinum* культивировали в среде HS (контрольная среда) и в среде HS, содержащей ацетил глюкоманнан. Присутствие в среде ацетил глюкоманнана препятствует сборке микрофибрилл целлюлозы и изменяет кристаллическую структуру целлюлозы [41]. Культивирование *A. xylinum* в среде HS, содержащей глюкуроноксилан (среда ксилана), показало рыхлые пучки микрофибрилл целлюлозы в среде, напротив, в пектиновой среде образовывались целлюлозные ленты. Глюкуроноксилан в среде препятствовал сборке микрофибрилл целлюлозы и изменял кристаллическую структуру целлюлозы, тогда как пектин в среде практически не влиял [42].

Основные работы по изучению бактериальной целлюлозы представлены наиболее значимыми продуцентами: *A. xylinum, K. nataicola, K*. *hansenii K. swingsii* и *K. Oboediens,* но целлюлоза также может встречаться и у других групп микроорганизмов.

**1.2 Продуценты биоцеллюлозы**

Впервые об *Acetobacter xylinum* в 1886 году сообщил A. J. Brown [43]. Он заметил, что покоящиеся клетки *Acetobacter* производят целлюлозу в присутствии кислорода и глюкозы. Единственная клетка *A. xylinum* способна полимеризовать 200 000 молекул глюкозы в секунду в β-1,4–глюкановые цепи, которые затем экскретируются в окружающую среду, формируя лентоподобные пучки микрофибрилл. Волокна синтезируются на мембранах с помощью синтазы целлюлозы, формируя трёхмерную сеть целлюлозных волокон.

Бактериальная целлюлоза является полисахаридом, который синтезируется рядом грамотрицательных бактерий из родов *Komagataeibacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achomobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Escherichia*, *Salmonella* [44].Целлюлоза также синтезируется грамположительные бактерии *Sarcina ventriculi*, составляющие около 15 % от общей массы сухих клеток [45].

Также целлюлоза встречается у таких групп микроорганизмов, как грибы и водоросли. У зеленых водорослей целлюлоза, ксилан или маннан могут служить структурными полисахаридами клеточной стенки. Целлюлоза содержится, хотя и в небольшом количестве, во всех бурых водорослях (*Phaeophyta*), в большинстве красные водоросли (*Rhodophyta*) и большинство золотистых водорослей (*Chrysophyta* (*Chrysophytes*)) [46]. Сообщалось также, что целлюлоза присутствует в некоторых грибах, образующих внутреннюю клетку пристеночный слой, обычно в сочетании с b-1 3/b-1 6- -связанный D-глюкан. У оомицетов хитин полностью замещен целлюлозой, составляя около 15 % от общей массы сухой клеточной стенки [47].

Основные продуценты бактериальной целлюлозы обнаружены среди уксуснокислых бактерий (УКБ). Уксуснокислые бактерии являются группой микроорганизмов, принадлежащих к семейству *Acetobacteraceae* класса *Alphaproteobacteria*. Эти бактерии широко обнаруживаются на фруктах, цветах и гниющей пище [48]. Их метаболическая уникальность используется в промышленном производстве сорбозы, витамина C, дигидроксиацетона, d-глюконовой кислоты и бактериальной целлюлозы [49].

Наиболее часто для получения бактериальной целлюлозы используют штаммы-продуценты *Acetobacter xylinum* или *Gluconacetobacter xylinum* [50]*.*

В настоящее время УКБ включает 14 родов, а именно *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Komagataeibacter*, *Granulibacter*, *Asaia*, *Acidomonas*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Tanticharoenia*, *Ameyamaea* и *Neokomagataea* [48]. Классификация внутри *Acetobacteraceae* зависит от типа убихинона, включая типы Q-9 и Q-10. Виды *Acetobacter* используют убихинон Q-9-типа, тогда как роды *Gluconacetobacter* и *Gluconobacter* содержат преимущественно убихинон Q-10 [51].

Исследования по биогенезису бактериальной целлюлозы впервые начаты Hestrin (1947), Colvin (1977) [52,53].

T. Asai (1935) предложил название рода *Gluconobacter* для уксуснокислых бактерий, способных окислять этанол до уксусной кислоты и глюкозу до глюконовой кислоты [54].

Общая классификация рода *Gluconacetobacter* (*Komagataeibacter*)основного продуцента бактериальной целлюлозы выглядит следующим образом:

Домен: [*Bacteria*](https://en.wikipedia.org/wiki/Bacteria)

Фил: [*Proteobacteria*](https://en.wikipedia.org/wiki/Proteobacteria)

Класс: [*Alphaproteobacteria*](https://en.wikipedia.org/wiki/Alphaproteobacteria)

Порядок: [*Rhodospirillales*](https://en.wikipedia.org/wiki/Rhodospirillales)

Семейство: [*Acetobacteraceae*](https://en.wikipedia.org/wiki/Acetobacteraceae)

Род: *Gluconacetobacter = Komagataeibacter*

Род содержит 24 вида бактерий. Из них наиболее значимые продуцентами являются виды *K. xylinum*, *K. nataicola, K*. *hansenii K. swingsii* и *K. Oboediens* [55].

Используя штаммы *Gluconacetobacter europaeus* (*G. europaeus*) и *G. xylinus*, Zeng и др. [56] пришли к выводу, что бактериальная целлюлоза с разными свойствами могут быть созданы разными бактериальными штаммами. Биоцеллюлоза, произведенная *G. europaeus*, показала чрезвычайно низкую плотность, более высокую пористость и меньшую толщину пленки, чем у *G. xylinus*. Сверхкритически высушенная биоцеллюлоза *G. europaeus* показала хорошую водопоглощающую способность (в 110 раз больше сухой массы) по сравнению с таковой у *G. xylinus* (в 66 раз больше сухой массы). Кроме того, БЦ, произведенная *G. europaeus*, продемонстрировала надежные механические свойства независимо от метода сушки с более высоким параметром упругости по сравнению с БЦ у *G. xylinus*.

Биоцеллюлоза *G. europaeus* имела относительно более высокую глубину проникновения, более низкую твердость и более низкий модуль Юнга в случае сублимационной сушки и сушки при комнатной температуре [56]. Относительно тонкие фибриллы БЦ (5-10 нм), продуцируемые *Asaia bogorensis*, указывают на вариации в биосинтезе или организации сайтов синтеза между бактериальными штаммами [57].

Кроме того, генетически модифицированный *G. xylinus* с генами *Candida albicans* способен производить БЦ с улучшенной биоразлагаемостью in vivo. Синтаза целлюлозы у *G. xylinus* может потреблять как UDP-глюкозу, так и UDP-N-ацетилглюкозамин (UDP-NAcG) в качестве субстратов [58]. Присутствие NAcG делает БЦ уязвимым для действия лизоцима, а также нарушает высокоупорядоченную кристаллическую структуру целлюлозы. Биоцеллюлоза, продуцируемая сконструированным штаммом, содержал NAcG и демонстрировал половину кристалличности по сравнению с исходным штаммом. Более того, бактериальная целлюлоза полностью разложилась за 10 дней [59].

Способность к синтезу БЦ помимо УКБ обнаружена у широкого круга микроорганизмов из родов *Aerobacter, Achromobacter, Azotobacter, Rhizobium, Agrobacterium, Rhodobacter,* и *Sarcina* [60].

Выделяются новые продуценты биоцеллюлозы. Так, в 2016 году [W. Voon](https://www.semanticscholar.org/author/W.-Voon/143776026) с соавторами (малазийские исследователи) выделили новые продуценты биоцеллюлозы с высокой продуктивностью. Было выделено три штамма бактерий, продуцирующих биоцеллюлозу, из плодов сметанного яблока. Культуры были определены как *Stenotrophomonas maltophilia* WAUPM42, *Pantoea vagans* WAUPM45 и *Beijerinckia fluminensis* WAUPM53 [61].

Также недавно другие малазийские ученые N. Salman c соавторами выделили и идентифицировали продуценты биоцеллюлозы, выделенные из местных фруктов таких как: ананас, амбарелла, гуава, памело и др. В результате было выделено семь активных штаммов с высокой продуктивностью. Культуры были идентифицированы как *Enterobacter sp.* B01, *Kosakonia cowanii* K01, *Klebsiella varicola* J02, *Pantoea anthophila* B02, *Endophytic bacterium* SV845 M02 и *Pantoea ananatis* M03 [62]. Найдены новые продуценты бактериальной целлюлозы среди представителей рода *Rhodococcus* [63] и *Leifsonia* [64]. Было интересно сравнить данные по выходу бактериальной целлюлозы у различных штаммов (таблица 2).

Таблица 2 – Данные по выходу биоцеллюлозы у разных штаммов

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Микроорганизм | Источник углерода | Продуктивность биоцеллюлозы, г/л | Источники |
| *Gluconacetobacter intermedius* SNT–1 | глюкоза | 10,0 | 65 |
| *Gluconacetobacter xylinus* | глюкоза | 15,6 | 66 |
| *Gluconacetobacter xylinus* ATCC 53524 | сахароза | 3,83 | 67 |
| *Gluconobacter xylinus* KCCM 41431 | глицерол | 3,4 | 68 |
| *Komagataeibacter rhaeticus* strain PG2 | глицерол | 8,7 | 69 |
| *Gluconacetobacter* sp. RKY5 | глицерол | 5,63 | 70 |
| *Komagataeibacter europaeus* SGP37 | глюкоза | 9,98 | 71 |
| *Gluconacetobacter medellinensis* | отходы ананаса и сахарного тростника | 3,24 | 72 |
| Продолжение таблицы 2 | | | |
| *Acetobacter xylinum* TISTR 107 | сок рамбутана | 5,89 | 73 |
| *Acetobacter xylinum* BPR2001 | меласса сахарного тростника | 7,8 | 74 |
| *Komagataeibacter xylinus* BPR 2001 | меласса сахарного тростника | 7,5 | 75 |
| *Gluconacetobacter xylinus* KCCM 41431 | сырой глицерол | 6,95 | 76 |
| *G. sucrofermentans* B–11267 | тонкая барда | 6,19 | 77 |
| *Gluconacetobacter sacchari* | виноградная пленка | 0,6 | 78 |
| *Gluconacetobacter xylinus ATCC 23770* | пшеничная солома | 8,2 | 79 |
| *Komagataeibacter hansenii* GA2016 | мандариновая кожура | 3,92 | 80 |
| *Komagataeibacter rhaeticus* | экссудат дерева кешью | 6,0 | 81 |

Как видно на данной таблице для производства бактериальной целлюлозы используют различные штаммы и выход продукта составляет от 3 до 15 г/л. Данные штаммы культивировались с использованием чистых химических веществ такие как сахара (глюкоза, сахароза, фруктоза, глицерин, маннит и арабиноза) в качестве источника углерода, дрожжевой экстракт и пептон в качестве источников азота и витаминов, а также на различных субстратах: лигноцеллюлозная биомасса, фруктовые соки, меласса сахарного тростника, промышленные и пищевые отходы.

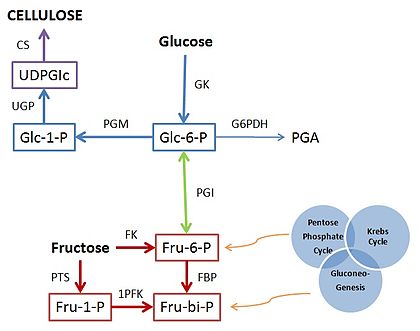
Производство БЦ зависит от соответствующих условий культивирования, которые включают состав питательной среды (синтетическая и натуральная среда), температуру, рН и методы культивирования при перемешивании или в статике. Выбор тех или иных условий культивирования зависит от цели, поскольку эти условия оказывают существенное влияние на свойства структуры, физико-механические свойства БЦ. Хотя несколько видов микроорганизмов способны продуцировать целлюлозу, *A. xylinum* в настоящее время считается модельным организмом для изучения этих биополимеров.

* 1. **Механизм синтеза биоцеллюлозы**

Sutherland I.W. описал синтез бактериальной целлюлозы микробными клетками как четырехэтапный процесс, включающий активацию моносахаридов посредством образования глюкоза-нуклеотидов, полимеризацию повторяющихся единиц глюкозы посредством их последовательного добавления, одновременное добавление ацильных групп (если они присутствуют) на отдельные единицы глюкозы и выведение целлюлозных волокон через комплекс стенка/мембрана во внеклеточную среду.

Синтез бактериальной целлюлозы включает производство UDP-глюкозы, которая служит предшественником для синтеза. За этим процессом следует полимеризация отдельных единиц глюкозы в форму β-1,4 цепи глюкана. Отдельные цепи выводятся через терминальные комплексы и образуют ленточные структуры, состоящие из сотен и тысяч отдельных цепочек. Эти ленточные структуры, в свою очередь, образуют фибриллы [82]. Каждая биохимическая стадия в пути синтеза бактериальной целлюлозы регулируется доступностью определенных ферментов, субстратов и кофактора (если требуется), что в противном случае приводит к отмене метаболического пути.

Пути и механизмы синтеза уридиндифосфат глюкозы (UDPGlc) относительно хорошо известен, тогда как молекулярные механизмы полимеризации глюкозы в длинные и неразветвленные цепи все еще нуждаются в изучении. Биохимические реакции синтеза целлюлозы с помощью *A. xylinum* широко описаны [83,84]. Это точно и специфически регулируемый многоступенчатый процесс, в котором задействовано большое количество отдельных ферментов и комплекса каталитических и регуляторных белков (рисунок 4).

****

CS – синтетазацеллюлозы, GK – глюкокиназа, FBP – фруктозо-1,6-бифосфат фосфотаза, FK – фруктокиназа, 1FРk – фруктозо-1-фосфата,

PGI – фосфорглюкоизомераза, PMG – фосфоглюкомутаза,

PGA – фосфоглюконовая кислота, PTS – система фосфотрансферазы,

UGP – пирофосфорилаза уридина дифосфорглюкозы, UDPGlc – уридин дифосфорглюкоза, G6PDH – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа,

Рисунок 4– Биохимический путь синтеза бактериальной целлюлозы [85]

Процесс включает образование UDPGlc, который является предшественником образования целлюлозы, с последующей полимеризацией глюкозы в цепь β-1,4 глюкана и возникающую цепь, которая образует ленточную структуру цепей целлюлозы, образованных сотни или даже тысячи отдельных цепочек целлюлозы, их экструзия за пределы клетки и самосборка в фибриллы [86].

У *A. xylinum* синтез целлюлозы тесно связан с катаболическими процессами окисления и потребляет до 10% энергии, получаемой в результате катаболических реакций. Производство бактериальной целлюлозы не мешает другим анаболическим процессам, в том числе синтезу белка. *A. xylinum* следует либо пентозофосфатному циклу, либо циклу Кребса, связанному с глюконеогенезом [87, 88].

Благодаря ферментации сахаров *A. xylinum* внеклеточно продуцирует бактериальную целлюлозу в четырех алломорфных формах, I – IV; тем не менее, наиболее широко изучаются целлюлозы I и II. Не совсем понятно, почему эти бактерии производят целлюлозу таким образом, но широко распространено мнение, что внеклеточная целлюлоза, которая образует пелликулу на поверхности роста среды, позволяет поддерживать достаточную оксигенацию для роста колоний у поверхности и предотвращать высыхание бактериальных колоний [89]. Биосинтез целлюлозы начинается с того, что бактерии пассивно поглощают глюкозу из окружающей среды, которая затем изомеризуется из глюкозо-6-фосфата в глюкозо-1-фосфат. Затем этот изомер реагирует с уридин-5-трифосфатом (UTP), который образует уридиндифосфат глюкозу, UDP-глюкозу. Эта UDP-глюкоза затем катализируется синтазой целлюлозы с образованием линейных 1,4-глюкановых цепей, которые активируются циклическим ди-GMP. Эти целлюлозные цепи затем выводятся через поры в стенке бактериальной клетки. Однако, если бактериям не хватает источника глюкозы, будет задействован путь фруктозы с использованием соответствующих ферментативных процессов [90].

Биохимические пути модулируются специфическим опероном, называемым синтезом бактериальной целлюлозы ABCD (bcsABCD), который был идентифицирован в *Gluconacetobacter xylinum* в 1999 [91]. Первый ген оперона bcsABCD, bcsA, отвечает за кодирование каталитической субъединицы фермента, целлюлозосинтазы. Второй ген, bcsB, отвечает за производство регуляторной субъединицы, обнаруженной на целлюлозосинтазе, которая связывается с c-di-GMP, и это особенно важно, поскольку это взаимодействие запускает производство целлюлозы. Функции bcsC и bcsD еще полностью не изучены; однако было высказано предположение, что bcsC играет роль в образовании пор в клеточной мембране, а белки, которые он кодирует, подобны порообразующим белкам [92,93].

После успешной ферментации полученная пленка содержит целлюлозу, вторичные метаболиты, микробную биомассу и оставшиеся питательные вещества из питательной среды, которые можно легко удалить для получения кристаллической целлюлозной матрицы высокой степени чистоты. Хотя молекулярная формула бактериальной целлюлозы и растительной целлюлозы очень схожа, общие физические и химические свойства каждой формы целлюлозы значительно различаются [93].

**1.4 Факторы, влияющие на синтез биоцеллюлозы**

Большая часть бактериальной целлюлозы производится с помощью обычного метода статической ферментации, или по-другому так называемый поверхностный способ, при котором клетки *Komagataeibacter xylinum* могут расти в неглубоких контейнерах с определенной питательной средой в инкубаторе при 30 °C в течение 7–14 дней, после чего на поверхности питательной среды образуется толстая пленка целлюлозы, которую легко собирать. После образования пленки биоцеллюлозы ее необходимо очистить от бактериальных клеток, для этого используют раствор NaOH. Процесс получения бактериальной целлюлозы показан на рисунке 5 [94].

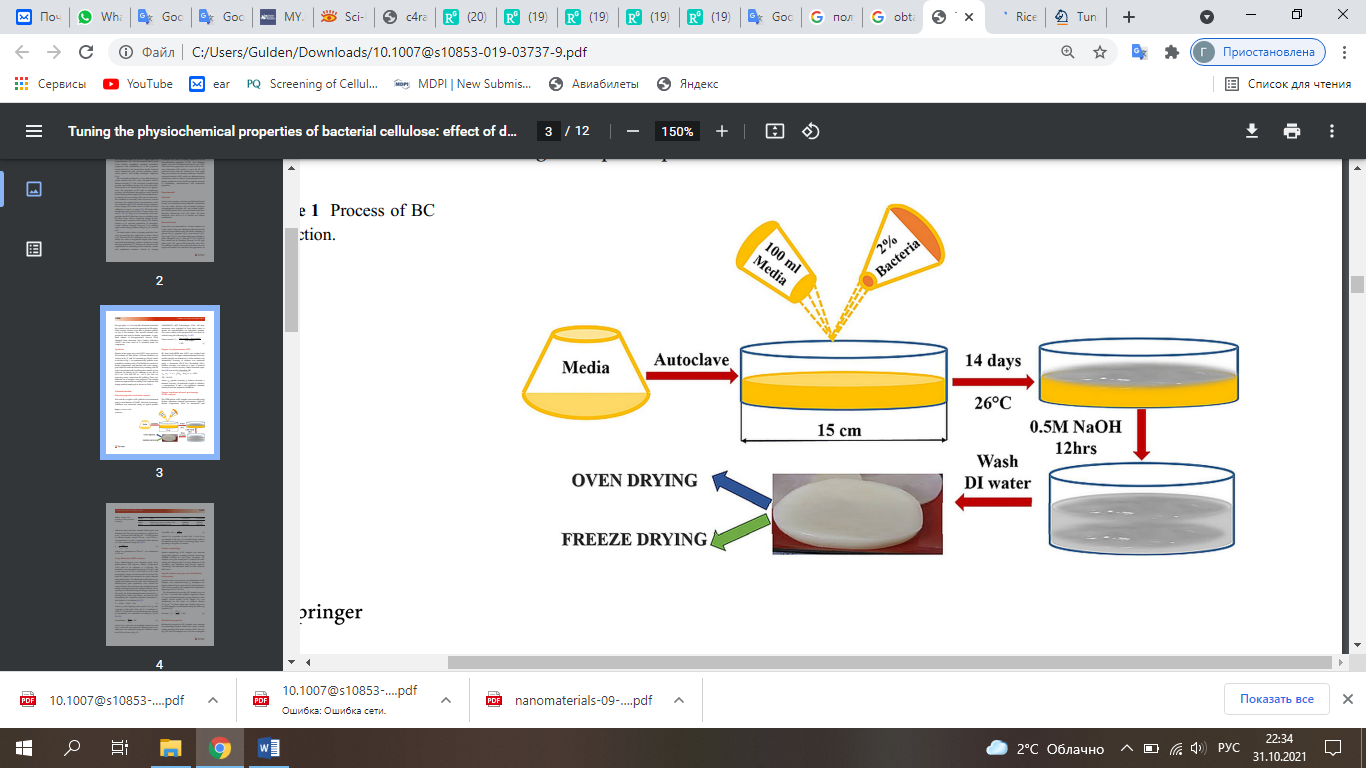


Рисунок 5 – Процесс образования биоцеллюлозы [95]

При производстве бактериальной целлюлозы могут использоваться статические, перемешиваемые или биореакторные методы ферментации. При статическом методе ферментации БЦ формируется в культуральной среде в виде пленки на границе раздела фаз воздух-жидкость, способствуя созданию более тонких трехмерных сетчатых структур и превосходным механическим свойствам [96, 97]. Напротив, при перемешивании БЦ образуется в виде волокнистых гранул или нитей с меньшей степенью полимеризации, механической стойкости и кристалличности, чем пленки, образующиеся при статической ферментации. Тем не менее, ферментация с перемешиванием широко используется в коммерческих целях, поскольку она позволяет получить БЦ за меньшее время, а также обладает экономической целесообразностью и желаемым применением [98], такие как иммобилизация белков и липазы, высвобождение лекарств и абсорбция нанокомпозитов [99].

Ферментация в биореакторе, в которой могут использоваться как статические, так и перемешиваемые культуры, представляет собой альтернативный метод, классифицируемый с точки зрения использования обогащенного кислородом воздуха, вращающегося диска или подложки из биопленки, оснащенной вращающимся фильтром или силиконовой мембраной [99, 100]. Среди биореакторов тип бака с мешалкой наиболее часто используется в ферментационной промышленности. В этом биореакторе суспензия БЦ с высокой плотностью клеток генерирует высоковязкую жидкость, предел переноса кислорода и большую приобретаемую мощность перемешивания, увеличивая потребление энергии. Другим распространенным типом ферментационного реактора является эрлифтный биореактор, который более энергоэффективен с меньшим напряжением сдвига, чем реакторы с мешалкой [101, 102].

Таким образом, биореактор имеет ряд преимуществ: высокую плотность клеток, высокую производительность непрерывного производства и высокой объемной способности переноса кислорода. Однако, в зависимости от операции, механические свойства прочности на растяжение БЦ могут снижаться [96]. По этой причине выбор метода ферментации зависит от физических, морфологических и механических характеристик, необходимых при применении БЦ [99].

Помимо выбора микроорганизмов и метода ферментации, большое влияние на производство БЦ оказывает выбор условий культивирования. Примером этого является важность контроля таких параметров, как температура и рН, независимо от того, насколько субстраты и ко-субстраты, используемые в производстве БЦ, способны повысить свою продуктивность. Это связано с тем, что каждый микроорганизм имеет оптимальную температуру и оптимальный рН для своего роста, что, в свою очередь, влияет на его выход [103].

В зарубежных источниках опубликовано большое количество исследований по оптимизации условий культивирования для увеличения выхода бактериальной целлюлозы разными штаммами. Hutchens и др.  [104], Dobre и др. [105], Zeng и др. [106], Campano с соавт. [107] исследовали влияние параметров на продуктивность бактериальной целлюлозы, предоставив в литературе диапазоны этих параметров и источники субстратов и ко-субстратов, обычно применяемых в условиях культивирования (рисунок 6).

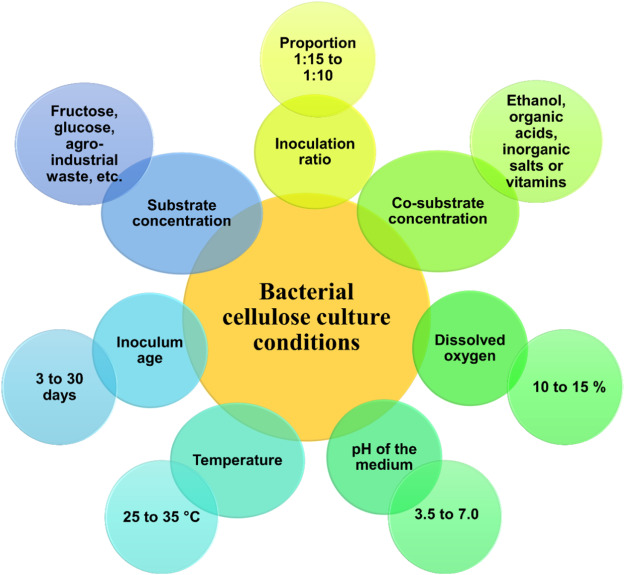


Рисунок 6 – Факторы, влияющие на синтез биоцеллюлозы [108]

Источники азота, такие как пептон, дрожжевой экстракт, экстракты чая (зеленый чай, чайный гриб, черный чай), глутамат натрия, гидролизованный казеин, сульфат аммония и глицин, являются основными субстратами в клетке для роста микроорганизмов [109]. Другими благоприятными субстратами для производства БЦ являются неорганические соли и органические питательные вещества [110]. Так, динатрийфосфат (Na2HPO4), соли магния, соли серы и калия [103] являются одними из наиболее распространенных солей, используемых в культуральной среде, а также органические кислоты (такие как уксусная, лимонная, яблочная и молочная) [103,111], витамины (в виде аскорбиновой кислоты) [112] и жирные кислоты (из растительных масел, таких как рапсовое) [113] относятся к часто используемым органическим питательным веществам. Помимо них, для оптимизации производства БЦ может быть использован этанол, так как он, помимо того, что является дополнительным источником углерода, способным значительно повысить продуктивность, способствует блокированию накопления бактерий, приспосабливающихся к негативным мутациям в целлюлозе [100].

Хотя сопутствующие субстраты влияют на производство БЦ, источник углерода считается одним из наиболее важных факторов эффективной оптимизации. Углерод используется микроорганизмом для превращения субстрата в целлюлозу. В течение последних десятилетий исследователи искали альтернативные источники углерода, которые отличались бы от тех, которые использовались в течение многих лет в производстве БЦ, таких как глюкоза, фруктоза и глицерин. Это связано с тем, что питательная среда составляет примерно 30% от общей стоимости производства БЦ, и ее состав может влиять на эффективность производства [103, 114]. Остаточные продукты молочной промышленности, ананасового агробизнеса, биодизельной и кондитерской промышленности, пшеничная солома, фруктовые соки, гнилые фрукты, патока и другие стали использоваться в качестве источника питательных веществ для низкозатратного производства БЦ. Помимо вышеупомянутых источников углерода, исследователи представили альтернативные субстраты для производства БЦ, такие как жмыховая кислота и ферментативные гидролизаты [115], гидролизат кукурузной кислоты, экстракт личи и сточные воды (после ферментации липидов, ацетон-бутанол-этанольного брожения или винокурни) [116].

Revin и др. [77], используя кислые побочные продукты спиртовой и молочной промышленности в качестве источника углерода, получили значения в три раза выше, чем у стандартной среды HS (2,14 г/л). Аналогичным образом, используя источники углерода из свекольной патоки и сырной сыворотки, Salari et al. [117] получили значения выше, чем для стандартной среды HS (3,26 г/л). Оба исследования показали, что оптимизация среды повлияла только на микроморфологию и кристалличность БЦ, но не на химическую структуру мембраны. M. Abdelraof и др. [118] показали, что включение нанобиоактивного стекла в ферментацию in situ увеличивает выход БЦ в 1,8 раза. Кроме того, оптимизация среды может улучшить механические, противомикробные и биосовместимые свойства.

J. Ye и др. [119] использовали экстракты остатков табака, не содержащие никотина, в культуральной среде БЦ, а также применили двухэтапную стратегию ферментации для максимального использования субстрата, таким образом получив продукцию, в 1,6 раза превышающую производительность среды HS. Эти мембраны приобрели свойства, аналогичные свойствам среды HS, в основном в отношении кристалличности.

Добавляя 1% рапсового масла в культуральную среду, Żywicka et al. [113] ​​получили выход >600%, то есть в семь раз больше, чем выход, полученный в стандартной среде HS (1 г/л). Более того, эта оптимизация способствовала значительному увеличению водопоглощающей способности и механической прочности БЦ, в то время как Bilgi et al. [118] получили производство БЦ 1,79 г/л в оптимизированной среде, содержащей рожковое дерево с белой фасолью в качестве источника углерода. Это значение было в 3,8 раза выше, чем на стандартной среде HS (0,47 г/л).

Оптимальные значения рН среды для культивирования продуцентов биоцеллюлозы находятся в диапазоне 4,0-6,0. Также следует отметить, что при рН ниже 4,0 синтез бактериальной целлюлозы уменьшается так как во время культивирования происходит накопление глюконовой, уксусной и молочной кислот [120]. Температура культивирования во многих исследованиях варьируется от 28-30 °С, в этом диапазоне наблюдается наибольшее количество бактериальной целлюлозы [121].

* 1. **Применение биоцеллюлозы в различных сферах деятельности**

Бактериальная целлюлоза имеет такие свойства, как высокая чистота, высокая степень кристалличности, высокая плотность, высокая проницаемость для жидкостей и газов, а также высокую способность поглощать воду (содержание воды> 90%) [122,123] и большую площадь поверхности по сравнению с природной целлюлозой, также является нетоксичным материалом, биосовместимый с кожей человека и животных [22,124]. Благодаря всем этим свойствам биоцеллюлоза может быть использована в различных сферах деятельности.

Область применения бактериальной целлюлозы варьируется от традиционных десертов, желирующих, стабилизирующих и загустителей в пищевой промышленности до передовых высокотехнологичных приложений, таких как иммобилизация ферментов, бактерий и грибков, тканевая инженерия, протезы сердечного клапана, искусственные кровеносные сосуды, кости, хрящи, роговица и лечение кожи и корней зубов.

Различные биоцеллюлозные композиты были разработаны и исследованы с целью повышения их биологической применимости, включая бумажную, пищевую, текстильную, фармацевтическую промышленность, переработка отходов [125,126,127].

Основываясь на прочности на разрыв, низком коэффициенте пропускания кислорода (барьерных свойствах) и своей гидрофильной природе, мембрана из обработанной целлюлозы имеет большое значение для применения в качестве упаковочного материала для упаковки пищевых продуктов, где постоянное удаление влаги и минимальные свойства пропускания кислорода играют важную роль [128].

Уникальная размерная стабильность микробной целлюлозы позволяет создать звукопередающую мембрану, которая поддерживает высокую скорость звука в широком диапазоне частот и, таким образом, является лучшим материалом, отвечающим жестким требованиям оптимальной звукопередачи. Корпорация Sony (Япония) совместно с Ajinimoto (Япония) разработала первые диафрагмы аудиодинамиков с использованием микробной целлюлозы [129].

Применение бактериальной целлюлозы подразделяется на следующие категории, которые показаны на рисунке 7.

Рисунок 7 – Применение бактериальной целлюлозы [создано автором]

**1.5.1 Биоцеллюлоза в медицине**

Бактериальная целлюлоза представляет собой нетоксичный материал, биосовместимый с кожей человека и животных [22,125]. Благодаря этим свойствам бактериальная целлюлоза может использоваться во многих направлениях биомедицинских приложений.

Фибриллы бактериальной целлюлозы в 100 раз тоньше растительной, создавая высокопористый материал, который позволяет переносить антибиотики или другие медикаменты в рану, при этом оставаясь эффективным физическим барьером против любой внешней инфекции.

Биоцеллюлоза не аллергенна и легко стерилизуются без изменения свойств. Будучи сходной с человеческой кожей бактериальная целлюлоза может использоваться как заменитель кожи при обработке обширных ожогов и нетканых покрытий для хронических ран. По этой причине целлюлоза широко применяется для лечения ран.

По сравнению с другими биополимерами, такими как коллаген, хитозан и желатин, бактериальная целлюлоза обладает превосходными биологическими свойствами для регенерации тканей, главным образом для лечения хронических и ожоговых ран (рисунок 8) [127].



Рисунок 8 – Раневые повязки из бактериальной целлюлозы [127]

Равномерные и гладкие пленки или трубки БЦ, полученные при культивировании продуцентов в статических условиях без перемешивания могут быть использованы в качестве медицинских материалов – искусственных кровеносных сосудов [130] или искусственной кожи [127].

Кожа обеспечивает естественный барьер против окружающей среды и выполняет множество важных защитных функций. Однако это наиболее часто поражаемая часть человеческого тела.

Раневые повязки играют существенную роль в заживлении определенных типов открытых ран, например, травматических, тепловых или хронических. Однако, процессу заживления ран может помешать колонизация бактериями и последующая инфекция, что может вызвать чрезмерный и продолжительный воспалительный ответ тканей хозяина.

По сравнению с другими биополимерами, такими как коллаген, хитозан и желатин, бактериальная целлюлоза демонстрирует превосходные биологические свойства для регенерации тканей, главным образом для лечения хронических и ожоговых ран [131]. С 80-х и 90-х годов повязки на основе БЦ (как Biofill® (Fibrocel, Brazil)) использовались в качестве временных повязок для лечения ран кожи, главным образом, при ожогах, трансплантации и хронических язвах. По сравнению с другими раневыми повязками Biofill® показал положительные признаки биосовместимости, немедленного облегчения боли и последующего снижения дискомфорта после операции, более быстрого заживления с отсутствием или появлением шрамов и значительного сокращения времени и стоимости лечения. Кроме того, он защищает рану от инфекций и проницаем для жидкостей и газов, действуя как подходящая искусственная кожа [131].

Бактериальные целлюлозные мембраны, полученные с посмощью штамма *Gluconacetobacter hansenii* (штамм ATCC 23769) использовались бразильскими учеными при разработке раневой повязки на основе гидрогеля бактериальной целлюлозы и коллагена. Наблюдалось заживление ран у крыс в течении 15 дней и процент заживления составил 95%, а в контроле 60 % [132].

Исцеление ран зависит от двух столпов, а именно от васкуляризации и способности клетки синтезировать коллаген. Васкуляризация способствует переносу клеток в место воспаления и снабжению питательными веществами и кислородом.

Гидрогель (БЦ/Кол) улучшил макроскопически лучший результат восстановления ткани по сравнению с раневой повязкой на основе декстранового гидрогеля, тогда как гистологический анализ показал сходные результаты по сравнению с гидрогелем на основе хитина. Мазь коллагеназы оказалась более сложной для применения из-за ее плохой адгезии на раневом ложе. Одна из причин – отличные биологические свойства биоцеллюлозы; кроме того, синергизм между целлюлозой и коллагеном может благоприятствовать условиям для восстановления тканей. Согласно литературе, коллаген обеспечивает прочность и целостность тканевой матрицы и способствует гомеостазу с разрушением и синтезом коллагена II типа и эпителизации на более поздней стадии заживления [133].

Таким образом, адгезионное свойство гидрогеля (БЦ/Кол) на раневом слое показало преимущество при лечении ран по сравнению с мазью коллагеназы, его свойства благоприятствуют поддержанию влажной среды и более быстрому восстановлению тканей по отношению к коллагеназной мази и контрольной группе раневых повязок [134].

Известно, что создание покровных медицинских материалов на основе бактериальной целлюлозы целесообразно вследствие повышенного содержания в ней влаги, удерживаемой ее надмолекулярной структурой. Wei B. И др. [135] разработали новый тип пленок, содержащих антимикробные соединения на основе синтезируемой *Gluconacetobacter xylinum* бактериальной целлюлозы, которые были испытаны в качестве ранозаживляющего материала. Ими созданы покровные системные коммерческие материалы, такие как Biofill (“Biologia Filtration”, Испания) Gengiflex (“Curitiba PR”, Бразилия) и XCell (“Medline Industries, Inc.”, США). Физико-химические, адсорбционные свойства, химический состав полимера бактериальной целлюлозы, синтезируемой представителями различных видов, могут различаться, поэтому такие исследования необходимы для оценки возможности их использования на практике.

Российские исследователи [136] предложили пленки бактериальной целлюлозы из *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 как противобактериальный и противогрибной ранозаживляющий материал при насыщении её антибиотиками амоксиклавом и флуконазолом. Исследована антимикробная активность антибиотиков, адсорбированных на пленке бактериальной целлюлозы в отношении тест-культур *S. aureus*, *E.coli*, *B. coagulans* и *Aspergillus niger*. Самая высокая антимикробная активность проявлялась в отношении *S. аureus* и *E.coli* при использовании дисков с концентрацией антибиотиков 150 мкг/мл, для которых зоны угнетения роста составляли 28 мм, и 25 мм, соответственно. Не наблюдалось зон ингибирования в контроле с чистыми пленками в отношении всех модельных тест-объектов. Сравнительный анализ показал, что антимикробная активность антибиотиков, адсорбированных на дисках бактериальной целлюлозы, сохранялась и была сопоставима с активностью антибиотиков, адсорбированных на бумажных стандартных дисках. Так, при использовании стандартного диска флуконазола (40 мкг/диск) зона подавления роста *A. niger* составляла 8,0 ± 0,2 мм, тогда как при использовании дисков бактериальной целлюлозы с количеством антибиотика 26,5 мкг/диск – 18,4 ± 0,6 мм. Это свидетельствует о том, что полимер – бактериальная целлюлоза имеет высокую адсорбционную способность и, удерживая антибиотики в сетчатой наноструктуре, обеспечивает длительную диффузию антибиотиков в агар. Авторы полагают, что бактериальная целлюлоза может быть использована в биомедицине при создании покровных материалов для раневых инфекций и в качестве основы для доставки лекарственных средств.

Как ожидается, БЦ становится новым индустриальным материалом из-за его уникальной структуры и свойств по чистоте, высокой кристалличности, сверхтонкой сети, высокой механической стабильности и низкой плотности. По сравнению с синтетическими мембранами таких как полипропилен или полиэтилентерефталат, пленки БЦ показывают значительную механическую прочность.

Немецкие ученые испытали возможность применения БЦ под торговым названием Basyc® в качестве искусственных сосудов для микрохирургии. Ими получены обнадеживающие результаты на крысах, сосуды с внутренним диаметром в 1 мм продемонстрировали их высокий потенциал [137].

В кардиохирургии остро стоит проблема замены кровоостанавливающего средства костного воска. Одной из альтернатив воску может служить гемостатик на основе окисленнойцеллюлозы – модифицированного полимера растительного или бактериального происхождения. Этот материал хорош тем, что совместим с человеческими тканями; биодеградабилен, т. е. способен рассасываться и затем выводиться из организма.

Гемостатики на основе окисленной целлюлозы выпускают в самых разных формах: в виде ткани, волокон (ваты), порошка и т. п. Сами по себе эти препараты обладают доказанными ранозаживляющими, иммуностимулирующими, противовирусными и антибактериальными свойствами. Наиболее известна рассасывающаяся «марля» *Surgicel* (США). Высокая эффективность материалов из окисленной целлюлозы при остановке кровотечения из грудины, в том числе в сочетании с другими препаратами, показана в ряде исследований, что позволяет считать их хорошей заменой воску.

Новосибирскими исследователями разработан препарат с гемостатическим и антимикробным действием на основе окисленной целлюлозы для кардиохирургии. По снижению интенсивности и уменьшению времени остановки кровотечения он не уступает современным импортным кровоостанавливающим средствам. При этом он полностью рассасывается в организме в течение 1–2 недель, тогда как тот же воск может обнаруживаться в организме пациента и через 10 лет после операции. Наличие в составе препарата антибиотика ванкомицина, который начинает выделяться в период сращения грудины, предотвращает возникновение инфекции и не дает развиться воспалению [138].

Доказано, что плёнки бактериальной целлюлозы *G. hansenii* GH-1/2008 с абсорбированными антибиотиками и наносеребром обладают антимикробными свойствами и могут быть рекомендованы для разработки покровных материалов для лечения раневых инфекций [139]. Тот же автор показал возможность использования биоцеллюлозы в качестве пищевой добавки к вареным колбасам, которая улучшала структуру и вкусовые качества продукта.

**По статистике Всемирной организации здравоохранения, более 70% человечества имеют сниженный иммунитет,** ежегодно в мире регистрируется более 2 млн. острых кишечных заболеваний, которые тяжело поддаются лечению**. Среди факторов, влияющих на ослабление защитных сил организма, серьезное значение имеет нарушение микрофлоры кишечника. Полноценное переваривание пищи и защита организма невозможны без участия микробов, живущих в кишечнике.**

Более 400 видов микроорганизмов населяют кишечник [140], общая биомасса которых достигает 3 кг. Особенно впечатляет тот факт, что количество микробных клеток на порядок превосходит количество собственных клеток хозяина [141]. Огромная значимость кишечной микрофлоры подтверждается изобилием функций, выполняемых микроорганизмами. Многочисленные исследования доказали патогенетическую связь состояния кишечного биоценоза не только с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, но и с такими заболеваниями, как атеросклероз и артериальная гипертония, мочекаменная болезнь и пиелонефрит, желчнокаменная болезнь и гепатиты. По своей роли в поддержании гомеостаза кишечная микрофлора не уступает любому другому жизненно важному органу [142]. Все это позволяет выделить ее как самостоятельный орган [143].

Кишечная микрофлора представляет собой важнейшую защитную систему организма. Ее суть заключается в предотвращении колонизации желудочно-кишечного тракта условно-патогенными и патогенными микроорганизмами. Важнейшая роль нормальной микрофлоры заключается в способности нейтрализовать многие токсические субстраты и метаболиты (нитраты, ксенобиотики, гистамин, мутагенные стероиды). Нормальная микрофлора обеспечивает синтез многих жизненно необходимых веществ, таких как витамины группы В (В1, В2, В6, В12), витаминов С, К, фолиевой, никотиновой кислоты. Только кишечная палочка синтезирует 9 витаминов. Кроме того, она участвует в синтезе гормонов и биологически активных веществ, принимающих участие в регуляции функций не только ЖКТ, но и печени, сердечно-сосудистой, нервной, эндокринной систем, кроветворении и др. Так, например, глутамат влияет на процессы нейрорегуляции, изовалерьяновая кислота стимулирует синтез инсулина, бутират регулирует пролиферацию колоноцитов и т.д.

Как известно, кишечная лимфатическая система выполняет огромную защитную роль в организме. Кишечная микрофлора участвует в формировании и местного, и системного иммунитета. Во-первых, само наличие микрофлоры оказывает постоянный антигенный тренирующий эффект.

Доказано участие микрофлоры в стимуляции продукции IgА, активации фагоцитарной активности циркулирующих гранулоцитов [144], в выработке цитокинов мононуклеарами, созревании лимфоидного аппарата. Кроме того, происходит выработка биологически активных веществ, разрушающих антигены.

Некоторые лактобактерии в анаэробных условиях участвуют в метаболизме оксалатов (соли щавелевой кислоты, которые в норме присутствуют в моче любого человека), что приводит к снижению экскреции оксалатов с мочой и даже к уменьшению объема оксалатных камней [145].

Таким образом, регулирующая роль кишечной микрофлоры выходит далеко за пределы ЖКТ. Ее участие в огромном спектре биохимических процессов объясняет широкий спектр клинических последствий кишечного дисбактериоза. В норме различают главную микрофлору (более 90% – бифидобактерии и бактероиды), сопутствующую (около 10% – лактобактерии, кишечные палочки, энтерококки и др.) и остаточную (менее 1% – энтеробактерии, клостридии, стафилококки).

В зависимости от особенностей метаболизма различают протеолитическую и сахаролитическую микрофлору. Протеолитические микроорганизмы (кишечная палочка, бактероиды, протей, клостридии) расщепляют белки до азотистых соединений, а сахаролитические (бифидо– и лактобактерии, энтерококки) метаболизируют углеводы. По локализации в кишечнике выделяют пристеночную и полостную микрофлору. В тонкой кишке численность пристеночной микрофлоры на 6 порядков превышает численность полостной, она тесно связана с кишечным эпителием и морфологически, и функционально. В толстой же кишке преобладает менее стабильная по составу полостная микрофлора, которая фиксируется на непереваренных пищевых волокнах.

Микрофлора тонкой кишки относительно немногочисленна и представлена аэробной флорой: лактобактериями, стафилококками, стрептококками. Общая ее численность в тощей кишке составляет 103–105 клеток в 1 мл. По мере приближения к толстой кишке количество микроорганизмов возрастает и в подвздошной кишке достигает 105–108 в 1 мл. Два различающихся по составу и функциям биотопа: тонкая и толстая кишка – разделены эффективно функционирующим барьером – баугиниевой заслонкой. Толстая кишка отличается самой высокой плотностью микроорганизмов, которая составляет 109–1012/мл. Здесь преобладают анаэробы: бифидобактерии и бактероиды [146].

В последние годы для профилактики и коррекции микроэкологических нарушений в пищеварительном тракте, используют пребиотики, селективно стимулирующие рост полезных микроорганизмов, прежде всего бифидобактерий. **Пребиотики** – при систематическом употреблении обеспечивают оптимизацию микроэкологического статуса организма человека за счет избирательной стимуляции роста и биологической активности нормальной микрофлоры пищеварительного тракта. Пребиотиками являются растворимые и нерастворимые [пищевые волокна](http://propionix.ru/pishchevyye-volokna), проявляющие свойства гидроколлоидов.

Главным представителем нерастворимых пищевых волокон является целлюлоза. К растворимым относятся полисахариды, препараты которых в течение многих лет используются в пищевой промышленности в качестве пищевых добавок с технологическими функциями загустителей, стабилизаторов, гелеобразователей. Целлюлоза составляет в пищевых волокнах примерно одну треть. Ее содержание в растительной пище около 1%, но она в значительной мере структурирует пищу. Целлюлоза практически не переваривается в кишечнике. Ее усвояемость, в большей степени, определяется происхождением, содержанием в пищевом рационе и характером предварительной обработки и колеблется в среднем от 6 до 23%. В пищеварительном тракте человека целлюлоза стимулирует деятельность кишечника, усиливая его перистальтику, нормализует деятельность кишечной микрофлоры, сорбирует стерины, препятствуя их всасыванию, способствует выделению холестерина [147].

**1.5.2 Биоцеллюлоза в экологии**

Бактериальная целлюлоза предсказывает многообещающее будущее в области защиты окружающей среды в очистке сточных вод. Биосинтез бактериальной целлюлозы экологически безупречен и может осуществляться в использовании дешевых источников углерода, например, отходы различных изделий, содержащие моносахариды. Фильтр из бактериальной целлюлозы очень эластичный и пористый. Бактериальная целлюлоза в комплексе по очистке сточных вод используется для первой механической очистки в качестве фильтра сточных вод [148].

Потенциал бактериальной целлюлозы выходит далеко за рамки ее существующих приложений, особенно с учетом ее крупномасштабного производства в качестве недорогого сырья для обеспечения промышленных функциональных возможностей в различных областях секторов на устойчивой основе [149]. Биоцеллюлоза очень пористый материал и имеет сетчатую структуру с небольшим размером пор, что идеально подходит для тонкой фильтрации [150,151,152,153,154].

Поскольку бактериальная целлюлоза обладает гидрофильными и олеофобными свойствами [155], во время фильтрации нефтесодержащих стоков или различных эмульсий только капли воды способны проходить через нанометрические поры мембраны при определенном давлении, приложенном к системе, что означает, что масло остается на ее поверхности (рисунок 8).

Бактериальная целлюлоза считается экологически чистым и чрезвычайно универсальным биополимером, и именно поэтому с годами увеличилось количество исследований, предусматривающих его использование в форме фильтрующих мембран для очистки сточных вод.

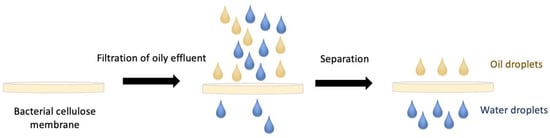


Рисунок 9 – Схематическое изображение процесса разделения нефти и воды с использованием БЦ в качестве фильтра [156]

Для эмульсий масло/вода некоторые исследования показали, что определенные модифицирующие агенты способны делать мембраны БЦ гидрофобными, тем самым повышая их селективность масло/вода [154]. Это попытка получить лучший выход фильтрации в соответствии со спецификациями фильтрата.

Более того, благодаря своей нанопористой структуре и склонности к химической дериватизации БЦ подходит для удаления ионов тяжелых металлов из водного раствора [157].

Несколько исследований, проведенных до сих пор с использованием БЦ в качестве фильтрующей мембраны (таблица 3), позволяют предположить, что он обладает огромным неизведанным потенциалом, особенно с учетом его низкой чувствительности к воде, чтобы не разлагалась при контакте с веществами в жидком состоянии, высокая степень пористости, низкой плотности и структуры нановолокон, которые обеспечивают наномасштабную фильтрацию [158,159].

Таблица 3 – Исследования, касающиеся использования бактериальной целлюлозы в качестве фильтрующей мембраны для очистки сточных вод

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Название | Описание | Источники |
| Поверхностная модификация  аэрогели из бактериальной целлюлозы для разделения нефти/воды | Нановолокна аэрогелей БЦ модифицировали на их поверхности путем дериватизации триметилсилилированием с последующей сушкой. Было показано, что полученные гидрофобные и олеофильные аэрогели удаляют широкий спектр органических растворителей и масел и потенциально могут использоваться для очистки разливов нефти в морской среде | 160 |
| Полиэтиленимин это бактериальный  целлюлозный биосорбент для эффективного удаления меди и ионы свинца из водной среды | Восстановительное аминирование полиэтиленимином позволило превратить мембрану БЦ в биоадсорбент для удаления из сточных вод ионов тяжелых металлов [Cu(II) и Pb(II)] | 161 |
| Простое изготовление гибкого композитного аэрогеля из бактериальной | Композит кремнеземного аэрогеля был приготовлен модификацией БЦ с | 162 |
| Продолжение таблицы 3 | | |
| целлюлозы и кремнезема для разделения масла, и воды | метилендифенилдиизоцианат для повышения гидрофобности и  гибкости, что делает его перспективным нефтесорбентом |  |
| Приготовление и характеристика двухслойной мембраны нанофильтрации из  гидрогеля хитозана и нановолокна бактериальной  целлюлозы для удаления красителя | Мембрана была разработана путем прививки многостенных углеродных нанотрубок в молекулярные цепи БЦ. Порошок БЦ растворяли в растворе LiCl и  N,N-диметилацетамида, а в качестве катализатора реакции использовали октоат  двухвалентного олова. Мембрана показала большую прочность на растяжение, модуль Юнга и устойчивость к давлению, что практически утроило ее скорость потока и обеспечило выход красителя выше 90% | 163 |
| Разработка многоразовых новых мембран на основе бактериальной целлюлозы и хитозана для фильтрации меди в сточных водах | Модифицированные хитозаном мембраны биоцеллюлозы были разработаны ex situ (биоцеллюлоза, погруженная в растворы с различной концентрацией хитозана) или in situ (добавление растворов хитозана в среду для производства бактериальной целлюлозы). Мембрана, изготовленная методом ex situ показала большую эффективность в удалении ионов | 164 |
| Удаление U (VI) из водного раствора с использованием бактериальной целлюлозы, функционализированной фосфатом, в качестве эффективного адсорбента | Мембраны БЦ модифицировали путем прививки фосфатных функциональных групп, замачивая их в диметилацетамиде и мочевине. Благодаря наличию полярных гидроксильных групп и электростатическому притяжению, мембраны при pH от 4 до 8 были способны адсорбировать 9 мг/г ионов U (IV). | 165 |
| Продолжение таблицы 3 | | |
| Бактериальные целлюлозные мембраны для водоочистки окружающей среды и очистки промышленных сточных вод | БЦ произведена и очищена NaOH для использования в качестве фильтрующей мембраны для очистки микробиологически загрязненных стоков (кишечная палочка) и красителей текстильной промышленности. Мембраны БЦ показали лучшие результаты, по сравнению с коммерческими, удаляя 100% клеток присутствующие в сточных водах. | 166 |
| Влияние условий инкубации и последующей обработки на свойства мембран из бактериальной целлюлозы для фильтрации под давлением | Были проведены исследования проникающих свойств БЦ, дериватизированного полиоксиэтиленом, для определения эффективности фильтрации как сухих, так и влажных мембран при различных давлениях и расходах воды | 167 |
| Пленкообразные композиты бактериальная целлюлоза/олигомер циклодекстрина с регулируемой структурой для удаления различных стойких органических загрязнителей из воды | Пленочный очиститель воды, приготовленный путем загрузки олигомера циклодекстрина на сверхтонкий БЦ. Система показала высокую и стабильную адсорбционную способность по отношению к различным целевым загрязняющим веществам, таким как фенол, бисфенол А, глифосат | 168 |
| Бактериальный целлюлозно-полианилиновый пористый мат для удаления метилового  оранжевого и бактериальных патогенов из питьевой воды | Мембраны БЦ модифицировали полианилином окислительным методом in situ полимеризацией и последующей лиофилизацией. БЦ применяли для удаления красителя метилового оранжевого и  бактериальных клеток, присутствующих в питьевой воде. Мембраны показали поглощающую способность | 169 |
| Продолжение таблицы 3 | | |
|  | приблизительно 300 мг/г и антимикробную активность, уменьшая микробную нагрузку, присутствующую в сточных водах, до четырех раз |  |
|  | | |

Как показано в таблице 3, большинство исследований сосредоточили свои усилия на модификации БЦ с включением других активных материалов с целью улучшения его свойств [159–169]. Результаты недавнего исследования, проведенного на мембране биоцеллюлозы, действующая как адсорбент загрязняющих веществ и антимикробный агент, указывают на уникальный и инновационный способ удаления жизнеспособных бактериальных клеток из воды [169]. Такой модификации, среди которых стоит отметить аминирование, добавление аэрогелей, силикагелей, функциональные группы хитозана и фосфата [161,162–165] изучаются в соответствии со специфическими характеристиками желаемого результата [167, 168].

В другом исследовании сообщалось об использовании БЦ, связанного с полиэтиленимином (PEI-BC), в качестве адсорбирующего материала для тяжелых металлов, максимальная адсорбционная емкость которого для Cu(II) Pb(II) – 141 и 148 мг/г соответственно. Полимерная смесь PEI-BC также продемонстрировали хорошую возможность повторного использования после регенерации и обработки с использованием Na2EDTA. После реадсорбционная способность Cu(II) PEI-BC была ниже исходной, но остается стабильным после каждого цикла использования. В целом, PEI-BC продемонстрировал хорошую возможность повторного использования при удалении Cu(II) и Pb(II) из водных растворов, демонстрируя его потенциал в качестве биоадсорбента для удаления ионов тяжелых металлов из сточных вод [161].

Использование микробных целлюлозных мембран в сочетании с хитозаном для удаления меди. Мембраны, приготовленные с использованием концентраций хитозана и целлюлозы 50 и 250 мг/л, соответственно, смогли удалить 50% Cu. Что касается возможности повторного использования мембраны, наблюдалось снижение эффективности удаления менее 10% после двух циклов лечения. Эти результаты указывают на возможность использования биоцеллюлозы на основе мембраны из смеси полимеров для удаления меди из сточных вод [164].

Мембрана из смеси полимеров нановолокон с хитозановым гидрогелем и БЦ также была способна удалить красители из сточных вод [163]. Уровень удаления был выше 90% для красителей с молекулярной массой более 600 г/моль и давлением менее 0,5 МПа, а мембрана показала хорошие противообрастающие свойства как для масла, так и для белков во время процесса фильтрации. Эти многообещающие результаты показывают, что нанофильтрационные мембраны эффективны при удалении красителей из сточных вод, с высокой скоростью отбраковки и потоком при высоком давлении [163].

Другим интересным применением является использование фильтров БЦ для обработки пигментных пятен, текстильные отходы и удаление микробных клеток. Мембраны БЦ были эффективны в удалении *Escherichia coli* из сточных вод и твердые вещества красителей в течение десяти циклов, что позволяет предположить, что они могут быть использованы в различных типах очистки сточных вод [166]. При этом одним из основных преимуществ мембран биоцеллюлозы по сравнению с традиционными, это возможность их промывки после фильтрации. Принимая это и учитывая, что насыщенные мембраны бактериальной целлюлозы, фильтрующая способность которых снижена, могут быть сняты с системы фильтрации, промыты и повторно использованы несколько раз, не теряя своих эффективных свойств [170].

Бактериальная целлюлоза считается экологически чистым и чрезвычайно универсальным биополимером, и именно поэтому с годами увеличилось количество исследований, предусматривающих его использование в форме фильтрующих мембран для очистки сточных вод.

Многоие исследования показали большой потенциал биоцеллюлозных мембран, производимых в стандартных или альтернативных питательных средах в форме отдельных видов бактерий или микробных консорциумов.

Благодаря своим специфическим характеристикам, в основном благодаря своей нанофибриллярной структуре, они доказали свою эффективность в качестве фильтров для удержания мелких частиц и добились успеха в очистке промышленных стоков, в частности нефтяной промышленности.

Характеристики бактериальной целлюлозы, такие как высокая водоудерживающая способность и прочность на растяжение делает его превосходным устойчивым, биосовместимым и биоразлагаемым пористым фильтрующим матералом.

До сих пор нет сообщений о прямой связи между мембраной БЦ фильтрации и связанные с ней затраты энергии. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы сделать эти мембраны, устойчивые к более высоким расходам и давлению, чтобы они могли заменить современные методы в промышленных и экологически чистых масштабах. На самом деле ожидается, что эта технология позволит снизить затраты на электроэнергию и техническое обслуживание, возможное улучшение очистка и снижение выбросов загрязняющих веществ.

**1.5.3 Использование биоцеллюлозы в косметологии**

Стремление к эстетике привело к появлению косметики на растущем рынке и к большому разнообразию продуктов.

Природные полимеры, такие как целлюлозная масса, гидрогели и нановолокна целлюлозы, использовались в качестве основных материалов для изготовления косметических средств. Бактериальная целлюлоза уже была изучена в качестве средства, способствующего высвобождению лекарств, и результаты показали ее эффективность для быстрого высвобождения гидрофобных и гидрофильных лекарств. Однако в литературе можно найти некоторые исследования, касающиеся использования бактериальной целлюлозы для поддержки в косметических целях [171].

Клинически доказано, что биоцеллюлозная маска помогает увеличить гидратацию кожи. Блокирующие высоко поглощающие волокна бактериальной целлюлозы образуют трехмерный «материал», позволяя полезным ингредиентам маски проникать глубоко в кожу [172].

Amorim и др. сообщили о включении экстракта прополиса в бактериальную целлюлозную пленку, полученную в модифицированной среде, для использования в качестве увлажняющей и противовоспалительной листовой маски для кожи, склонной к акне и воспалениям (рисунок 10).

Сформированная полимерная смесь обладает полезными характеристиками для использования в качестве биомаски в космецевтической промышленности. Экстракт прополиса подходил как аутовоспалительный агент для будущего применения, и его включение не связывало исходные свойства полимера. Полученные результаты показали использование бактериальной целлюлозы как идеального окклюзионного космецевтического продукта [173].



Рисунок 10 – Бактериальная целлюлозная маска с экстрактом прополиса [173]

Также [P. Perugini](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Perugini+P&cauthor_id=31301106) со авторами исследовали пленку биоцеллюлозы в качестве маски [174]. Целью данного исследования было оценить влияние на параметры кожи трех масок из биоцеллюлозы, разработанных для оказания различных косметических эффектов (омолаживающий эффект, лифтинг и обновление клеток). В частности, оценивались увлажнение кожи, цвет кожи, вязкоупругие свойства кожи, гладкость поверхности кожи, уменьшение морщин, однородность дермы и обновление рогового слоя.

В исследовании приняли участие 69 здоровых добровольцев европеоидной расы в возрасте от 25 до 64 лет, которые были разделены на три разные группы исследования. Маски из биоцеллюлозы для лица применялись три раза в неделю в течение 4-8 недель в зависимости от исследования.

Результаты, полученные в этой работе, показывают, что маски из биоцеллюлозы очень хорошо переносятся. Через 2 месяца применения «омолаживающих» масок наблюдалось значительное уменьшение шероховатости кожи и ширины морщин, улучшение однородности и упругости дермы (рисунок 11).

 Значительное улучшение упругости и эластичности кожи отмечено через 1 месяц применения «лифтинговых» масок. Кроме того, 1-месячное лечение масками «обновления клеток» способствовало образованию новых клеток кожи за счет мягкого отшелушивающего действия.

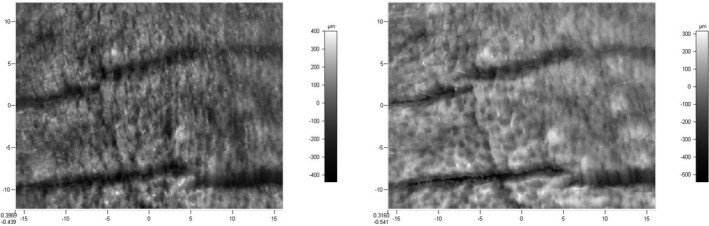


Рисунок 11 – Изображение кожи лба в начале исследования и после 2 месяцев применения антивозрастных биоцеллюлозных масок [174]

Результаты показывают, что применение антивозрастных биоцеллюлозных масок привело к значительному уменьшению шероховатости кожи на 5,13% (P = 0,0101) после 12 применений и значительному уменьшению на 10,99% (P = 0,0000) после 2 месяцев лечения.

Оценки, проведенные с помощью ультразвука, позволили визуализировать и измерить общую толщину эпидермиса и дермы. Измерения толщины кожи проводились с использованием режима А-скана у всех субъектов в начале исследования, а также после 12 и 24 применений (рисунок 12).

An external file that holds a picture, illustration, etc.
Object name is JOCD-19-725-g006.jpg

А – изображение кожи в начале исследования; В – после 12 аппликаций антивозрастных биоцеллюлозных масок; С – в конце исследования после 24 аппликаций антивозрастных биоцеллюлозных масок. Эпидермис и дерма видны как эхогенные (зеленые) участки

Рисунок 12 – Ультразвуковые изображения кожи [174]

На рисунке 12 показаны примеры ультразвуковых изображений кожи на исходном уровне и после 12 и 24 аппликаций антивозрастных биоцеллюлозных масок. Сравнение ультразвуковых изображений до и после лечения ясно показывает разницу в организации ткани под эпидермисом, что приводит к улучшению однородности и упругости дермы. Эти результаты были подтверждены измерениями толщины дермы.

Это исследование подчеркивает, что маски из биоцеллюлозы являются эффективными системами доставки для успешного высвобождения в кожу нескольких типов активных соединений, оказывающих множество полезных эффектов [174].

Последние тенденции заключаются в объединении как активных веществ, так и природных носителей для разработки новых экологически безопасных космецевтических продуктов. Stasiak-Rozanska и Ploska [175] изучили возможность использования микробной целлюлозы в качестве биоматериала для переноса 1,3-дигидрокси-2-пропанон, что вызывало изменение цвета кожи. Результаты, полученные в этом исследовании, ясно указывают на жизнеспособность использования этого метода, вызывающего пигментацию кожи. Применение микробных целлюлозных пленок с 1,3-дигидрокси-2-пропаноном в концентрации 50 г/л в течение 30 мин гарантировало цвет кожи, который считался наиболее близким к желаемому эффекту естественного загара. Использование 1,3-дигидрокси-2-пропанона в качестве адгезива с микробной целлюлозой, может быть альтернативой для пациентов, у которых ранее было витилиго, поскольку есть вероятность, что этот биоматериал не вызывает аллергию на коже. 1,3-дигидрокси-2-пропанон нанесенный на кожу через бактериальную целлюлозу также не вызывает специфического и неприятного запаха, типичного для коммерческой косметики, содержащей 1,3-дигидрокси-2-пропанон.

**1.5.4 Использование биоцеллюлозы в пищевой промышленности**

Бактериальная целлюлоза широко используется в различных областях пищевой промышленности. Его добавляют к жевательной резинке, также используется в качестве загустителя для поддержания вязкости в пище и в качестве стабилизирующего агента.

Биоцеллюлоза добавляется ко многим пищевым продуктам в качестве пищевых волокон. Конкретным примером является Cellulon®, который используется как загуститель, текстуризатор и калорийный редуктор.

Бактериальная целлюлоза на Филиппинах является основным компонентом популярного десерта - пудинга и желе с фруктовой мякотью «Nata-de-Coco», сладостей [176].

Диетическое волокно представляет собой большую группу веществ различной химической природы, включая клетчатку (целлюлозу), гемицеллюлозу, смолу, пектины, крахмал и некарбонированный лигнин. Для взрослых ежедневная норма пищевого волокна в составе продуктов составляет 20 г. Природная целлюлоза модифицируется и деполимеризуется механически или химически и может быть далее использована в качестве пищевой добавки [177].

Целлюлоза помогает удалять токсины из организма. Волокно также замедляет доступ пищеварительных ферментов к углеводам. Из-за этого медленного процесса организм медленно поглощает моно и дисахариды в кишечнике. Соответственно, организм нормализует содержание глюкозы и синтез инсулина, который стимулирует образование жиров [178].

Волокно также сохраняет воду в кишечнике, и это важно для профилактики запора, геморроя и помогает обеспечить чувство сытости.

Кроме того, целлюлоза считается основным источником энергии для микроорганизмов кишечника. Анаэробные, молочные и споровые бактерии, кишечная палочка, стрептококки и другие микроорганизмы, обнаруженные в толстой кишке, способствуют разложению остатков непереваренной пищи. Ферменты, выделяемые бактериями, утилизируют до 40% глюкозы.

Показана возможность использования биоцеллюлозы в качестве пищевой добавки к вареным колбасам, которая улучшала структуру и вкусовые качества продукта [139].

Бактериальная целлюлоза также используется в пищевой промышленности в качестве загустителя, стабилизатора и желирующего агента, что позволяет предположить его использование в обработанных пищевых продуктах для улучшения их качества. Из-за своей способности удерживать воду, также используется для разработки диетического крема, известного как сливки [179].

Кокосовые сливки, родом из Филиппин, стали одним из первых доступных пищевых продуктов с бактериальной мякотью, завоевав заметную популярность в других азиатских странах [180].

Azeredo представил в своей статье краткий обзор актуальные и потенциальные применения бактериальной целлюлозы в пищевой промышленности. Автор изучал бактериальную целлюлозу в сыром виде как материал для изготовления сливок, для формирования съедобных листьев или пленок в качестве заменителя жира, модификатора текстуры, стабилизатор эмульсии. По словам того же автора, хотя бактериальная целлюлоза - это полисахарид GRAS (Generally Recognized As Safe) – безопасный, который представляет собой уникальные свойства, такие как высокая влагоудерживающая способность, он еще не был должным образом исследован в возможных применениях в пищевой сфере. Сливки в основном единственный продукт, который использовался на продовольственном рынке с использование бактериальной целлюлозы, а также множество других необходимо рассмотреть перспективные приложения [181].

Nascimento создал нанокомпозитные пленки из целлюлозы с помощью способов физического и химического распада, чтобы получить нанофибриллы и нанокристаллы соответственно. Был разработан способ получения нанофибриллированной бактериальной целлюлозы путем сочетания, опосредованного временем окисления и высокоскоростного гомогенизатора. Было также оценено использование ультразвука для диспергирования нанокристаллов в суспензии и проведена характеристика флаконов и оценка цитотоксичности. Было отмечено производство нанофибриллированной целлюлозы с высоким выходом и исключительными характеристиками, такими как высокая кристалличность и стабильность, и можно сделать вывод, что окисленная и нанофибриллированная матрица представляет собой материал с большим потенциалом для использования в производстве нанокомпозитов для применение пищевой упаковки [182].

Также многие исследователи изучали использование БЦ в качестве биологического нетканого материала для использования в качестве упаковки из натуральных и биоразлагаемых материалов, чтобы сократить использование синтетических материалов, которые способствуют загрязнению окружающей среды [183,184], и продлить срок хранения пищевых продуктов [185].

Активная упаковка, в том числе противомикробная - это вид упаковки, который привлек внимание как исследователей, так и промышленную сферу деятельности, и сегодня она имеет множество коммерческих применений. Противомикробные агенты могут высвобождаться при испарении или попадать в пищу посредством диффузии и распределении, непосредственно при нанесении на поверхность пищевых продуктов или косвенно при включении в материалы-носители, такие как пищевая упаковка [186].

Природные или химические антимикробные соединения могут использоваться для создания активной упаковки на основе антимикробных свойств. В связи с тем, что использование химикатов в пищевых продуктах вызывает опасения у потребителей, прилагаются большие усилия, чтобы исключить их использование и заменить их натуральными, которые обладают антимикробной активностью и могут продлить срок хранения некоторых продуктов [187].

Одним из веществ, проявляющих антибактериальную активность, является эфирное масло орегано (ЭМО) [188]. Масло орегано получают из душицы обыкновенной (*Origanum vulgare*), многолетнего растения семейства цветковых *Lamiaceae*. Орегано - ароматическое растение, которое используется во всем мире в декоративных, кулинарных и фитотерапевтических целях. В Европе его традиционно используют в южных странах, особенно в Средиземноморском регионе. Антимикробная активность эфирных масел, полученных из этих растений, привлекла внимание ученых, поскольку они могут быть использованы в качестве альтернативы растущей устойчивости традиционных антибиотиков к болезням, вызываемым патогенами [189]. Масло орегано, используемое в качестве пищевого ароматизатора, обладает широким спектром антимикробной активности из-за высокого содержания фенольных производных, таких как карвакрол и тимол [190]. Существует множество научных отчетов, показывающих химический состав и антимикробные свойства эфирных масел различных видов душицы и их использование в различных коммерческих препаратах в качестве противомикробных и антиоксидантных агентов [191].

Одним из болезнетворных бактерий встречающиеся в продуктах питания являются бактерии рода *Cronobacter spp*. такие как растительные материалы, детское питание, сыр, сушеные продукты и мясо, а также воду [192]. Бактерии рода *Cronobacter* были связаны с редкими, но опасными для жизни заболеваниями, в основном у новорожденных и младенцев, включая менингит, сепсис и некротический энтероколит [193,194], но также у пожилых людей и взрослых с ослабленным иммунитетом, включая пневмонию, сепсис, остеомиелит, абсцессы и раневые инфекции [195,196]. Согласно молекулярной идентификации, род *Cronobacter* состоит из семи видов: *C. sakazakii, C. turicensis s, C. malonaticus, C. condimenti, C. dublinensis, C. muytjensii* и *C. universalis* [197, 198]. Первые три наиболее часто выделяются от инфекций человека [199]. Недавно реклассифицированные виды - это *C. zurichensis, C. helveticus, C. colletis* и *C. pulveris* [200].

Использование эфирных масел (ЭМ) или природных соединений растительного происхождения в качестве пищевых добавок может быть одним из возможных способов борьбы с *Cronobacter spp.* в различных видах пищевых продуктов. Использование натуральных эфирных масел хорошо вписывается в тенденцию «чистой этикетки» и позволяет до некоторой степени сократить количество химических консервантов.

Литературные данные о чувствительности бактерий рода *Cronobacter* к ингибирующему действию ЭМО ограничены и касаются в основном бактерий *C. sakazakii*. Недостаточно научных отчетов, в которых изучались бы ингибирующие эффекты некоторых ЭМО карвакрола, тимола, эвгенола и коричной кислоты / транс-коричного альдегида против *C. sakazakii и C. malonaticus* [201]. Сведения о потенциальной восприимчивости других видов из рода *Cronobacter* к ЭМО и активным веществам растительного происхождения все еще очень скудны.

**2 Материалы и методы исследований**

**2.1 Объекты исследований**

Объектами исследований послужили штаммы уксуснокислых бактерий, способные к синтезу целлюлозы.

Питательные среды

В работе использовали питательные среды, приведенные ниже:

- Стандартная среда HS г/л: D-глюкоза - 20,0; дрожжевой экстракт - 5,0; пептон - 5,0; Na2НPO4- 2,7; лимонная кислота - 1,15, pH среды – 6,0. Режим стерилизации при 1,1 атм (121°C) в течение 20 минут [52].

- Триптон-соевый агар (Himedia, Индия), Питательный агар (Himedia) стерилизация автоклавированием при 1,1 атм (121°С) в течение 15 минут.

- Среда US, (г/л): глюкоза – 20, (NH4)2HPO4 – 5, дрожжевой экстракт – 5, моногидрат лимонной кислоты – 1,15, Na2HPO4– 2,7 [178].

- Среда H1-1 (%): глюкоза – 2, (NH4)2SO4 – 0,3, K2HPO4 – 0,2, дрожжевой экстракт – 0,5, Na2HPO4– 0,27, моногидрат лимонной кислоты – 0,115, уксусная кислота 2 [202].

- Среда Н3-1 (%): глюкоза – 2, (NH4)2SO4 – 0,3, K2HPO4 – 0,2, Na2HPO4– 0,27, моногидрат лимонной кислоты – 0,115, дрожжевой экстракт – 0,5 [148].

- Среда GY (г/л): глюкоза - 100, дрожжевой экстракт – 10 [202].

Оборудование

Tермостат «Binder» с температурой нагрева 22-37°С; сушильный шкаф «Binder» с температурой нагрева до 300°С; бытовой холодильник «Атлант»; анализатор влажности «MD 83Vibra» вортекс «MS1 MinishakerIKA»; центрифуга «Eppendorf» 5810R; орбитальный шейкер «MultiPSU-20», термостатирующий шейкер «Stuart» с температурой нагрева от 20-60°С; электрохимический анализатор «Consort С932»; аналитические весы «AdvantureAR2140»; спектрафотометр «Ultraspec 7000» GE, сканирующий электронный микроскоп «JEOL, JSM-IT200», спектрофотометра «Nanodrob 2000»; ПЦР-амплификатор «С1000 Touch» (BioRad); камера для горизонтального электрофореза «Max Fill HU10»; источник тока «Consort EV 243»; секвенатор «3737xl» (Applied Biosystems).

**2.2 Методы исследований**

**2.2.1 Выделение бактерий продуцентов биоцеллюлозы**

Для выделения продуцентов бактериальной целлюлозы использовали микрофлору «Чайного гриба» и плоды винограда разных сортов. «Чайный гриб» или «Чайный квас» это симбиоз уксуснокислых бактерий и дрожжевых грибов, общеевропейское название комбуча (*kombucha*). Напиток из чайного гриба состоит из разнообразных [органических кислот](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9E%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D0%B5_%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D1%8B), [сахаров](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A3%D0%B3%D0%BB%D0%B5%D0%B2%D0%BE%D0%B4%D1%8B) и других веществ.

Дрожжевые грибы [гидролизуют](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%B8%D0%B4%D1%80%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%B7) [сахарозу](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B0%D1%85%D0%B0%D1%80%D0%BE%D0%B7%D0%B0) на [глюкозу](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%BB%D1%8E%D0%BA%D0%BE%D0%B7%D0%B0) и [фруктозу](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D1%80%D1%83%D0%BA%D1%82%D0%BE%D0%B7%D0%B0) в присутствии фермента [инвертазы](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%BD%D0%B2%D0%B5%D1%80%D1%82%D0%B0%D0%B7%D0%B0), а также производят [этанол](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%AD%D1%82%D0%B0%D0%BD%D0%BE%D0%BB) в процессе [гликолиза](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%BB%D0%B8%D0%BA%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%B7), используя фруктозу как субстрат. Бактерии используют глюкозу для синтеза [глюконовой](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%93%D0%BB%D1%8E%D0%BA%D0%BE%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D1%8F_%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0), а этанол — [уксусной кислоты](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A3%D0%BA%D1%81%D1%83%D1%81%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B0) [203]. В данной культуре на поверхности жидкости образуется толстая пленка целлюлозы светло-коричневого цвета. Представители вида рода *Komagataeibacter* в частности *Komagataeibacter xylinum* и *Komagataeibacter hansenii* очень плохо развиваются на плотных питательных средах, поэтому для выделения продуцента были использованы селективные жидкие и полужидкие среды.

Принцип метода заключался в подавлении других представителей микробиоты. Для выделения чистой культуры были использованы образцы симбиоза чайного кваса и ягод винограда. В колбы с питательной средой HS объемом 100 мл добавляли по 5 мл образцы культур чайного кваса и цельные ягоды винограда. Культивирование проводили в термостате типа Binder при температуре ±29 °С в течении 7 суток. Полученные пленки культивировали на твердой агаризованной питательной среде HS (рН<3) с добавлением антибиотиков нистатина и кетокондазола. Культивирование проводили в термостате при ±29 °С трое суток.

Из посевов на селективные среды было выделено 17 изолятов. Каждый изолят был выделен в чистую культуру и проверен на наличие образования биопленки на жидкой питательной среде HS. Образовавшиеся пленки подвергались обработке в 0,5N NaOH для подтверждения наличия целлюлозы и нейтрализации от бактериальных клеток.

Хранение культур микроорганизмов осуществляли методом криоконсервации замораживанием при низких температурах, в нашем случае при - 80 °C.

Культуры микроорганизмов выращивали на плотной агаровой среде, затем клетки смывали с поверхности стерильной жидкой средой, содержащей 2,5% глюкозы, 0,5% пептона, 0,3% дрожжевого экстракта и 20% глицерина в качестве криопротектора, гомогенизировали и доводили плотность по стандарту мутности не менее 108 клеток/мл и разливали в криопробирки по 0,4 мл суспензии.

**2.2.2 Изучение морфологических, культуральных и биохимических свойств продуцентов бактериальной целлюлозы**

При изучении культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств активных уксуснокислых микроорганизмов использовали стандартные микробиологические среды и методы [204]. Чистоту, выделенных продуцентов определяли органолептическим и микроскопическим способом, и высевом на твердую агаризованную питательную среду. При изучении продуцентов органолептическим способом определяли рост культур на поверхности среды: форма, цвет и консистенция колоний. Для изучения микро морфологических свойств готовили фиксированный препарат, окрашенных по грамму клеток с иммерсионной системой.

Отношение к кислороду изучаемых культур определяли с помощью посева уколом в столбик твердой агаризованной среды Nutrient agar (Himedia, Индия). Отмечали рост и интенсивность по уколу и толще среды. Оксидазную и каталазную активность определяли с помощью стерильных бумажных диагностических дисков (Himedia).

Образование сероводорода и индола оценивали путем культивирования бактерий с использованием стерильных бумажных диагностических полосок (Himedia). Разжижение желатины определяли посредством высева культур микроорганизмов на мясо-пептонную желатину. Посев проводили уколом и культивировали при комнатной температуре 7 суток. Разжижение желатины или его отсутствие отмечали визуально.

Рост культур микроорганизмов на различных источниках углерода оценивали путем высева исследуемых культур на среду Андреде (Himedia) с добавлением стерильных бумажных дисков, пропитанных углеводами.

Условия культивирования при изучении культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств активных уксуснокислых микроорганизмов были при температуре ± 29 °С (кроме разжижения желатины) в статических условиях в течении 7 суток.

**2.2.3 Генетическая идентификация бактерий по консервативному локусу 16S rRNA**

Генетическую идентификацию бактерий проводили методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента 16S rRNA гена. ПЦР продукты 16S rRNA из каждого изолята были секвенированы и нуклеотидные последовательности всех изучаемых штаммов сравнены с нуклеотидными последовательностями 16S rRNA доступных в международной базе данных NCBI.

Из отобранных культур микроорганизмов была выделена ДНК по методике Kate Wilson. Количественный анализ ДНК проводили с использованием спектрофотометра Nanodrob 2000 при длине волны 260/320 нм, после чего все образцы ДНК были доведены до единой концентрации 50 нг/мкл.

ПЦР амплификация фрагмента ДНК выполнена с использованием универсальных праймеров 8f 5’– AgAgTTTgATCCTggCTCAg-3 и 806R- 5’ ggACTACCAgggTATCTAAT [205] в общем объеме 20 мкл. Условия ПЦР амплификации приведены в таблице 4.

Таблица 4 - Условия амплификации

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Условия амплификации | | |
| Т, 0C | Время, мин | Количество циклов |
| 95 | 5 | 1 |
| 95 | 0,5 | 30 |
| 55 | 0,67 |
| 72 | 1 |
| 72 | 7 | 1 |
| 4 | - | 1 |

Анализ амплифицированных целевых фрагментов ДНК проводили методом разделения фрагментов ДНК в 1,5 % агарозном геле, в присутствии интеркалирующего агента – бромистого этидия, который был использован с целью дальнейшей визуализации ДНК. Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза Max Fill HU10, и источником тока «Consort EV 243». В качестве электродного буфера использовали 1х ТАЕ-буфер. Документирование полученных результатов проводили, используя систему документаций гелей Bio-Print.

ПЦР продукты очищали от остатков олигонуклеотидов методом дефосфолирирования с помощью щелочной фосфатазы (SAP – shrimp alkaline phosphatase) и эндонуклеазы I типа.

Реакцию секвенирование проводили с применением набора реагентов для циклического секвенирования с использованием красителей-терминаторов CEQ WellRED (BigDye® Тerminator v3.1Cycle SequencingKits) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов методом капиллярного электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе ABIPrism 310.

Нуклеотидные последовательности, полученные с применением прямого и обратного праймеров проанализированы и объединены в общую последовательность, используя программное обеспечение SeqMan (DNASTAR).

Полученные нуклеотидные последовательности 16S rRNA гена идентифицированы относительно доступных нуклеотидных последовательностей, депонированных в базах данных Gene Bank (www.ncbi.nih.gov), используя алгоритм BLAST. Идентификация осуществлена относительно инвентарных номеров GeneBank первых трех нуклеотидных последовательностей, имеющих максимальное совпадение.

Нуклеотидную последовательность одного штамма использовали для построения филогенетического дерева с референтными нуклеотидными последовательностями, используя программное обеспечение Mega 10.0. Для выравнивания использовали алгоритм Muscal W, который создает высокоточные множественные выравнивания последовательностей, а для построения дерева методом присоединения ближайших соседей (Neighbor-Joining NJ).

**2.2.4 Получение пленок бактериальной целлюлозы**

Продуктивная способность изучалась в 250 мл колбах с 90 мл среды, которую инокулировали 10 мл стартовой культуры и инкубировали при 30 °С в статических условиях 10 суток.

Образование целлюлозы контролировали по появлению белой пленки на поверхности культуральной жидкости. Также для подтверждения структуры целлюлозы требуется дополнительная обработка. Культуральную жидкость центрифугировали в течение 10 минут при 4000 об/мин. После трехкратной промывки дистиллированной водой пленочные слои кипятили в течение 15 минут 0,5N NaOH. Целлюлоза устойчива к этой обработке, и, таким образом, оставшийся материал можно считать целлюлозой, свободной от микробных клеток и компонентов среды.

Очищенная пленка целлюлозы сушилась при 65°C до получения постоянной массы. Продуктивность биоцеллюлозы выражалась в сухой массе г/л культуральной среды [206].

Обесцвечивание целлюлозы выполняли 1% раствором гипохлорита кальция [207].

**2.2.5 Методы оптимизации условий культивирования штаммов продуцентов биоцеллюлозы**

Для подбора оптимальной питательной среды для получения наибольшей биомассы целлюлозы исследуемыми штаммами, использовали следующие среды: среда US, HS, H1-1, Н3-1, GY.

Штаммы микроорганизмов культивировали в 250 мл колбах Эрленмейера в 100 мл питательной среды при температуре 30°С. Продолжительность культивирования составила 8 суток.

Оценку влияния рН на продуктивность биоцеллюлозы проводили при культивировании на питательной среде HS при кислотности среды 4,0; 4,5; 4,6; 4,8; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5. Учет результатов роста культуры проводили по биомассе, полученной биоцеллюлозы через 8 суток.

Для изучения влияния температуры на биосинтез бактериальной целлюлозы, штаммы микроорганизмов культивировали в 250 мл колбах Эрленмейера в 100 мл питательной среды. Температуру культивирования меняли в пределах от 21 до 33°С с шагом 3°С. Продолжительность культивирования составила 8 суток.

Для изучения влияния этилового спирта на биосинтез целлюлозы, штаммы микроорганизмов культивировали при добавлении этилового спитрта в концентрации: 0,5%, 1,0%, 2,0%, 3,0%.

Для продбора оптимального источника углевода для биосинтеза бактериальной целлюлозы, штаммы культивировали в питательной среде с добавлением в качестве углеводов: глюкозу, сахарозу, ксилозу, маннит, лактозу и мальтозу.

В качестве основного показателя для оценки продуктивности культур микроорганизмов использовали биомассу сухой биоцеллюлозы, которая образуется на поверхности среды в виде гель-пленки в ходе культивирования. Методика промывки биоцеллюлозы. Биоцеллюлозу промывали в несколько этапов. На первом этапе БЦ промывали дистиллированной водой, затем после трехкратной промывки водой пленочные слои кипятили в течение 15 минут 0,5N NaOH. Для удаления ионов натрия пленки выдерживали в 0,25%-ном растворе соляной кислоты в течение 1 суток при 20 °С. На последнем этапе биоцеллюлозу промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции. Пленки биоцеллюлозы высушивали при комнатной температуре и использовали в дальнейших исследованиях.

**2.2.6 Исследование биохимического состава и физических свойств пленок бактериальной целлюлозы**

Исследование биохимического состава проводили после отмывки пленок биоцеллюлозы. Количество общего растворимого белка определяли по методу Бредфорда [208]. Для этого образцы перемалывали на кофемолке с просеиванием мелкой фракции через сито. Просеянная фракция служила образцом исследования. Измельченную биоцеллюлозу в количестве 1,00 г. растворяли 0,1 М ацетатным буфером рН=5,5 до 5 мл раствора. Суспензию размешивали на вортексе 5-6 раз, затем центрифугировали при 9000 об/мин 15 минут. Для исследования использовали супернатант.

Определение общего жира проводили по ГОСТ 5668-68 [209]. Для этого 5 г сухой целлюлозы измельченной на кофемолке заливали 50 мл хлороформа в колбу объемом 150 мл с добавлением 5 г натрия карбоната, предварительно высушенный при Т=105°С, далее образцы экстрагировали 2 часа на шейкере при 150 об/мин. Затем суспензию пропускали через бумажный фильтр «красная лента». Фильтрат помещали в заранее взвешенные бюксы в количестве 20 мл, прикрыв бюксы бумажным фильтром образцы, оставляли на ночь под вытяжкой для свободного испарения растворителя. После полного испарения растворителя бюксы помещали в сушильный шкаф при Т=105°С на 2 часа. Далее бюксы взвешивались. В качестве контроля использовали чистый хлороформ.

Конверсию биоцеллюлозы до глюкозы определяли следующим образом, отмытые пленки БЦ измельчали на кофемолке до однородной массы, просеивая через сито. Просеянную фракцию использовали для анализа. В качестве контроля брали чистую целлюлозу (Sigma). Анализ предполагал конверсию целлюлозы до глюкозы кислотным гидролизом серной кислотой, для основы были взяты условия, рекомендованные в статье [210]. Для гидролиза необходимо выдержать образец в 70-75% серной кислоте (в нашем случае 72%). Соотношение 1/50 1 мг образца + 50 мл 72% серной кислоты. К 20 мг образца добавляли 1,2 мл 72% серной кислоты. Затем выдерживали смесь в эппендорфах встряхивая на вортексе до тех пор, пока весь образец не растворился полностью. Следует помнить, что этот этап должен занимать не более 30-40 минут - после этого целлюлоза начинает обугливаться. После полного растворения образца жидкость разбавляли водой в 34 мл воды в 100 мл термостойкой колбе (до 3%), тщательно перемешивали и готовили к автоклавированию. Автоклавирование 2 атм и 134-136°С в течение 2-х часов. Затем образцам давали остыть и доводили рН до 5-7 гидрокарбонатом натрия и объем до 50 мл. в мерных колбах, тщательно перемешивали.

После этого измеряли концентрацию глюкозы с использованием коммерческого набора «Витал» и оценивали степень конверсии целлюлозы.

Массовую долю влаги определяли на анализаторе влажности «MD 83», Vibra, Япония.

Исследование морфологии биоцеллюлозы проводили методом сканирующей электронной микроскопии на микроскопе «JSM-IT200», Jeol, Япония в Назарбаев университете лаборатории микроскопии сверхвысокого разрешения, г. Нур-Султан. Образцы предварительно очищали и высушивали в сушильном шкафу при температуре 80°С. Далее на биопленки напыляли наночастицы золота толщиной 10 нм. Морфологию наблюдали при ускоряющем напряжении 10 кВ.

**2.2.7 Определение антимикробной активности биоцеллюлозы**

Для изучения антимикробной активности пленок бактериальной целлюлозы был использован штамм *Komagataeibacter europaeus* GH1 и в качестве сравнения штамм *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, предоставленный коллегами из института Пищевых наук Варшавского университета естественных наук, Польша.

Антимикробную активность проверяли против штаммов рода *Cronobacter*: *C. condimenti* s37, *C. Muytjensii* s50, *C. Sakazakiil* lv27, *C. turicensisl* lv53 и *C. malonaticusl* lv31 (из института Пищевых наук Варшавского университета естественных наук, Польша).

Полученные пленки биоцеллюлозы промывали дистиллированной водой, затем инкубировали в 1% NaOH при 90°C в течение 45 минут для удаления бактериальных клеток и компонентов среды. После этого пленки нейтрализовали уксусной кислотой и промывали дистиллированной водой [211]. Очищенные пленки БЦ стерилизовали в дистиллированной воде при 121°C в течение 20 мин. После стерилизации пленки БЦ сушили при 25°C. После очистки и сушки пленки биоцеллюлозы нарезали в виде дисков диаметром 8 мм. В качестве положительного контроля использовали фильтровальную бумагу, которую также нарезали в виде дисков диаметром 8 мм.

Для пропитки БЦ-диски были погружены в 5 мл ЭМО на 24 часа при Т= 23 °C и закрывали плотно крышкой во избежания испарения масла. Затем диски вынимали и протирали стерильной фильтровальной бумагой для удаления неабсорбированного масла. Чистые диски БЦ без эфирного масла орегано использовались в качестве отрицательного контроля. Пропитку фильтровальной бумаги ЭМО проводили в тех же условиях, что и пропитку БЦ.

Для определения удерживающей способности ЭМО чистые и гидратированные маслом пленки биоцеллюлозы взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,0001 г. Удерживающая способность ЭМО была рассчитана по формуле (1), каждое измерение проводилось в трех повторностях[212]:

Удерживающая способность ЭМО (%) = (Вг - Вс) / Вс × 100 (1)

Вг – вес гидратированной биоцеллюлозы,

Вс – вес сухой биоцеллюлозы.

Антибактериальная активность биоцеллюлозы, пропитанного ЭМО, была протестирована против пяти штаммов *Chronobacter* диско-диффузным методом. Бактериальный инокулят готовили из суточной культуры на триптон-соевом агаре. Колонии суспендировали в 0,85% физиологическом растворе для получения мутности 0,5° по МакФарланду (приблизительно 8 log КОЕ/мл). Аликвоты по 0,1 мл распределяли по поверхности предварительно высушенных чашек с триптон-соевым агаром с помощью стерильных тампонов. Биоцеллюлозные диски и диски из фильтровальной бумаги с ЭМO и отрицательным контролем без эфирного масла наносили в центр чашки Петри с тест штаммами и инкубировали в течение 24 часов при температуре 35°C [213]. Диаметр зон ингибирования измеряли в трех повторностях в миллиметрах с помощью электронного штангенциркуля. Шкала измерений была следующей: зона сильного подавления ≥20 мм (включая диаметр диска), зона умеренного подавления <20–12 мм и зона отсутствия подавления <12 мм. Все анализы проводились в трех повторностях. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение. Полученные результаты подвергали статистическому анализу с использованием программного обеспечения Statgraphics Plus (версия 5.1).

**3 Результаты исследований и их обсуждение**

**3.1 Выделение активных штаммов бактерий, способных синтезировать биоцеллюлозу**

Выделение и количественный учет микроорганизмов проводили по общепринятым методикам, основанных на выявлении бактерий в питательных растворах, содержащих компоненты питания и энергии, необходимые для жизнедеятельности бактерий каждого вида.

Исходя из знания экологических ниш уксуснокислых бактерий, мы использовали плоды винограда разных сортов и чайный гриб (квас) как источники для выделения бактерий продуцентов целлюлозы.

По литературным данным известно, что микрофлору чайного гриба составляют более 22 видов микроорганизмов представленные уксуснокислыми и молочнокислыми бактериями, а также дрожжевыми грибами, все они находятся в симбиозе и способствуют синтезу полимера целлюлозы [214].

Представителей вида рода *Komagataeibacter* в частности *Komagataeibacter xylinum* и *Komagataeibacter hansenii* очень плохо развиваются на плотных питательных средах, поэтому для выделения продуцента были использованы селективные жидкие и полужидкие среды. Принцип метода заключался в подавлении других представителей микробиоты таких как дрожжи.

Для выделения чистой культуры были использованы образцы симбиоза чайного кваса и гниющих ягод винограда и хурмы. Полученные пленки культивировали на питательной среде HS (рН<3) с добавлением антибиотиков нистатина и кетокондазола, для подавления роста дрожжевых культур микроорганизмов.

Культивирование образцов проводили поверхностным способом в статических условиях в термостате при температуре 30 °С в течении 7 дней.

Из посевов на селективные среды было выделено 17 изолятов. Каждый изолят был выделен в чистую культуру, определена грамм принадлежность клеток и проверены на наличие образования биопленки на жидкой питательной среде HS. Культивирование изолятов проводили поверхностным способом в статических условиях в термостате при температуре 30 °С в течении 7 дней.

Образовавшиеся пленки подвергались обработке в 0,5N NaOH для подтверждения наличия биоцеллюлозы (т.к. целлюлоза не разлагается при воздействиях щелочи), а также для нейтрализации от бактериальных клеток. Пленки кипятили в растворе щелочи и тщательно промывали под проточной дистиллированной водой. Данные по изолятам представлены в таблице 5.

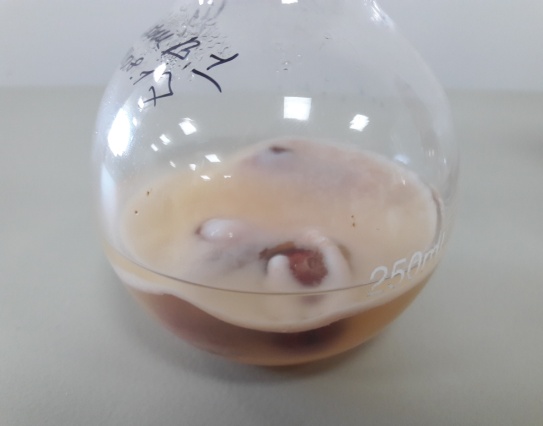
Таблица 5 – Выделенные культуры бактерий, продуценты биоцеллюлозы

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Источник | Изолят | Микроскопия по Граму | Продуктивность биоцеллюлозы |
| Виноград 1 | GV1 | - | +++ |
| Виноград 1 | GV2 | - | ++ |
| Виноград 1 | GV3 | - | ++ |
| Хурма 1 | Ghu1 | - | + |
| Хурма 2 | Ghu1 | - | + |
| Хурма 2 | Ghu3 | - | ++ |
| Чайный гриб 1 | GH1 | - | ++++ |
| Чайный гриб 2 | GH2 | - | ++++ |
| Чайный гриб 1 | GH3 | - | ++ |
| Чайный гриб 2 | GH4 | - | ++ |
| Чайный гриб 2 | GH5 | - | ++ |
| Чайный гриб 3 | GH6 | - | ++ |
| Чайный гриб 3 | GH7 | - | + |
| Виноград 2 | GV4 | - | ++ |
| Виноград 3 | GV5 | - | + |
| Виноград 3 | GV6 | - | + |
| Виноград 3 | GV7 | - | + |
| Примечания  «++++» - высокая продуктивность биоцеллюлозы  «+++» - средняя продуктивность биоцеллюлозы  «++» - слабая продуктивность биоцеллюлозы  «+» - очень слабая продуктивность биоцеллюлозы | | | |

Продуктивность выделенных культур бактерий оценивали визуально по шкале высокая «++++», средняя «++», слабая «++», очень слабая «+». Большинство культур бактерий продуцировали небольшое количество бактериальной целлюлозы и по внешнему виду они были представлены виде тонких пленок, способные легко повреждаться.

Только три культуры бактерий продуцировали наибольшее количество биоцеллюлозы с хорошими физическими свойствами.

На рисунке 13 представлены образцы биоцеллюлозы полученные из поверхности пленки гниющих ягод винограда и чайного гриба.

** **

А Б



В

А – пленка из ягод винограда, Б - чайный гриб,

В - отмытые биоцеллюлозные пленки

Рисунок 13 – Пленки биоцеллюлозы

Таким образом в результате работы было отобрано три изолята уксуснокислых бактерий. Культуры GV1, выделенный из поверхности гниющих ягод винограда сорт Гурман ранний (1-12, Нежность), GH1 и GH2 из чайного гриба, показали лучшую продукцию целлюлозы по сравнению с другими изолятами, способных продуцировать биоцеллюлозу.

**3.2 Изучение морфологических, физиологических и культуральных свойств бактерий-продуцентов**

Изучение морфолого-биохимических свойств исследуемых бактерий показало, что культура GH1 образует при росте на твердой питательной среде колонии округлой формы бежевого оттенка с глянцевой поверхностью, край колонии волнистый, структура однородная, профиль выпуклый, консистенция сухая, размеры колонии варьируются от 0,5-3 мм, пигмент в среду не выделяет. Культура GH2 образует мелкие круглые выпуклые колонии бежевого оттенка с глянцевой поверхностью, однородной структуры, край колонии ровный по консистенции сухая, размеры варьируются от 0,5-3 мм, пигмент в среду не выделяет. Культура GV1 образует круглые колонии белового цвета с ровными краями и выпуклым профилем, колонии с глянцевой поверхностью однородной структуры и сухой консистенции, размеры колоний от 2 до 5 мм, пигмент в среду не выделяет.

По микро морфологическим свойствам культуры бактерий представлены грамотрицательными палочками, расположены одиночно, парами или цепочками (рисунок 14, таблица 6).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| C:\Users\nguld\Documents\NCB\Фото\Биоцеллюлоза\20180921_110008.jpg | C:\Users\nguld\Documents\NCB\Фото\Биоцеллюлоза\GH1.jpg | C:\Users\nguld\Documents\NCB\Фото\Биоцеллюлоза\20180921_110132.jpg | C:\Users\nguld\Documents\NCB\Фото\Биоцеллюлоза\GH2.jpg |
| GH1 | | GH2 | |
| C:\Users\nguld\Documents\NCB\Фото\Биоцеллюлоза\20180921_105928.jpg | | C:\Users\nguld\Documents\NCB\Фото\Биоцеллюлоза\GV1.jpg | |
| GV1 | | | |

Рисунок 14 – Макро и микроскопические свойства клеток

Таблица 6 – Культуральные свойства бактерий

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Изолят | GH1 | GH2 | GV1 |
| Форма колонии | круглая | круглая | круглая |
| Оптические свойства колонии | глянцевая | глянцевая | глянцевая |
| Цвет колонии | бежевый | бежевый | белый |
| Окраска по Граму | - | - | - |
| Форма клеток | п | п | П |
| Край колонии | волнистый | ровный | ровный |
| Размеры колониий, мм | 0,5-3 | 0,5-3 | 2-5 |
| Профиль колонии | выпуклый | выпуклый | выпуклый |
| Продолжение таблицы 6 | | | |
| Структура колонии | однородная | однородная | однородная |
| Консистенция колонии | сухая | сухая | сухая |
| Выделение пигмента | - | - | - |
| Примечания  1 «п» – палочки  2 «-» – не выделяет | | | |

По отношению к кислороду изучаемые микроорганизмы продуценты бактериальной целлюлозы были отнесены к облигатным эробам. Для всех исследуемых культур микроорганизмов характерны общие признаки – каталазаположительные, оксидаза и уреаза отрицательные. Также изоляты не продуцируют сероводород и индол и не способны разжижать желатин, но способны продуцировать кислоты. Наличие газообразования у исследуемых культур микроорганизмов не наблюдалось данные представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Биохимические свойства изолятов бактерий

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Изолят | Отношение к О2 | Наличие каталазы | Наличие оксидазы | Наличие уреазы | Разжижжение желатины | Образование H2S | Образование индола | Кислотообразование | Газообразование |
| GH1 | Облигатный аэроб | + | - | - | - | - | - | + | - |
| GH2 | Облигатный аэроб | + | - | - | - | - | - | + | - |
| GV1 | Облигатный аэроб | + | - | - | - | - | - | + | - |

Изучение способности культур микроорганизмов, продуцирующие бактериальную целлюлозу, усваивать различные углеводы показало, что изолят GH1 способен утилизировать все углеводы кроме рафинозы, сахарозы, сорбитола, галактозы и дульцита. Культура GH2 не усваивает сахарозу, арабинозу, галактозу, целлобиозу, ксилозу и фруктозу. Культура GV1 утилизирует все углеводы кроме рамнозы, трегалозы, ксилозы, адонита и фруктозы. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Усвоение углеводов микроорганизмами

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Углеводы | GH1 | GH2 | GV1 |
| Рафиноза | - | + | + |
| Рамноза | + | + | - |
| Инулин | + | + | + |
| Мелибиоза | + | + | + |
| Сахароза | - | - | + |
| Лактоза | + | + | + |
| Трегалоза | + | + | - |
| Сорбитол | - | + | + |
| Инозит | + | + | + |
| Арабиноза | + | - | + |
| Галактоза | - | - | + |
| Целлобиоза | + | - | + |
| Ксилоза | + | - | - |
| Адонит | + | + | - |
| Маннит | + | + | + |
| Дульцид | - | + | + |
| Салицин | + | + | + |
| Фруктоза | + | - | - |
| Мальтоза | + | + | + |
| Глюкоза | + | + | + |
| Примечания  «+» положительная реакция  «-» - отрицательная реакция | | | |

**3.3 Идентификация отобранных продуцентов по консервативному локусу 16S rRNA**

Идентификацию уксуснокислых бактерий проводили на основе физиолого-биохимических тестов. Штаммы идентифицировались до вида с помощью диагностических ключей определителя бактерий Берджи [202].

В результате работы по определителю бактерий Берджи [202] данные культуры микроорганизмов были отнесены к роду *Komagataeibacter*. Для подтверждения результатов фенотипической идентификации и уточнения таксономической принадлежности выделенных культур уксуснокислых бактерий, выполнена идентификация с помощью генетической идентификацией по консервативному локусу 16S rRNA (таблица 9).

Таблица 9 – Нуклеотидная последовательность бактерий

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование | Нуклеотидная последовательность | Вид | номер | % |
| GH1 | GGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTGACACAGTCAGATGTGAAATTCCTGGGCTTAACCTGGGGGCTGCATTTGATACGTGGCGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATTCCCAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCAACCTGGCTCATGACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGTGCTGGATGTTGGGTGACTTTGTCATTCAGTGTCGTAGTTAACGCGATAAGCACACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGCTTGACATGCGGAGGCCGTGTCCAGAGATGGGCATTTCTCGCAAGAGACCTCCAGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCATC  ACGTCTGGGTGGGCACTCTAAAGGAACTGCCGGTGACAAGCCGGAG  GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGTCCTGGGCTAC | [*Komagataeibacter*](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1376499177) *europaeus* | [MH845618.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MH845618.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=0JGBDEPR013) | 100 |
| Продолжение таблицы 9 | | | | |
|  | ACACGTGCTACAATGGCGGTG  ACAGTGGGAAGCCAGGTAGCGATACCGAGCCGATCTCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGGTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTGACCTTAAGCCGGTGAGCGAACCGCAAGGACGCAGCCGACCACGGTCGGGTCAGCGACTGGG |  |  |  |
| GH2 | GAACTTTCGGGGTTAGTGAGCGGACGGGGTGAGTAACGCGTACGGATCTGTCCATGGGTGGGGGATAACTTTGGGAACTGAAGCTTTACCGCATGACACCTGAGGGTCAAGGCGCAAGTCCCTGTGGAGGGACCTGCGTTCGTTAGTAGTTGGTGGTGTAAAGGCTACCAGGTGTCAGGTCAGCATATCGCGCTCAGCGTCAGTCATGAGCCAGGTTGCCGCCTTACGCCACCGGTGTTCTTCCCAATATCTACGAATTTCACCTCTACACTGGGAATTCCACAACCCTCTCTCACACTCTAGTCATCACGTATCAAATGCAGCCCCCAGGTTAAGCCCGGGAATTTCACATCTGACTGTAACAACCGCCTACGCGCCCTTTACGCCCAGTCATTCCGAGCAACGCTTGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTGCGGGTACCGTCATCATCGTCCCCGCTGAAAGTGCTTTACAATCCGAAAACCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA | [*Komagataeibacter sp.*](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1345643094) | [MG971343.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MG971343.1?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=60&RID=FUK792ZA014) | 99,06 |
| Продолжение таблицы 9 | | | | |
|  | GGAGTCTGGGCCGGGTCTCATTCCCA |  |  |  |
| GV1 | GGTACTGTCGTCATACATACCATGCAGTCGCACGACTTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGGATCTGTCCATGGGTGGGGGATAACTTTGGGAAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTCGGATTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGACGATGATGACGGTACCCGCCTAAGAACCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCACCCGCGGTAATACAAAAGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGATCGGCCTGAAAGGGGCCCGTAGGCCGGGGGGGGGGGGTAAACATGTGAAATGTCCTGGCCCTAAACCTGTGGGGCCGCTTTTACACACGAGTAGATCAGTCTCTCA  CGCCTCAGCGTCAGTCATGAGCCAGGTTGCCGCCTTACGCCACCGG  TGTTCTTCCCAATATCTACGAATTTCACCTCTACACTGGGAATTCCAC  AACCCTCTCTCACACTCTAGTCGCCACGTATCAAATGCAGCCCCCAGGTTAAGCCCAGGAATTTCACATCTGACTGTGTCAACCGCCTACGCGCCCTTTACGCCCAGTCATTCCGAGCAACG | [*Komagataeibacter sp.*](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_1345643094) | MG971339.1 | 99,6 |
| Продолжение таблицы 9 | | | | |
|  | CTTGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTGCGGGTACCGTCATCATCGTCCCCGCTGAAAGTGCTTTACAATCCGAAAACCTTCTTCACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTATCGATCATCGCCTTGGTAGGGCCTTTACCCCACCAACTAGCTAATCGAACG |  |  |  |

Согласно программе BLAST Национального центра биотехнологической информации (NCBI), изолят GH1, выделенный из чайного гриба показал 100% соответствие с *Komagataeibacter europaeus*, изолят GH2, выделенный также из чайного гриба на 99,06% имел сходство с *Komagataeibacter sp.* и культура GV1, виделенная из поверхности пленки гниющего винограда на 99,60% сходства с *Komagataeibacter sp.*

Результаты анализа нуклеотидных последовательностей методом генетической идентификацией по консервативному локусу 16S rRNA подтвердили родовую принадлежность всех трех исследуемых культур уксуснокислых бактерий.

**3.4 Оптимизация условий культивирования штаммов продуцентов по физико-химическим параметрам**

Для биосинтеза целлюлозы уксуснокислые бактерии в основном используют в качестве единственного источника углерода - сахара. Для определения оптимального источника углеводов для продуцирования биоцеллюлозы исследуемые штаммы были культувированы на питательной среде с с добавлением различных угеводов (глюкоза, сахароза, ксилоза, маннит, мальтоза и лактоза.), в колическтве 2 г.

Son с соавторами сообщили о том, что наибольший выход БЦ был получен при концентрации глюкозы в среде в пределах от 1,5 % до 2 % [215]. В связи с этим для биосинтеза бактериальной целлюлозы использовали 2% концентрацию сахаров. Температура среды 27-28 °С, рН – 6,0.

Штаммы бактерий культивировали поверхностным способом в термостате при температуре 30 °С в течении 7 суток.

В качестве оценки продуктивности штаммов использовали сухую массу биоцеллюлозы после очищения и сушки и взвешивали на аналитических весах. Результаты исследования представлены на рисунке 15.

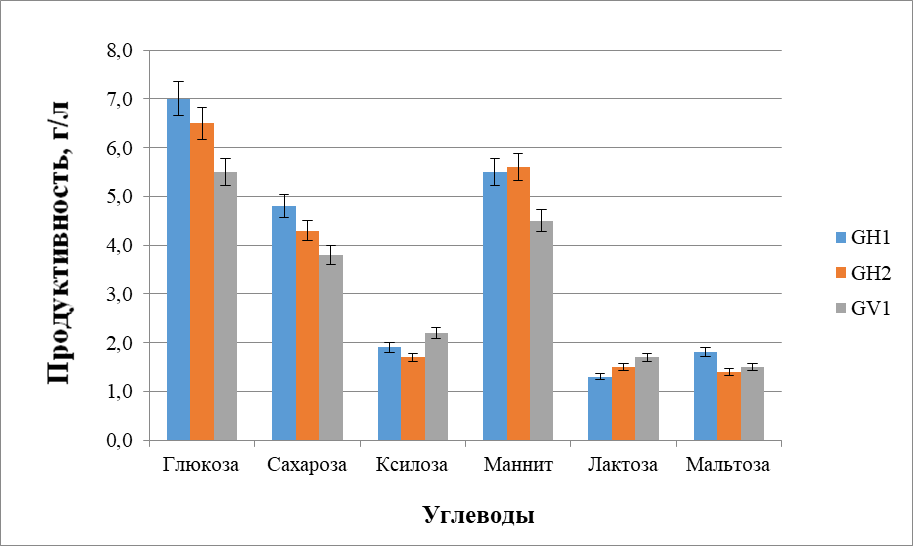


Рисунок 15 – Влияние источника углерода на биосинтез целлюлозы

В результате проведенных исследований было выявлено, что наибольший выход биоцеллюлозы наблюдался при культивировании продуцентов на глюкозе и составило 7,0 г/л у штамма *Komagataeibacter europaeus* GH1, 6,5 г/л у штамма *Komagataeibacter sp*. GH2 и 5,5 г/л у штамма *Komagataeibacter sp*. GV1. Также набольший результат после глюкозы показал при культивировании на манните – 5,5 г/л, 5,6 г/л и 4,5 г/л у штаммов *Komagataeibacter europaeus* GH1, *Komagataeibacter sp*. GH2 и *Komagataeibacter sp*. GV1 соответственно. При использовании в качестве источника углерода сахарозы, количество продуцируемой целлюлозы отобранными микроорганизмами значительно снижалось и составила на 2 – 2,5 г/л меньше по сравнению с количеством биоцеллюлозы, полученным при использовании глюкозы. Наименьший выход биоцеллюлозы наблюдали при культивировании штаммов на лактозе, мальтозе и ксилозе.

Таким образом, для дальнейших исследований целесообразно использовать глюкозу в качестве углерода для биосинтеза бактериальной целлюлозы.

Для оптимизации условий культивирования штаммов продуцентов изучали влияние температуры выращивания исследуемых культур уксуснокислых бактерий на выход целлюлозы. Температуру меняли в пределах от 21 °С до 33 °С с шагом 3 °С, рН среды – 6.

В качестве оценки продуктивности штаммов использовали сухую массу биоцеллюлозы после отмывания и сушки, данные представлены на рисунке 16.

Условия культивирования проводили поверхностным способом в термостатах при соответствующих температурных режимах в течении 7 суток.

Рисунок 16 – Влияние температуры культивирования на биосинтез целлюлозы

Результаты исследований показали, что оптимальные условия культивирования для штаммов *Komagataeibacter europaeus* GH1 и *Komagataeibacter sp.* GH2 являются температура в диапазоне от 27 до 30 °С, так как именно в этом диапазоне наблюдали наибольший выход биоцеллюлозы. В результате культивирования в данном диапазоне масса бактериальной целлюлозы составила 7,4 и 7,5 г/л. Для культуры *Komagataeibacter sp.* GV1 оптимальная температура являлась 27 °С и составило 5,5 г/л биомассы бактериальной целлюлозы. При культивировании штамма *Komagataeibacter sp.* GV1 в условиях 30 °С отмечалось снижение биомассы целлюлозы.

Культивирование при температуре 33 °С не дало выход биомассы бактериальной целлюлозы. Вероятно, при температуре выше 30 °С могут происходить конформационные изменения ферментов, входящих в целлюлозосинтезирующий комплекс [216].

Для оптимизации условий культивирования штаммов продуцентов биоцеллюлозы подбирали концентрацию этилового спитра. Известно, что этиловый спирт является стимулятором синтеза целлюлозы [217], так как он связывает мутантные клетки бактерий не способные к синтезу бактериальной целлюлозы [218].

Кроме того, считается, что этанол приводит к образованию восстановленных форм никотинамидадениндинуклеотида, что снижает окислительно-восстановительный потенциал до уровней, необходимых для синтеза продукта. Также предпологается, что

этанол функционирует как источник энергии для образования АТФ на ранней стадии ферментации в гексозомонофосфатном пути [219].

Для определения оптимальной концентрации этанола, в стерильную питательную среду добавляли этиловый спирт в концентрации: 0,5%, 1,0%, 2.0%, 3,0% и контроль без добавления этанола. В качестве оценки продуктивности штаммов использовали сухую массу биоцеллюлозы после очищения и сушки (рисунок 17).

Рисунок 17 – Влияние этилового спирта на биосинтез целлюлозы

По данным результатов видно, что максимальный выход биомассы целлюлозы наблюдается при добавлении в питательную среду 1% этилового спирта. Этиловый спирт в качестве дополнительного источника углерода, увеличивает содержание АТФ в жизнеспособных клетках, и скорость потребления глюкозы. Однако повышение концентрации этанола более 1,5 % способствовало снижению скорости продукции биоцеллюлозы из-за ингибирования роста клеток образующимся ацетатом. В работе [220] наблюдали прекращение синтеза биоцеллюлозы при концентрации выше 2%.

У штаммов *Komagataeibacter europaeus* GH1 и *Komagataeibacter sp.* GН2 прирост биомассы целлюлозы составил 6,3 г/л и 7,4 г/л, а в контроле без добавления этилового спирта выход был 3,4 г/л и 2,7 г/л соответственно. У штамма *Komagataeibacter sp.* GV1 увеличение выхода биоцеллюлозы было не большим из 3,0 г/л увеличилось до 4,6 г/л.

Одним из основных факторов, влияющих на рост и накопление биомассы целлюлозы уксуснокислыми бактериями является кислотность среды (рН).

По литературным данным известно, что представители рода *Komagataeibacter* (*Gluconacetobacter*) способны расти при низких значениях рН [221]. Для изучения влияния рН среды на биосинтез биоцеллюлозы штаммы GH1, GH2 и GV1 культивировали на питательной среде при следующих значениях кислотности среды: 4,0; 4,5; 4,6; 4,8; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5. Для снижения рН использовали уксусную кислоту, т.к. она является одним из продуктов энергетического обмена [222].

После 8 суток культивирования продуктивность исследуемых штаммов оценивали путем наибольшего накопления биомассы целлюлозы. Гель пленки предварительно очищали в 0,5N NaOH, затем промывали в 9% растворе уксусной кислоты для нейтрализации рН, далее отмытые пленки сушили при комнатной температуре и взвешивали на аналитических весах. Результаты исследований представлены на рисунке 18.

Рисунок 18 – Зависимость продуктивности бактериальной целлюлозы при различных рН

Как видно на рисунке у двух штаммов *Komagataeibacter* *europaeus* GH1 и *Komagataeibacter* *sp*. GH2 максимальный выход биомассы бактериальной целлюлозы наблюдали при рН 4,8 и составило 9,9 г/л и 10,1 г/л соответственно, а у штамма *Komagataeibacter* *sp*. GV1 при 5,5 выход составил 6,5 г/л. Затем при рН 5,0 и выше наблюдали снижение биосинтеза целлюлозы у штаммов GH1 и GH2 и при 6,0 у штамма GV1, тем самым можно сделать вывод, что даже незначительное отклонение значения кислотности среды, может повлиять на снижение количества биоцеллюлозы. Оптимальным для роста штаммов *Komagataeibacter* *europaeus* GH1 и *Komagataeibacter* *sp*. GH2 и накопления ими биомассы целлюлозы явялется рН – 4,8, а для штамма *Komagataeibacter* *sp*. GV1 – 5,5. Также следует отметить, что извлеченные пленки после культивирования на поверхности питательной среды при данных значениях рН характеризовались высокой прочностью.

Для оптимизации условий культивирования нами было изучено влияние различных питательных сред на выход бактериальной целлюлозы. Для этого нами было выбрано 5 культуральных сред (указанных в главе 2), на которых штаммы уксуснокислых бактерий способны синтезировать биоцеллюлозу и отобрать наиболее благоприятную для максимального выхода продукта.

Штаммы культивировали поверхностным способом в 250 мл колбах Эрленмейера в 100 мл питательной среды при температуре 30 °С в течении 7 суток.

В качестве оценки продуктивности штаммов использовали сухую массу биоцеллюлозы после очищения и сушки. Результаты исследований представлены ниже (рисунок 19).

Рисунок 19 – Показатель продуктивности биоцеллюлозы на питательных средах

Результаты исследований на 8 сутки показали, что штаммы уксуснокислых бактерий растут на всех питательных средах, но самый высокий показатель биомассы полимера была на среде GY и составила у *Komagataeibacter* *europaeus* GH1-27,92 г/л, *Komagataeibacter* *sp.* GH2-30,42 г/л и у *Komagataeibacter* *sp* GV1-14,08 г/л и также вторым по показателям была среда HS, где выход продукта составил: 8,27 г/л, 8,16 г/л и 5,57 г/л соответственно. Однако следует учитывать, что в среде GY исходное количество глюкозы было 100 г/л (10%), а в среде HS 20 г/л (2%), тем самым конверсия сахара в биоцеллюлозу на среде GY составила 27,92%, 30,4% и 14,08% соответственно для трех штаммов, а на HS – 41,35%, 40,8% и 27,85%, следовательно, на среде GY экономический коэффициент ниже чем на среде HS.

Степень конверсии биоцеллюлозы из углеводов высчитывали для каждой питательной среды, данные приведены на рисунке 20.

Рисунок 20 – Степень конверсии биоцеллюлозы

Поэтому для дальнейших работ для культивирования продуцентов биоцеллюлозы целесообразно использовать среду HS.

При культивировании на других средах биосинтез целлюлозы был ниже, и также наблюдали отличие в структуре биопленок, пленки биоцеллюлозы характеризовались не высокой прочностью.

Таким образом, экспериментальным методом определены оптимальные условия для максимального накопления биомассы целлюлозы отобранными нами продуцентами. Культивирование данных штаммов при соблюдении всех оптимальных параметрах среды и условий их культивирования (среда HS, температура 30 °С, рН 4,8 для штаммов GH1 и GH2, и 27 °С, рН 5,5 для штамма GV1, 1% этиловый спирт, статические условия в течении 8 суток) показало повышение выхода продукта по сравнению с начальными данными, результаты представлены на рисунке 20.

Рисунок 20 – Продуктивность биоцеллюлозы до и после оптимизации условий культивирования

При поверхностном культивировании в оптимальных условиях среды максимальный выход биоцеллюлозы штамма *Komagataeibacter europaeus* GH1 составил 12,6 г/л, у штамма *Komagataeibacter sp.* GH2 – 10,04 г/л, у штамма *Komagataeibacter sp.* GV1 – 9,06 г/л.

**3.5 Исследование биохимического состава и физических свойств пленок бактериальной целлюлозы, полученных при культивировании штаммов в поверхностных условиях**

Большое значение для оценки качества бактериальной целлюлозы является ее биохимический состав. Определение биохимического состава биоцеллюлозы проводили для очищенных пленок. В составе биоцеллюлозы определяли белки, жиры и степень конверсии также определяли количество влаги в нативном полимере, результаты представлены в таблице 10.

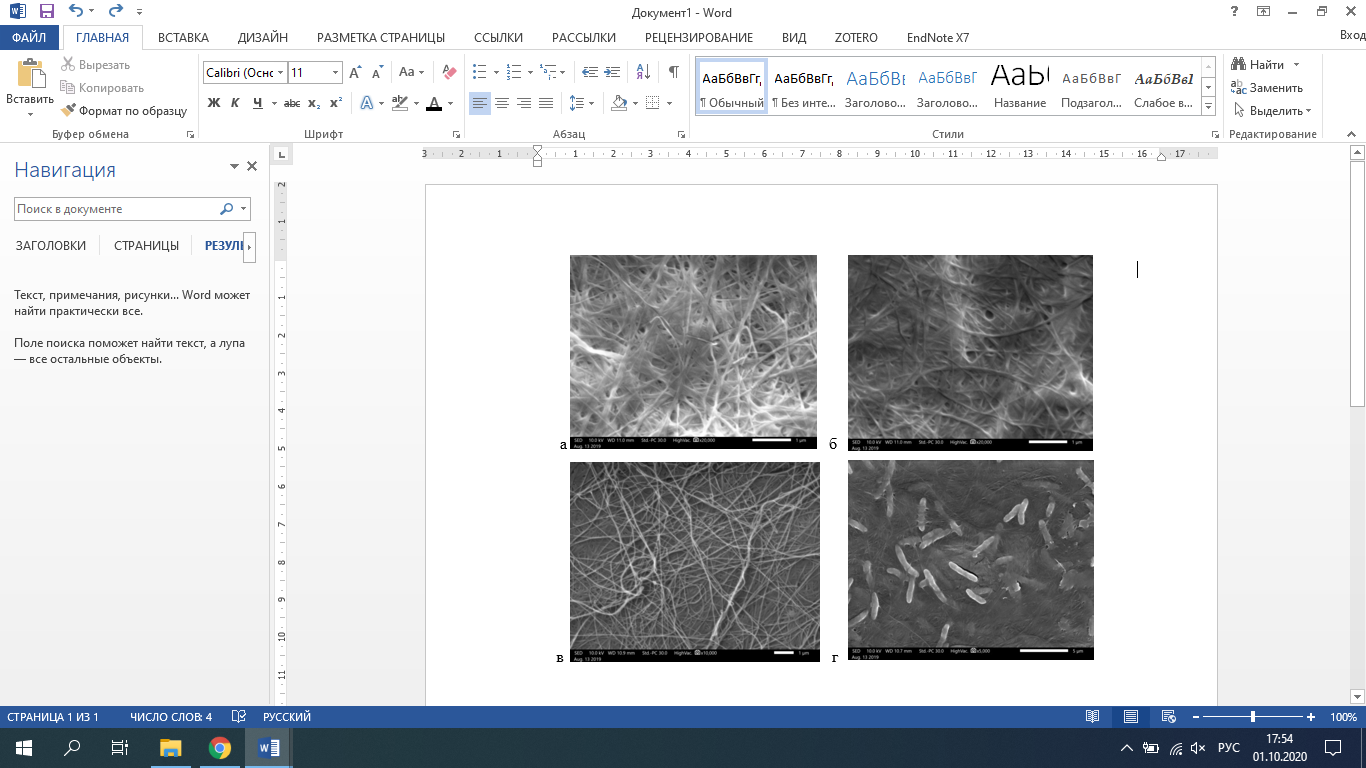
Таблица 10 – Биохимический состав, и физические свойства биоцеллюлозы

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Наименование штамма | Общий белок, мг/г сухой пленки | Жиры, мг/г сухой пленки | Степень конверсии биоцеллюлозы, % | Количество влаги в нативном полимере, % |
| *Komagataeibacter europaeus* GH1 | 6,65±0,11 | 0,011±0,002 | 63,0±0,97 | 98,36±0,23 |
| *Komagataeibacter sp.*GH2 | 6,52±0,24 | 0,018±0,003 | 50,2±0,96 | 97,13±0,15 |
| *Komagataeibacter sp.*GV1 | 6,47±0,21 | 0,015±0,002 | 45,3±0,69 | 97,00±0,10 |

Исследования показали, что в целлюлозной пленке содержание белка составило у штаммов *Komagataeibacter europaeus* GH1 - 0,66%; *Komagataeibacter sp.* GH2 – 0,65%; *Komagataeibacter sp.* GV1 – 0,64%, содержание жиров было в следовых количествах, а степень конверсии целлюлозы в глюкозу было в пределах от 45 до 63%, при этом максимальная степень конверсии наблюдалась у штамма *Komagataeibacter sp* GH1. Количество влаги в нативных полимерах штаммов составило 97-98%.

По результатам исследований можно сделать вывод, что целлюлоза исследуемых штаммов содержит минимальное количество белка и жиров.

Морфологию очищенных пленок биоцеллюлозы и неочищенной, содержащая клетки бактерий штамма *Komagataeibacter europaeus* GH1 исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии на микроскопе «JSM-IT200», Jeol при ускоряющем напряжении 10 кВ (рисунок 21).



а – биоцеллюлоза штамма GH1 при разрешении 1 µm; б – биоцеллюлоза штамма GH2 при разрешении 1 µm; в – БЦ штамма GV1при разрешении 1 µm;г – неочищенная БЦ с клетками штамма GН1, при разрешении 5 µm

Рисунок 21 – Изображения СЭМ целлюлозных пленок

На рисунке видно, что образцы состоят из трехмерных пористых сетчатых структур, состоящие из случайно расположенных ленточных ультрадисперсных фибрилл. На изображениях «a», «б», «в» показаны очищенные пленки исследуемых штаммов, на которых видно, что у штаммов GH2 и GV1 нити толще, чем у GH1, а на изображении «г» представлена неочищенная от бактерий целлюлозная пленка штамма GH1, на рисунке видно, как бактерии образуют тяжи фибрилл целлюлозы, создавая трехмерную сетчатую структуру с порами.

Таким образом, можно сделать вывод, что исследуемые штаммы продуцируют биоцеллюлозу с различной морфологической структурой волокон, при этом у штамма *Komagataeibacter europaeus* GH1 наблюдалась более плотная структура.

**3.6 Исследование способности пленок биоцеллюлозы адсорбировать антимикробные соединения и оценка антимикробных свойств**

Для снижения передачи патогенов целесообразнее использовать эфирные масла в качестве антибактериальных агентов, так как во всем мире наблюдается повышение резистентности к антибиотикам. Поэтому в качестве противомикробного агента для пропитки биоцеллюлозных пленок использовали неразбавленные объемы эфирного масла орегано (Sigma-Aldrich). Орегано является одним из протестированных масел против многих бактериальных штаммов. Также данное масло может использоваться как пищевой консервант.

По данным [M. Fournomiti](https://www.tandfonline.com/author/Fournomiti%2C+Maria) ЭМО обладает высокой антибактериальной активностью по сравнению с другими маслами с минимальной ингибирующей концентрацией от 0,5 мкг/мл.

Исследования по изучению способности пленок биоцеллюлозы адсорбировать антимикробные соединения и оценки антимикробных свойств были проведены в Варшавском университете естественных наук (г. Варшава, Польша) на кафедре пищевых технологий, лаборатории технологии молока, поэтому для работы был выбран один перспективный штамм – *Komagataeibacter europaeus* GH1, который производит более плотную биоцеллюллозу по сравнению с двумя другими штаммами.

Для начала необходимо было определить удерживающую способность эфирного масла орегано пленками биоцеллюлозы. Бактериальная целлюлоза имеет нанопористую структуру и обладает высокой способностью к набуханию, что позволяет насыщать и высвобождать лекарственные вещества [223]. Поэтому мы проанализировали способность двух видов образцов биоцеллюлозы, одного из *Gluconobacter hansenii* ATCC 23769, предоставленного из коллекции лаборатории технологии молока Варшавского университета естественных нук, а второго из *Komagataeibacter europaeus* GH1 для поглощения и удержания эфирного масла орегано (рисунок 22).

Рисунок 22 – Удерживающая способность ЭМО пленками БЦ

В результате работы было определено, что пленки бактериальной целлюлозы, пропитанные ЭМО, обладают хорошей удерживающей способностью. Биоцеллюлоза штамма *Komagataeibacter europaeus* GH1 был способен лучше поглощать и удерживать ЭМО по сравнению с биоцеллюлозой, произведенным *G. hansenii* ATCC 23769. Вероятно, эти различия в удерживающей способности ЭМО связаны с различным расположением целлюлозных волокон, а также размером и объемом пор. Различия в удерживающей способности ЭМО могли быть следствием разницы во влажности во время сушки дисков биоцеллюлозы.

На основании литературных данных можно предположить, что это могло быть фактором, влияющим на разницу в удерживающей способности между биоцеллюлозами, полученным из ATCC 23769 и штамма GH1 [224, 225].

Далее была проведена оценка антимикробной активности пленок биоцеллюлозы штамма *G. hansenii* ATCC 23769 и *Komagataeibacter europaeus* GH1, пропитанного ЭМО против пяти штаммов рода *Cronobacter.*

Бактерии рода *Cronobacter* spp. были выделены из пищевых и экологических, человеческих и клинических источников. *Cronobacter* может встречаться в самых разных продуктах, включая растительные материалы, детские смеси, сыр, сушеные продукты и мясо, а также воду [226].

Род *Cronobacter* ассоциируется с редкими, но опасными для жизни заболеваниями, в основном у новорожденных и детей грудного возраста, включая менингит, септицемию и некротизирующий энтероколит [227,228], а также у пожилых людей и взрослых с ослабленным иммунитетом, включая пневмонию, септицемию, остеомиелит, абсцессы селезенки. и раневые инфекции [229,230].

Литературные данные о чувствительности бактерий рода *Cronobacter* к ингибирующему действию ЭМ ограничены и касаются в основном бактерий вида *C. sakazakii.*Недостаточно научных отчетов, в которых изучалось ингибирующее действие нескольких эфирных масел и карвакрола, тимола, эвгенола и коричной кислоты/транскоричного альдегида на *C. sakazakii* и *C. malonaticus* [201]. Данные о потенциальной чувствительности других видов рода *Cronobacter* к ЭМ и активным веществам растительного происхождения все еще очень скудны. В связи с этим для работы были взяты данные патогенные штаммы.

Результаты антимикробной активности биоцеллюлозы, пропитанного ЭМО диско-диффузионным методом, показаны на рисунке 23 и в таблице 11.

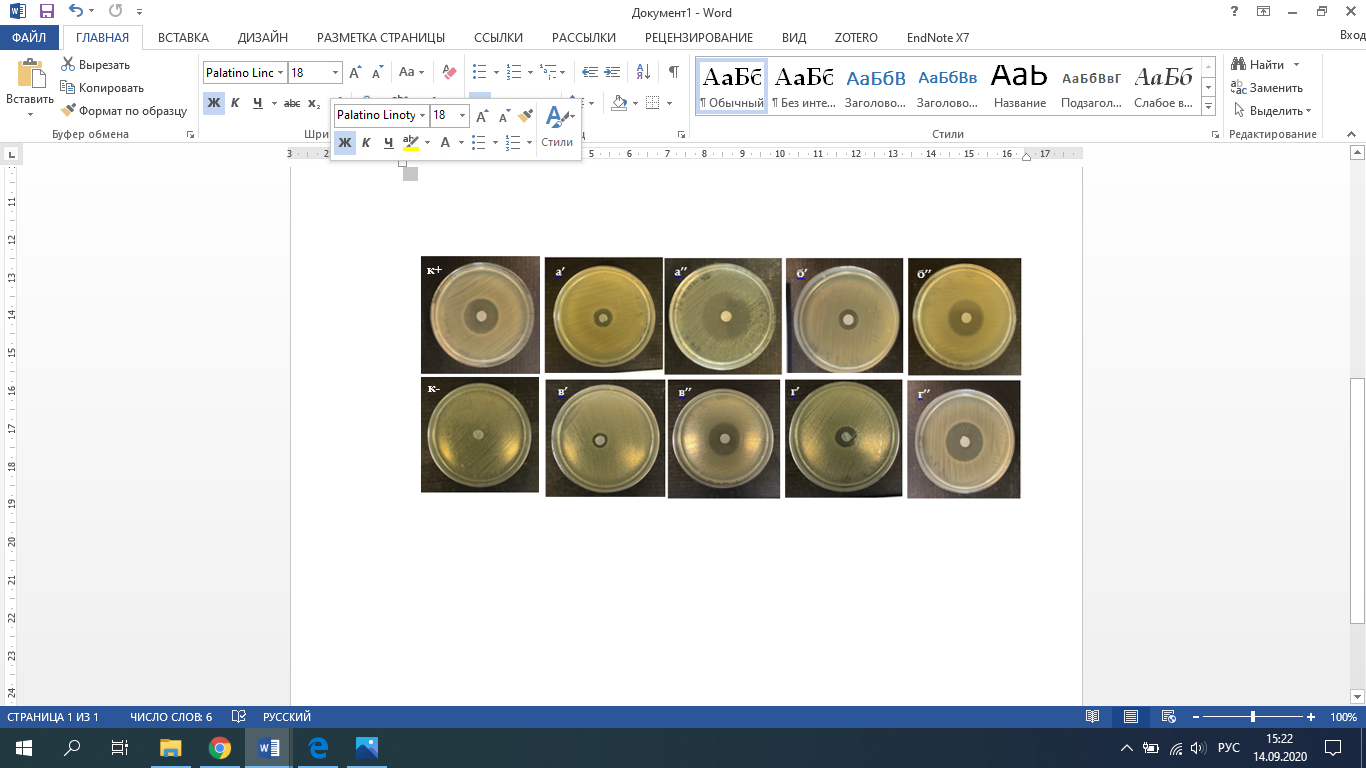


Рисунок 23 – Зоны ингибирования против a - *C. condiment*i s37; б - *C. muytjensii* s50; в - *C. turicensis* lv*53*; г - *C. malonaticus* lv31, вызванные дисками БЦ с ЭМО, *G. hansenii* ATCC 23769 (') и *Komagataeibacter europaeus* GH1 (’’); к «+» - положительный контроль фильтровальная бумага и ЭМО; к «–» - отрицательный контроль БЦ без ЭМО

Таблица 11 – Диаметр зон ингибирования, среднее значение ± стандартное отклонение мм)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Штаммы рода  *Cronobacter* | БЦ с ЭМО, продуцируемая  *G. hansenii*  ATCC 23769 | БЦ с ЭМО, продуцируемая  *Komogataeibacter europaeus* GH1 | Фильтровальная бумага |
| *C. condimenti*s37 | 14,7±0,8 | 32,75±2,8 | 36,0±0,7 |
| *C. muytjensii*s50 | 14,5±0,5 | 17,23±0,8 | 35,8±0,9 |
| *C. sakazakii*lv27 | 14,1±0,4 | 16,39±0,7 | 33,5±1,5 |
| *C. turicensis*lv53 | 13,6±0,8 | 18,19±0,3 | 30,5±0,5 |
| *C. malonaticus*lv31 | 14,3±0,5 | 28,33±2,6 | 27,1±0,7 |

Было обнаружено, что пленки БЦ и фильтровальная бумага, пропитанная ЭМО, демонстрируют зону сильного и умеренного ингибирования против всех пяти штаммов *Cronobacter*, и диаметр составляет от 13,6 ± 0,8 мм до 36,0 ± 0,7 мм. Было показано, что БЦ продуцируемая *Komogataeibacter europaeus* GH1, пропитанная ЭМО, проявляет сильный антимикробный эффект против всех штаммов *Cronobacter* от 16,39 ± 0,7 мм до 32,75 ± 2,8 мм.

На основании этих результатов можно сделать вывод, что биологически активные компоненты ЭМО могут проявлять антимикробную активность против нескольких патогенных бактерий. Наибольший диаметр зоны ингибирования наблюдался во всех образцах с ЭМО против штамма *C. muytjensii*. Однако фильтровальная бумага как носитель имеет более высокие зоны ингибирования по сравнению с БЦ, но следует учитывать, что БЦ имеет более высокую механическую прочность по сравнению с растительной целлюлозой[225]. Было отмечено, что целлюлоза типа Iα имеет более прочную структуру, чем целлюлоза Iβ. В бактериальной целлюлозе содержание типа Iα составляет примерно 60%, а в хлопке - 30%. Наилучшей водоудерживающей способностью обладает БЦ - 98%, а растительная целлюлоза - 60% [139].

На основании этого исследования был сделан вывод, что бактериальная целлюлоза, пропитанная эфирным маслом орегано, обладает сильной и умеренной антимикробной активностью в отношении всех представленных штаммов рода *Cronobacter*, выделенных из растительного матрикса. Бактериальная целлюлоза штамма *Komagataeibacter europaeus* GH1 была лучшим носителем эфирного масла орегано, поскольку она обладает лучшей антагонистической активностью по сравнению с бактериальной целлюлозой, полученной из *G. hansenii* ATCC 23769, и прочностью по сравнению с фильтровальной бумагой.

# заключение

В настоящее время в мировой практике внеклеточная бактериальная целлюлоза получила широкое применение в ряде отраслей производства: для создания биофильтров, для иммобилизации микроорганизмов и ферментов; в бумажной и упаковочной промышленностях. В текстильной промышленности бактериальную целлюлозу используют для создания новых тканей, в медицине для производства искусственной кожи, бинтов, имплантатов, сердечных клапанов, контактных хрусталиков и др.; в высокотехничной промышленности для производства новых материалов, нанокомпозитов, в экологии для очистки сточных вод и т.д.

По своим свойствам бактериальная целлюлоза отличается от растительной, так как в своем составе не содержит лигнина, гемицеллюлазы, пектина и восков. Бактериальная целлюлоза имеет высокую способность к абсорбции воды, химическую стабильность, высокую механическую прочность (когда полимер влажный), сохраняет превосходную форму. Кроме этого, бактериальная целлюлоза нетоксичная, является биоразлагаемым полимером, инертным для метаболизма человека.

Фибриллы бактериальной целлюлозы в 100 раз тоньше растительной, создавая высокопористый материал, который позволяет переносить антибиотики или другие медикаменты в рану, при этом оставаясь эффективным физическим барьером против любой внешней инфекции. БЦ не аллергена и легко стерилизуется без изменения свойств. Будучи сходной с человеческой кожей БЦ может использоваться как заменитель кожи при обработке обширных ожогов и нетканых покрытий для хронических ран. По этой причине целлюлоза широко применяется для лечения ран.

В связи с уникальными свойствами и широким спектром применения, исследования, направленные на изучение бактериальной целлюлозы, приобретают особую актуальность.

Однако, в Казахстане данный ценный биотехнологический продукт не производится. Работы с продуцентами БЦ только начаты. Этой темой занимаются КазНУ им аль-Фараби лаборатория прикладной микробиологии и РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК лаборатория экологической биотехнологии.

Таким образом предлагаемая работа позволит восполнить этот пробел и создать основы для технологии производства бактериальной наноцеллюлозы, создать и пополнять коллекцию эффективных продуцентов биоцеллюлозы.

Целью нашего исследования было выделить и изучить бактериальную целлюлозу, продуцирующую уксуснокислыми бактериями.

В результате проведенных исследований нами сделаны следующие выводы:

1. Отобраны три изолята уксуснокислых бактерий, способных продуцировать целлюлозу на питательных средах с углеводами. Идентификация бактерий методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента 16S rRNA показало их принадлежность к роду *Komagataeibacter.*

Определено, что исследуемые культуры представлены грамотрицательными палочками. Колонии округлой формы, сухие по консистенции бежевого и белого цвета. Размеры колоний у культур GH1 и GH2 - 0,5-2 мм, у GV1 – 2-5 мм. Культуры обладают схожими биохимическими свойствами: каталаза положительная, уреаза и оксидаза отрицательная, обладают свойством кислотообразования, индол и сероводород не образуют, не разжижают желатин и не обладают свойством газообразования.

1. Были подобраны условия культивирования штаммов продуцентов биоцеллюлозы по физико-химическим параметрам и определено, что штаммы GH1 и GH2 дают наибольший выход биоцеллюлозы при рН 4,8 и температуре 30°С, а штамм GV1 при рН 5,5 и температуре 27°С. Оптимальной питательной средой для максимального выхода целлюлозы у исследуемых штаммов является среда HS (Hestrin-Shramm). Также выход бактериальной целлюлозы увеличивается при добавлении 1% этилового спирта в питательную среду. Накопление биоцеллюлозы в наибольшем количестве достигается при культивовании микроорганизмов на среде с глюкозой и составило 12,6 г/л у штамма GH1, 10,04 г/л – GH2 и 9,06 г/л – GV1 сухой массы биоцеллюлозы.
2. Биохимический состав и физические свойства биоцеллюлозы показали, что в пленке БЦ, продуцируемой разными штаммами, после ее очистки содержание общего белка составило у GH1 - 0,66%; GH2 – 0,65%; GV1 – 0,64%, содержание жиров было в виде следовых количествах, а степень конверсии целлюлозы в глюкозу было от 45-63%, количество влаги в нативном полимере составила 97-98% для трех штаммов. Разные штаммы вырабатывают биоцеллюлозу различной морфологии сети и толщины волокон. Морфология пленок биоцеллюлозы методом сканирующей электронной микроскопии показала, что образцы состоят из трехмерных пористых сетчатых структур, состоящие из случайно расположенных ленточных ультрадисперсных фибрилл.
3. Исследована способность пленок биоцеллюлозы адсорбировать антимикробные соединения, и в результате работы было выявлено, что пленки БЦ, пропитанные эфирным маслом орегано обладают хорошей удерживающей способностью и составило 50 %. Оценка антимикробных свойств против штаммов рода *Cronobacter* показала, что БЦ продуцируемая *Komogataeibacter sp.* GH1, пропитанная ЭМО, проявляет сильный антимикробный эффект против всех штаммов *Cronobacter* от 16,39 ± 0,7 мм до 32,75 ± 2,8 мм зоны ингибирования.

Оценка полноты решений поставленных задач

Поставленные перед нами задачи решены полностью. За отчетный период выделены культуры микроорганизмов, способные продуцировать биоцеллюлозу. Изучены их морфолого-культуральные и биохимические свойства. Проведена генетическая идентификация по консервативному локусу 16S rRNA. Были подобраны условия культивирования продуцентов биоцеллюлозы, проведен селекционный отбор на основе клонов эффективного штамма и изучен биохимический состав пленок полимера. Исследована способность пленок биоцеллюлозы адсорбировать антимикробные соединения и дана оценка антимикробных свойств.

Оценка технического уровня выполнения работы

Работа выполнена на современном техническом уровне с использованием перспективных штаммов, продуцирующие биоцеллюлозу в соответствии с лучшими мировыми достижениями в данной области.

Рекомендации

Биоцеллюлоза, продуцируемая исследуемыми штаммами микроорганизмов может быть рекомендована для разработки новых конкурентоспособных методов получения биотехнологических препаратов для медицины, пищевой промышленности и др.

**Список использованных источников**

1. Mleziva M.M., Wang J.H. [Polymers for a Sustainable Environment and Green Energy](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444533494002740). [Polymer Science: A Comprehensive Reference](https://www.sciencedirect.com/referencework/9780080878621/polymer-science-a-comprehensive-reference). – Elsevier Science, 2012. – 7760 р.
2. [D. Lavanya](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/D-Lavanya-2083905566?_sg%5B0%5D=0BUxYVTGJJRS0zOBcaIg86mknqj-OxFY1hPTDrhW15005-tSk47-gxkn2imc15IbbbNCsWI.9lAHWqTAT2SU_4SgzosIK_9VKPCmEiStIYgMikzj68j4YRIhJd4SoVHjbMkcGwtqijhuxzEpeQko4RA5V9xxFg&_sg%5B1%5D=k4hHgG61_1MYXvmlG5cekyOmoVh5Z3DiUfLtmU7vlripV4oB67E8X1xMYAp8k2viTlDrUec.8wM5QHtFEbDkWgghoINWGHF7GjB8OoqOwsLGYcvMwEF8hjXlDqMOrFMAWFLL9fk64KgcaBHuWfNL6-3v0_WGSQ) et al. Sources of cellulose and their applications. A review // IJDFR. – 2011. – Vol. 2, № 6. – P. 19-38.
3. [Trache](https://www.frontiersin.org/people/u/756912) D., Tarchoun A.F., Derradji M. Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Applications // Front. Chem. – 2020. – Vol. 8. – 33 p.
4. Klemm D. et al*.* Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material // Angew. Chem.Int.Ed. – 2005. – Vol. 44. – P. 3358–3393.
5. Fernandes S.N., Almeida P.L. et al. Mind the microgap in iridescent cellulose nanocrystal films // Adv Mater. – 2017. – Vol. 29. – P. 1603560.
6. Brown A.J. The chemical action of pure cultivations of *Bacterium aceti* // J Chem Soc Trans. – 1886. – Vol. 49. – P. 172–187.
7. Klemm D., Schumann D., Udhardt U., Marsch S. Bacterial synthesized cellulose ‐ artificial blood vessels for microsurgery // Prog Polym Sci. – 2001. – Vol. 26. – P. 1561–1603.
8. Rahman M.M., Netravali A.N. Aligned bacterial cellulose arrays as “Green” nanofibers for composite materials // ACS Macro Lett. – 2016. – Vol. 5. – P. 1070–1074.
9. [Reis](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/Davi-Teixeira-Reis-2164711454?_sg%5B0%5D=HnYGFSjKtit01rRz5TJm-Fvm6LK_etJkWqgJAnB9TRli2KBK-XThmbHS1Z5R1XV-pMbWvPo.3YA7j74eO8d9krI8roYRdtRWo3ZbL6A2_jcUtJUVgJSb7HM-n-3yOjucGz_vMleAPhR4OHvJod7CBX6fj2bVMQ.yl8ojBzwAzXhuefIArWSdIV5wQgV_3snKRLFG0CQedAuv7tivfShmczLXTtToCtg7LIsIfvCjvgQ8ENaB60PTg&_sg%5B1%5D=X53b7BOsc7Qx-PhspzADac708mXdU01PhJcRVmEylzIe9pZ6a8jxIz3uZcysnzlEplHxpxk.tHPWLhgZO-KAM4rNDo9nYXdBFgvtlOv7rhcich_MLihTL2sBoS0VXQQnM4gBFS9DSL4juwkxm9HrqUyMObAbPQ) D.T., [Gessiel A.P., Scheidt](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/Gessiel-Newton-Scheidt-2164712286?_sg%5B0%5D=HnYGFSjKtit01rRz5TJm-Fvm6LK_etJkWqgJAnB9TRli2KBK-XThmbHS1Z5R1XV-pMbWvPo.3YA7j74eO8d9krI8roYRdtRWo3ZbL6A2_jcUtJUVgJSb7HM-n-3yOjucGz_vMleAPhR4OHvJod7CBX6fj2bVMQ.yl8ojBzwAzXhuefIArWSdIV5wQgV_3snKRLFG0CQedAuv7tivfShmczLXTtToCtg7LIsIfvCjvgQ8ENaB60PTg&_sg%5B1%5D=X53b7BOsc7Qx-PhspzADac708mXdU01PhJcRVmEylzIe9pZ6a8jxIz3uZcysnzlEplHxpxk.tHPWLhgZO-KAM4rNDo9nYXdBFgvtlOv7rhcich_MLihTL2sBoS0VXQQnM4gBFS9DSL4juwkxm9HrqUyMObAbPQ) N.,  [Pereira](https://www.researchgate.net/scientific-contributions/Douglas-Henrique-Pereira-2178086985?_sg%5B0%5D=HnYGFSjKtit01rRz5TJm-Fvm6LK_etJkWqgJAnB9TRli2KBK-XThmbHS1Z5R1XV-pMbWvPo.3YA7j74eO8d9krI8roYRdtRWo3ZbL6A2_jcUtJUVgJSb7HM-n-3yOjucGz_vMleAPhR4OHvJod7CBX6fj2bVMQ.yl8ojBzwAzXhuefIArWSdIV5wQgV_3snKRLFG0CQedAuv7tivfShmczLXTtToCtg7LIsIfvCjvgQ8ENaB60PTg&_sg%5B1%5D=X53b7BOsc7Qx-PhspzADac708mXdU01PhJcRVmEylzIe9pZ6a8jxIz3uZcysnzlEplHxpxk.tHPWLhgZO-KAM4rNDo9nYXdBFgvtlOv7rhcich_MLihTL2sBoS0VXQQnM4gBFS9DSL4juwkxm9HrqUyMObAbPQ) D.H. Plant and Bacterial Cellulose: Production, Chemical Structure, Derivatives and Applications // Orbital - The Electronic Journal of Chemistry. – 2019. – Vol. 11, № 5. – P. 321-329.
10. Nur Binti Kamarudin S. et al. Comparative study of biocellulose from *Acetobacter xylinum* 0416 and commercial hard gelatine capsule // Int. J. Appl. Eng. Res. – 2018. – Vol. 13, № 1. – P. 743-748.
11. Norasila K., Norliza Abd Rahman. Design and Production Control of Biocellulose from *Acetobacter xylinum* // Indian J. Sci. Technol. – 2016. – Vol. 9, № 21. – Р. 1-10.
12. Mühlethaler K. The structure of bacterial cellulose // Biochim. Biophys. Acta, – 1949. – Vol. 3. – P. 527–535.
13. Marsh A.J., O'Sullivan O., Hill C., Ross R.P., Cotter P.D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples // Food Microbiol. – 2014. – Vol. 38. – P. 171–178.
14. Reiniati I., Hrymak A.N., Margaritis, A. Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals // Crit. Rev.Biotechnol. – 2017. – Vol. 37. – P. 510–524.
15. Vitta S., Thiruvengadam V. Multifunctional bacterial cellulose and nanoparticle-embedded composites // Current science. – 2012. – Vol. 102, №10. – P. 1398-1405.
16. Jonas R., Farah L.F. Production and application of microbial cellulose // Polym. Degrad. Stabil. – 1998. – Vol. 59. – P. 101–106.
17. Steinbuchel A. Biopolymers for Medical and Pharmaceutical Applications: Humic Substances, Polyisoprenoids, Polyesters, and Polysacharides / A. Steinbuchel, Robert H. Marchessault. Wiley, 2005. – P. 31-84.
18. Bielecki S., Krystynowicz A., Turkiewicz M., Kalinowska H. Bacterial Cellulose. In: Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry / A. Steinbüchel, S.K. Rhee. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2005. – P. 31–85.
19. Chawla P.R. et al. Fermentative Production of Microbial Cellulose // Food Technol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 47, № 2. – P. 107–124.
20. Thompson N.S., Carlson J.A., Kaustinen H.M., Uhlin K.I. Tunnel structures in *Acetobacter xylinum //* Int. J. Biol. Macromol. – 1988. – Vol. 10. – P. 126–127.
21. Неверова О.А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения: Учебное пособие / О.А. Неверова, Гореликова Г.А., Позняковский В.М. – Новосибирск: Сиб. Унив. Изд-во, 2007. – 16 с.
22. Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown R.M. Microbial cellulose – The natural power to heal wounds // Biomaterials. – 2006. – Vol. 27. – P. 145–151.
23. Yu X., Atalla R.H., Production of cellulose II by *Acetobacter xylinum* in the presence of 2,6-dichlorobenzonitrile // Int. J. Biol. Macromol. – 1996. – Vol. 19. – P. 145–146.
24. Iguchi M., Yamanaka S., Budhiono A. Bacterial cellulose – A masterpiece of nature’s arts // J. Mater. Sci. – 2000. – Vol. 35. – P. 261– 270.
25. Vandamme E.J., De Baets S., Vanbaelen A., Joris K., De Wulf P. Improved production of bacterial cellulose and its application potential // Polym. Degrad. Stabil. – 1998. – Vol. 59. – P. 93– 99.
26. Nishi Y., Uryu M., Yamanaka S., Watanabe K., Kitamura N., Iguchi M., Mitsuhashi S. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose // J. Mater. Sci. – 1990. – Vol. 25. – P. 2997–3001.
27. Jeong S., Lee S.E., Yang H., Jin Y.H., Park C.S., Park Y.S. Toxico-logic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals // Mol Cell Toxicol. – 2010. – Vol. 6, № 4. – P. 370–377.
28. Mishra R.K., Sabu A., Tiwari S.K. Materials chemistry and the futurist eco-friendly applications of nanocellulose: status and prospect // J Saudi Chem Soc. – 2018. – Vol. 22, № 8. – P. 949–978.
29. Habibi Y., Goffin A.L., Schiltz N. Duquesne E., Dubois P., Dufresne A. Bionanocomposites based on poly(ε-caprolactone)-grafted cellulose nanocrystals by ring-opening polymerization // J Mater Chem. – 2008. – Vol. 18, № 41. – 5002 p.
30. Wanichapichart P., Kaewnopparat S., Buaking K., Puthai W. Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xylinum* // J. Sci. Technol. – 2002. – Vol. 24. – P. 855–862.
31. Laszkiewicz B., Solubility of bacterial cellulose and its structural properties // J. Appl. Polym. Sci. – 1998. – Vol. 67. – P. 1871– 1876.
32. Orts W.J., Shey J., Imam S.H., Glenn G.M., Guttman M.E., Revol J.F. Application of cellulose microfibrils in polymer nanocomposites // J. Polym. Environ. – 2005. – Vol. 13. – P. 301–306.
33. Nakagaito A.N., Iwamoto S., Yano H. Bacterial cellulose: The ultimate nano-scalar cellulose morphology for the production of high-strength composites // Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process. – 2005. – Vol. 80. – P. 93–97.
34. George J., Ramana K.V., Sabapathy S.N., Bawa A.S. Physico-mechanical properties of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) cellulose membrane // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 21. – P. 1323–1327.
35. Dubey V., Saxena C., Singh L., Ramana K.V., Chauhan R.S. Pervaporation of binary water-ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane // Sep. Purif. Technol. – 2002. – Vol. 27. – P. 163–171.
36. Shibazaki H., Kuga S., Onabe F., Usuda M. Bacterial cellulose membrane as separation medium // J. Appl. Polym. Sci. – 1993. – Vol. 50. – P. 965–969.
37. Shirai A., Takahashi M., Kaneko H., Nishimura S., Ogawa M., Nishi N., Tokura S. Biosynthesis of a novel polysaccharide by *Acetobacter xylinum* // Int. J. Biol. Macromol. – 1994. – Vol. 16. – P. 297–300.
38. Brown R.M., Haigler C.H., Suttie J., White A.R., Roberts E., Smith C., Itoh T., Cooper K. The biosynthesis and degradation of cellulose // J. Appl. Polym. Sci. – 1983. – Vol. 37. – P. 33–78.
39. Kai A., The structure of the nascent fibril produced by *Acetobacter xylinum*: The lattice spacing of cellulose produced in the presence of a fluorescent brightener // Macromol. Rapid Commun. – 1984. – Vol. 5. – P. 653–655.
40. Cousins S.K., Brown Jr R.M. X-ray diffraction and ultrastructural analyses of dye-altered celluloses support van der Waals forces as the initial step in cellulose crystallization // Polymer. – 1997. – Vol. 38. – P. 897–902.
41. Sakairi N., Asano H., Ogawa M., Nishi N., Tokura S. A method for direct harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of *Acetobacter xylinum* // Carbohydr. Polym. – 1998. – Vol. 35. – P. 233–237.
42. Tokoh C., Takabe K.J., Fujita M. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of plant cell wall polysaccharides // Cellulose. – 2002. – Vol. 9. – P. 65–74.
43. Brown A.J. On an acetic ferment which forms cellulose // J. Chem. Soc. Trans. – 1886. – Vol. 49. – P. 432–439.
44. Shoda M., Sugano Y. Recent advances in bacterial cellulose production. // Biotech Biopro Eng. – 2005. – Vol.10. – P. 1–8.
45. Bellamy W.D. Single cell proteins from cellulosic wastes // Biotechnol. Bioeng. – 1974. – Vol. 6. – P. 869–880.
46. Richmond P.A. Occurrence and Functions of Native Cellulose. Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose / C.H. Haigler, P.J. Weimer (Eds.), Marcel Dekker, Inc. New York, USA, 1991. – P. 5–23.
47. Isizawa S., Araragi M. Chromogenicity of *Actinomycetes*. *Actinomycetes*: The Boundary Microorganisms / T. Arai (Ed.), Toppan Co., Tokyo, Japan, 1976. – P. 43–65.
48. Saichana N., Matsushita K., Adachi O., Frйbort, I., Frebortova J. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications // Biotechnol. Adv. – 2014. – Vol. 33. – P. 1260–1271.
49. Lazarini, S. C. et al. Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone // Cellulose. – 2016. – Vol. 23. – P. 737–748.

Hoenich N. Cellulose for medical applications: past, present, and future // Bioresources. – 2006. – Vol. 1, № 2. – P. 270–280.

1. Yamada Y., Hoshino K., Ishikawa T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus to the generic level // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1997. – Vol. 61. – P.1244–1251.
2. Hestrin S. and Schramm M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose // Biochem. J. – 1954. – Vol. 58. – P.345-352.
3. Colvin J. R. A new look at cellulose biosynthesis in relation to structure and industrial use // Tappi. – 1997. – Vol. 60. – P. 59–62.

Asai T. Taxonomic studies on acetic acid bacteria and allied oxidative bacteria isolated from fruits. A new classification of the oxidative bacteria // J. Agric. Chem. Soc. Japan. – 1935. – Vol. 11. – P. 674–708.

Kersters K., Lisdiyanti P., Komagata K., Swings J. The Family *Acetobacteraceae*: The Genera *Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter*, and *Kozakia* // Prokaryotes. – 2006. – Vol. 5. – P.163-200.

1. Zeng M., Laromaine A., Roig A. Bacterial cellulose films: Influence of bacterial strain and drying route on film properties // Cellulose. – 2014. – Vol. 21, № 6. – P. 4455-4469.
2. Kumagai A., Mizuno M., Kato N., Nozaki K., Togawa E., Yamanaka S., et al. Ultrafine cellulose fibers produced by Asaia bogorensis, an acetic acid bacterium // Biomacromolecules. – 2011. – Vol. 12, № 7. – P. 2815-2821.
3. Lee J. W., Deng F., Yeomans W. G., Allen A. L., GrossьR. A., Kapla D. L. Direct incorporation of glucosamine and N-acetylglucosamine into exopolymers by *Gluconacetobacter xylinus* (=*Acetobacter xylinum*) ATCC 10245: Production of chitosancellulose and chitin-cellulose exopolymers // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Vol. 67, № 9. – P. 3970-3975.
4. Yadav V., Paniliatis B. J., Shi H., Lee K., Cebe P., Kaplan D.L. Novel in vivodegradable cellulose-chitin copolymer from metabolically engineered *Gluconacetobacter xylinus* // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – Vol. 76, № 18. – P. 6257-6265.

Lin S., Calvar I., Catchmark J., Liu J., Demirci A., Cheng K. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose // Cellulose.– 2013. – Vol. 20. – P. 2191-2219.

Voon W.W.Y., Rukayadi Y., Hussin A.S.M. Isolation and identification of biocellulose-producing bacterial strains from Malaysian acidic fruits // Letters in Applied Microbiology. – 2016. – Vol. 62. – P. 428–433.

1. Salman N.A.S., Alias N., Widowati R. Screening and identification of biocellulose producing bacteria from Malaysian local fruits // Bioscience Research. – 2020. – Vol. 17. – P. 179-188.

Tanskul S., Amornthatree K., Jaturonlak N. A new cellulose-producing bacterium, *Rhodococcus sp*. MI 2: Screening and optimization of culture conditions // Carbohydrate Polymers. – 2013. – Vol. 92. – P. 421-428.

Velmurugan P., Myung H., Govarthanan M., Yi Y., Seo S., Cho K.M., Lovanh N., Oh B.T. Production and Characterization of Bacterial Cellulose by *Leifsonia sp*. CBNU-EW3 Isolated from the Earthworm, Eisenia fetida // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2015. – Vol. 20. – P. 410-416.

Tyagi N., Suresh S. Isolation and Characterization of Cellulose Producing Bacterial Strain from Orange Pulp // In Advanced Materials Research. – 2013. – Vol.626. – P. 475–479.

Keshk S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in Gluconacetobacter xylinus // Carbohydr. Polym. – 2014. – Vol. 99. – P. 98-100.

Mikkelsen D., Flanagan B.M., Dykes G.A., Gidley M.J. [Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524](https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x) // J.Appl.Microbiol. – 2009. – Vol. 107. – P. 576.

Dikshit P. K., Kim B. S. Bacterial cellulose production from biodiesel–derived crude glycerol, magnetic functionalization, and its application as carrier for lipase immobilization // Int. J. Biol. Macromol. – 2020. – Vol. 153. – P. 902-911.

Thorat M. N., Dastager S. G. High yield production of cellulose by a *Komagataeibacter rhaeticus* PG2 strain isolated from pomegranate as a new host // RSC Adv. – 2018. – Vol. 8. – P. 29797-29805.

Kim S.Y., Kim J.N., Wee Y.J., Park D.H., Ryu H.W. Production of Bacterial Cellulose by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 Isolated From Persimmon Vinegar // AppliedBiochem. Biotech. – 2006. – Vol.131. – P.705-715.

[Dubey](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813016318335#!) S. From rotten grapes to industrial exploitation: Komagataeibacter europaeus SGP37, a micro-factory for macroscale production of bacterial nanocellulose // [International Journal of Biological Macromolecules](https://www.sciencedirect.com/journal/international-journal-of-biological-macromolecules). – 2017. – Vol. 96. – P. 52-60.

Algar I., Fernandes S. C. M., Mondragon G., Castro C., Gabilondo N., Retegi A., Eceiza A. Pineapple agroindustrial residues for the production of high value bacterial cellulose with different morphologies // Appl.Polym. Sci. – 2014. – Vol.132. – P. 41237.

Suwannarat Y., Ninlanon W., Suwannarat R. Production of Bacterial Cellulose from Acetobacter xylinum by using Rambutan Juice as a Carbon Source // Int. J. Agric. Tech-nol. – 2017. – Vol. 13. – P.1361-1369.

Bae S., Shoda M. Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium // Biotechnol. Prog. – 2004. – Vol. 20. – P. 1366.

Rodrigues A.C., Fontão A.I., Coelho A., Leal M., Soaresda Silva F.A.G., Wan Y. Response surface statistical optimization of bacterial nanocellulose fermentation in static culture using a low-cost medium // Biotechnol. – 2019. – Vol. 49. – P. 19-27.

Ho Jin Y., Lee T., Kim J.R., Choi Y.E., Park C. Improved production of bacterial cellulose from waste glycerol through investigation of inhibitory effects of crude glycerol-derived compounds by Gluconacetobacter xylinus // J.Ind.Eng.Chem. – 2019. – Vol. 75. – P. 158-163

Revin V., Liyaskina E., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin,Brazilian M. Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products // J. Microbiol. – P. 2018. – Vol. 49. – P.151.

Carreira P., Mendes J. A. S., Trovatti E., Serafim L. S., Freire C. S., Silvestre A.J.D., Neto C.P. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose // Bioresour.Technol. – 2011. – Vol.102. – P. 7354-7360.

Guo X., Cavka A., Jönsson L.J., Hong F. Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production // Microb.CellFact. – 2013. – Vol. 12. – P. 93.

Güzel M., Akpınar Ö. Production and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus Peels // Wasteand BiomassValorization. – 2019. – Vol. 10, 2165-2175.

Pacheco G., Nogueira C. R., Meneguin A. B., Trovatti E., Silva M. C.C., Machado R. T. A., Ribeiro S. J. L. Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source // Ind. Crops Prod. – 2017. – Vol. 107. – P. 13-19.

1. Sutherland I.W. Microbial polysaccharides from gram-negativebacteria // International Dairy Journa. – 2001. – Vol. l11, № 9. – P. 663–674.
2. Brown Jr R.M. The biosynthesis of cellulose // Food Hydrocolloids. – 1987. – Vol. 1. – P. 345–351.
3. Delmer D.P., Amor Y. Cellulose biosynthesis // Plant Cell. – 1995. – Vol. 7. 987–1000.
4. Chawla P.R. et al. Fermentative Production of Microbial Cellulose // Food Technol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 47 (2). – P. 107-124.
5. Bielecki S., Krystynowicz A., Turkiewicz M., Kalinowska H. Bacterial Cellulose / A. Steinbüchel, S.K. Rhee. // Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. – Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, 2005. – pp. 31–85.
6. Ross P., Mayer R., Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria // Microbiol. Rev. – 1991. – Vol. 55. – P. 35–58.
7. Tonouchi N., Tsuchida T., Yoshinaga F., Beppu T., Horinouchi S., Characterization of the biosynthetic pathway of cellulose from glucose and fructose in *Acetobacter xylinum* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1996. – Vol. 60. – P. 1377–1379.
8. Singhsa P. Narain R. Manuspiya H. Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions // Cellulose. – 2018. – Vol. 25. – P. 1571–1581.
9. Krasteva P.V., Bernal-Bayard J., Travier L., Martin F.A., Kaminski P.A., Karimova G., Fronzes R., Ghigo J.M. Insights into thestructure and assembly of a bacterial cellulose secretion system // Nat. Commun. – 2017. – Vol. 8. – P. 1-10.
10. Jang W.D., Kim T.Y., Kim H.U., Shim W.Y., Ryu J.Y., Park J.H., Lee S.Y. Genomic and metabolic analysis of *Komagataeibacter xylinus* DSM 2325 producing bacterial cellulose nanofiber // Biotechnol. Bioeng. – 2019. – Vol. 116. – P. 3372–3381.
11. He F., Yang H., Zeng L., Hu H., Hu C. Production and characterization of bacterial cellulose obtained by *Gluconacetobacter xylinus* utilizing the by-products from Baijiu production // Bioprocess Biosyst. Eng. – 2020. – Vol. 43. – P. 927–936.
12. Römling U., Galperin M.Y. Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions // Trends Microbiol. – 2015. – Vol. 23. – P. 545–557.
13. Badshah M., Ullah H., Khan A.R., Khan S., Park J.K., Khan T. Surface modification and evaluation of bacterial cellulose for drug delivery // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – Vol. 113. – P. 526–533.
14. Illa M.P., Sharma Ch.S., Khandelwal1 M. Tuning the physiochemical properties of bacterial cellulose: effect of drying conditions // J Mater Sci. – 2019. – Vol. 54. – P. 12024–12035.
15. Wang J., Tavakoli J., Tang Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with di ff erent culture methods – a review // Carbohydr. Polym. – 2019. – Vol. 219. – P. 63-76.
16. Klemm D., Heublein B., Fink H.P., Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material // Angew. Chemie - Int. Ed. – Vol. 44. – 2005. – P. 3358-3393.
17. Shah N., Ul-Islam M., Khattak W.A., Park J.K. Over view of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material // Carbohydrate Polymers. – 2013. – Vol. 98, № 2. – P. 1585–1598.
18. Wang S., Han Y., Chen J., Zhang D., Shi X., Ye Y., Chen D., Li M. Insights into bacterial cellulose biosynthesis from different carbon sources and the associated biochemical transformation pathways in Komagataeibacter sp. W1 // Polymers. – 2018. – Vol. 10. – P. 963-983.
19. Islam M.U., Ullah M.W., Khan S., Shah N., Park J.K. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose // Int. J. Biol. Macromol. – 2017. – Vol. 102. – P. 1166-1173.
20. Wu S.C., Li M.H. Production of bacterial cellulose membranes in a modified airlift bioreactor by *Gluconacetobacter xylinus* //J. Biosci. Bioeng. – 2015. – Vol. 120. – P. 444-449.
21. Cheng H.P., Wang P.M., Chen J.W., Wu W.T. Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor // Biotechnol. Appl.Biochem. –2002. –Vol. 35. – p. 125.
22. Jozala A.F., Lencastre-Novaes L.C., Lopes A.M., Carvalho Santos-Ebinuma V., Mazzola P.G., Pessoa-Jr A., Grotto D., Gerenutti M., ChaudM.V. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview **//** Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – Vol. 100. – P. 2063-2072.
23. Hutchens S.A. ,  León R.V. ,  O’Neill H.M. ,  EvansB.R. Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production **//** Appl. Microbiol. – 2007. – Vol. 44. – P. 175-180.
24. Dobre T. ,  Stoica A. ,  Parvulescu O.C. ,  Stroescu M. ,  IavorschiG. Factors influence on bacterial cellulose growth in static reactors //Rev. Chim. – 2008. – Vol. 59. – P. 591-594.
25. Zeng X., Small D.P., WanW. Statistical optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 from maple syrup //Carbohydr. Polym. – 2011. – Vol. 85. – P. 506-513.
26. Campano C., Martin A.B., Blanco A., NegroC. Enhancement of the Fermentation Process and Properties of Bacterial Cellulose: A Review// Cellulose. – 2015. – Vol. 23. – P. 57-91.
27. [Arruda Fernandes](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813020340198#!) I. et al. Bacterial cellulose: From production optimization to new applications // [International Journal of Biological Macromolecules](https://www.sciencedirect.com/journal/international-journal-of-biological-macromolecules). – [Vol. 164](https://www.sciencedirect.com/journal/international-journal-of-biological-macromolecules/vol/164/suppl/C). – 2020. – P. 2598-2611.
28. Yim S.M. ,  Song J.E. ,  KimH.R. Production and characterization of bacterial cellulose fabrics by nitrogen sources of tea and carbon sources of sugar //Process Biochem. – 2016. – Vol. 59. – P. 26-36**.**
29. Chawla P., Survase S., Bajaj I. Microbial cellulose: termentative production and applications // Food Technol. Biotechnol. – 2009. – Vol. 47. – P. 107-124.
30. Yang X.Y., Huang C., Guo H.J., Xiong L. Beneficial effect of acetic acid on the xylose utilization and bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* **//** Indian J. Microbiol. – 2014. – Vol. 54. – P. 268-273**.**
31. KeshkS.M.A.S. Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*// Carbohydr. Polym. – 2014. – Vol. 99. – P. 98-100**.**
32. Zywicka A. et al. Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil **//** Carbohydr. Polym. – 2018. – Vol. 199. – P. 294-303.
33. Jozala A.F., Pértile R.A.N. **Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media //** Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 99. – P. 1181-1190.
34. Qi G.X. et al. **Comparison of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* on bagasse acid and enzymatic hydrolysates //** J. Appl. Polym. Sci. – 2017. – Vol. 134. – P. 1-7.
35. Sapunova N.B., Bogatyreva A.O., Liyaskina E.V., RevinV.V. **Production of bacterial cellulose using distillery wastewater //** J. Biotechnol. – 2019. – Vol. 305. – P. S51.
36. Salari M., Sowti Khiabani M. **Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from bacterial cellulose produced in sugar beet molasses and cheese whey media //** Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Vol. 122. – P. 280-288.
37. Abdelraof M., Hasanin M.S., Farag M.M., AhmedH.Y. **Green synthesis of bacterial cellulose/bioactive glass nanocomposites: effect of glass nanoparticles on cellulose yield, biocompatibility and antimicrobial activity //** Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – Vol. 138. – P. 975-985.
38. Ye J. et al. **Bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum ATCC 23767 using tobacco waste extract as culture medium //** Bioresour. Technol. – 2019. – Vol. 274. – P.518-524.
39. Matsuoka M. A synthetic medium for bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum subs. Sucrofermentas // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1996. – Vol. 60. – P. 575-579.
40. Kongruang S. Bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum strains from agricultural waste products // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2008. – Vol. 148. – P. 245-256.
41. Nguyen V.T., Flanagan B., Gidley M.J., Dykes G.A. Characterization of cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha // Curr. Microbiol. – 2008. – Vol. 57. – P. 449–453.
42. Пат. 2415221 Российская Федерацияб МПК [D21H27/12](https://www.freepatent.ru/MPK/D/D21/D21H/D21H27/D21H2712) [D21H17/25](https://www.freepatent.ru/MPK/D/D21/D21H/D21H17/D21H1725) [C12S3/08](https://www.freepatent.ru/MPK/C/C12/C12S/C12S3/C12S308). Cпособ получения электроизоляционной бумаги / Журавлева Н. М., Сажин Б.И., Сминова Е.Г., Хрипунов А.К. Ткаченко Т.В.; заявитель и патентообладатель Учреждение Российской академии наук Институт Высокомолекулярных соединений РАН; заявл. 30.04.10; опубл. 27.03.11.
43. Nogi M., Iwamoto S., Nakagaito A.N., Yano H. Optically Transparent Nanofiber // Paper. Adv. Mater. – 2009. – Vol. 21, № 16. – P. 1595–1598.
44. Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown Jr. R.M. Microbial cellulose – The natural power to heal wounds // Biomaterials. – 2006. – Vol. 27. – P. 145–151.
45. Legge R.L. Microbial cellulose as a specialty chemical // Biotechnol. Adv. – 1990. – Vol. 8. – P. 303–319.
46. Shah J., Brown Jr. R.M. Towards electronic paper displays made from microbial cellulose // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – Vol. 66. – P. 352–355.
47. GeorgeJ., RamanaK.V., SabapathyS.N., JamburH.J., BawaA.S. Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties // Int. J. Biol. Macromol. – 2005. – Vol. 37. – P. 189–194.
48. Czaja W.K., Young D.J., Kawecki M., Brown R.M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications // Biomacromolecules. – 2007. – Vol. 8, №1. – P. 1-12.
49. Esguerra M., Fink H. et al. Intravital fluorescent microscopic evaluation of bacterial cellulose as scaffold for vascular grafts // J. Biomedical Materials. – 2010. – Vol. 93A. – P. 140–149.

Fontana J.D., de Souza AM, Fontana C.K., Torriani I.L., Moreschi J.C., Gallotti B.J., de Souza S.J., Narcisco G.P., Bichara J.A., Farah L.F. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 1990. – Vol. 24. – P. 253–264.

Goissis G., Lacerda C., Barbosa M.P., Pinatti A. Surface tension controll of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix // Revista Brasileira de Engenharia Biomédica. – 1999. – Vol. 15, № 1-2. – P. 55-61.

Gupta A., Kumar R., Upadhyay N.K., Surekha P., Roy P.K. Synthesis, characterization and efficacy of chemically crosslinked pva hydrogels for dermal wound healing in experimental animals // Journal of Applied Polymer Science. – 2009. – Vol. 111, № 3. – P. 1400-1408.

1. Fontes de Sousa Moraes P. R. et al. Bacterial Cellulose/Collagen Hydrogel for Wound Healing // Materials Research. – 2016. – Vol. 19, № 1. – P. 106-116.
2. Wei B., Guang Y., Hong F. Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties // Carbohydrate Polymers. – 2011. – Vol. 5, № 84. – P. 533-538.
3. Громовых Т.И., Садыкова В.С., Луценко С.В., Дмитренок А.С., Фельдман Н.Б., Данильчук Т.Н., Каширин В.В. Бактериальная целлюлоза, синтезируемая *Gluconacetobacter hansenii*, для использования в медицине // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т 53, № 1. – С.69–75.
4. Klemm D., Schumann D., Udhardt U., Marsch S. Васterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery // Prog. Polym.Sci. *–* 2001. – Vol 26. – P. 1561-1603.

Таркова А. Р., Морозов С. В., Ткачева Н. И. и др. Оценка гемостатических свойств нового местного антибиотик-содержащего средства на основе окисленной целлюлозы в эксперименте // Сибирский научный медицинский журнал. – 2016. – Т. 36, № 6. – C. 12-17.

Фан Ми Хань. Биотехнология бактериальной целлюлозы с использованием штамма - продуцента *Gluconacetobacter hansenii* GH - 1/2008: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06 / Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. – Москва, 2013. – 162 с. – Инв. № 61 13-3/521.

1. Парфенов А.И. Энтерология на рубеже ХХ и ХХI веков // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. – 2004. – № 3. – С. 41–44.

Бондаренко В.М., Грачева Н.М. Пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов // Фарматека. – 2003. – № 7. – С. 56–63.

Ардатская М.Д., Минушкин О.Н., Иконников Н.С. Дисбактериоз кишечника: понятие, диагностические подходы и пути коррекции. Возможности и преимущества биохимического исследования кала: пособие для врачей. – М., 2004. – 57 с.

Шептулин А.А. Синдром избыточного роста бактерий и «дисбактериоз кишечника»: их место в современной гастроэнтерологии. // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 1999. – № 3. – С. 51–54.

Schiffrin E., Rochat F. et al. Immunomodulation of blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria // J. Dairy Sci. – 1995. – Vol. 78. – P. 491–497.

Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание: в 3 т. – Москва: Гранть, 2001. – Т. 3. – 287 с.

Пиневич А.В. Чудо – пленки, или Слово о бактериальной целлюлозе // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2007. – № 3. – С. 33-39.

Драчева Л.В. Правильное питание, пищевые и биологически активные добавки // Пишевая промышленность. – 2001. – C. 84-85.

1. Liu X. et al. Soy protein isolate bacterial cellulose composite membranes for high efficiency particulate air filtration // Composites Science and Technology. – 2017. – Vol. 138. – P. 124-133.
2. Amorim J.D.P., Souza K.C., Duarte C.R., Duarte I.S., Ribeiro F.A.S., Silva G.S., Farias P.M.A., Stingl A., Costa A.F.S., Vinhas G.M. Plant and bacterial nanocellulose: Production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review // Environ. Chem. Lett. – 2020. – Vol. 18. – P. 851–869.
3. Galdino C.J.S., Maia A.D.M., Meira H.M., Souza T.C., Amorim J.D.P., Almeida F.C.G., Costa A.F.S., Sarubbo L.A. Use of a bacterial cellulose filter for the removal of oil from wastewater // Process Biochem. – 2020. – Vol. 91. – P. 288–296.
4. Wanichapichart P., Kaewnopparat S., Buaking K., Puthai W. Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xyllinum*. Songklanakarin // J. Sci. Technol. – 2002. – Vol. 24. – P. 855–862.
5. Mautner A., Lee K.Y., Lahtinen P., Hakalahti M., Tammelin T., Li K., Bismarck A. Nanopapers for organic solvent nanofiltration // Chem. Commun. – 2014. – Vol. 50. – P. 5778–5781.
6. Carpenter A.W., Lannoy S.F., Wiesner M.R. Cellulose nanomaterials in water treatment technologies // Environ. Sci. Technol. – 2015. – Vol. 4. – P. 5277–5287.
7. Sai H., Fu R., Xing L., Xiang J., Li Z., Li F., Zhang T. Surface modification of bacterial cellulose aerogels’ web-like skeleton for oil/water separation // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2015. – Vol. 7. – P. 7373–7738.
8. D’Lamare Maia de Medeiros А. Biocellulose for Treatment of Wastewaters Generated by    Energy Consuming Industries: A Review // Energies. – 2021. – Vol. 14. – 19 p.
9. Padaki M., Surya Murali R., Abdullah M.S., Misdan N., Moslehyani A., Kassim M.A., Hilal N., Ismail A.F. Membrane technology enhancement in oil–water separation. A review // Desalination. – 2015. – Vol. 357. – P. 197–207.
10. Amorim J.D.P., Souza K.C., Duarte C.R., Duarte I.S., Ribeiro F.A.S., Silva G.S., Farias P.M.A., Stingl A., Costa A.F.S., Vinhas G.M. Plant and bacterial nanocellulose: Production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review // Environ. Chem. Lett. – 2020. – Vol. 18. – P. 851–869.
11. Hungund B.S., Gupta S.G. Improved production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 // J. Microb. Biochem. Technol. – 2010. – Vol. 2. – P. 127–133.
12. Sai H., Fu R., Xing L., Xiang J., Li Z., Li F., Zhang T. Surface modification of bacterial cellulose aerogels web‐like skeleton for oil/water separation // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2015. – Vol. 7. – P. 7373–7738.
13. Jin X., Xiang Z., Liu Q., Chen Y., Lu F. Polyethyleneimine‐bacterial cellulose bioadsorbent for effective removal of copper and lead ions from aqueous solution // Bioresour. Technol. – 2017. – Vol. 244. – P. 844–849.
14. Wang Q., Asoh T.A., Uyama H. Facile fabrication of flexible bacterial cellulose/silica composite aerogel for oil/water separation // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 2018. – Vol. 91. – P. 1138–1140.
15. Zhijiang C., Ping X., Cong Z., Tingting Z., Jie G., Kongyin Z. Preparation and characterization of a bi‐layered nano‐filtration membrane from a chitosan hydrogel and bacterial cellulose nanofiber for dye removal // Cellulose. – 2018. – Vol. 25. – P. 5123–5137.
16. Urbina L., Guaresti O., Requies J., Gabilondo N., Eceiza A., Corcuera M.A., Retegi A. Design of reusable novel membranes based on bacterial cellulose and chitosan for the filtration of copper in wastewaters // Carbohydr. Polym. – 2018. – 193. – P. 362–372.
17. Zhuang S., Wang J. Removal of U(VI) from aqueous solution using phosphate functionalized bacterial cellulose as efficient adsorbent // Radiochim. Acta. – 2019. – Vol. 107. – P. 459–467.
18. Alves A.A., Silva W.E., Belian M.F., Lins, L.S.G.; Galembeck, A. Bacterial cellulose membranes for environmental water remediation and industrial wastewater treatment // Int. J. Environ. Sci. Technol. – 2020. – Vol. 17. – P. 3997–4008.
19. Lehtonen J., Chen X., Beaumont M., Hassinen J., Orelma H., Dumée L.F., Tardy B.L., Rojas O.J. Impact of incubation conditions and post‐treatment on the properties of bacterial cellulose membranes for pressure‐driven filtration // Carbohydr. Polym. – 2021. – Vol. 251. – P. 17073–117082.
20. Liu F., Chen C., Qian J. Film‐like bacterial cellulose/cyclodextrin oligomer composites with controllable structure for the removal of various persistent organic pollutants from water // J. Hazard. Mater. – 2021. – Vol. 405. – p. 124122.
21. Jahan K., Tyeb S., Kumar N., Verma V. Bacterial cellulose‐polyaniline porous mat for removal of methyl orange and bacterial pathogens from potable water // J. Polym. Environ. – 2020. – Vol. 29. – P. 1257–1270.
22. Galdino C.J.S., Maia A.D.M., Meira H.M., Souza T.C., Amorim J.D.P., Almeida F.C.G., Costa A.F.S., Sarubbo L.A. Use of a bacterial cellulose filter for the removal of oil from wastewater // Process Biochem. – 2020. – Vol. 91. – P. 288–296.
23. Jin X., Xiang Z., Liu Q., Chen Y., Lu F. Polyethyleneimine-bacterial cellulose bioadsorbent for effective removal of copper and lead ions from aqueous solution // Bioresour. Technol. – 2017. – Vol. 244. – P. 844–849.
24. Pacheco G. De Mello C.V., Chiari-Andreo B.G., Isaac V.L.B., Ribeiro S.J.L., Pecoraro E., Trovatti E. Bacterial cellulose skin masks-properties and sensory tests // J Cosmet Dermatol. – 2018. – Vol. 17, № 5. – P. 840–847.
25. Pat. 20130244977A1 US, Int. Cl. A61K 8/73 C12P 19/04 A61K 8/02. Cosmetic bio-cellulose mask pack sheet and method for manufacturing same / Lee CK, Hsu KC, Cho JC, Kim YJ, Han SH.; assignee Amorepacific corporation, Gyeonggi-do (KR). – 13/881,967; PCT Filed 25. 10. 11; pub. 19.09.13. – 5 c.
26. Amorim J.D.P., Galdino C.J.S., Costa A.F.S., Almeida H., Vinhas G.M., Sarubbo L.A. BioMask, a polymer blend for treatment and healing of skin prone to acne // Chem Eng Trans. – 2020. – Vol 79. – P. 205-210.
27. [Perugini](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Perugini+P&cauthor_id=31301106) P., [Bleve](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Bleve+M&cauthor_id=31301106)M.,  [Redondi](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Redondi+R&cauthor_id=31301106)R., [Cortinovis](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Cortinovis+F&cauthor_id=31301106)F., [Colpani](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Colpani+A&cauthor_id=31301106) A.In vivo evaluation of the effectiveness of biocellulose facial masks as active delivery systems to skin // J Cosmet Dermatol. – 2020. – Vol. 19, № 3. P. 725-735.
28. Stasiak-Rozanska L., Ploska J. Study on the use of microbial cellulose as a biocarrier for 1,3-dihydroxy-2-propanone and its potential application in industry // Polymers. – 2018. – Vol. 10, № 438. – 10 p.
29. Phisalaphong M., Chiaoprakobkij N. Applications and products – nata de coco bacterial nanocellulose: a sophisticated multifunctional material // CRC Press. – 2013. – P.143-155.
30. Okiyama A., Motoki M., Yamanaka S. Bacterial cellulose IV. Application to processed foods. Food Hydroco. – 2008. – Vol. 116. – P.503-511.
31. Phan My Hanh, Gromovykh T.I., Byryukov G.S., Danilchuk T.N., Abdrashidova G.G. Express-method to determine bacterial cellulose productivity by *Gluconacetobacter hansenii* GH -1 // Nauka i studia, Nauk Biologic znych Medicyna weterinaria. – 2012. – Vol. 22, № 67. – P.14-22.
32. Silva S.M.F. Filmes compósitos de celulose bacteriana e goma de cajueiro para aplicação em alimentos. Repository from EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. – Brazil, 2019. – 72 p.
33. Duarte E.B., Andrade F.K., Lima H.L.S., Do Nascimento E.S., Carneiro M.J.M., De Fátima B.M., Luz E.P.C.G., Das Chagas B.S., De Freitas R.M. Celulose bacteriana propriedades, Meios Fermenta-tivos e Aplicações. Embrapa Agroindústria Tropical, 2019. – 37 p.
34. Azeredo H.M. Bacterial cellulose for food applications // Int J Adv Med Biotechnol. – 2018. – Vol. 1, № 2. – p. 2.
35. Nascimento D.M. Comparação ambiental e tecnológica de nanoestruturas de celulose obtidas da fibra de coco. Repository from EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Federal University of Ceará, Brazil, 2018. – 95 p.
36. Ferreira A.R.V., Alves V.D., Coelhoso I.M. Polysaccharide based membranes in food packaging applications // Membranes. – 2016. – Vol. 6, № 22.
37. Azeredo H.M.C., Rosa M., Mattoso L. Nanocellulose in bio-based food packaging applications // Ind. Crops Prod. – 2017. – Vol. 97. – P. 664–671.
38. Alireza D., Ramin K., Hedayat H., Saeedeh S., Kiandokht G. Physical, antioxidant and antimicrobial characteristics of carboxymethyl cellulose edible film cooperated with clove essential oil. Zahedan // J. Res. Med. Sci. – 2014, - Vol. 16. – P. 34–42.
39. Kapetanakou A., Karyotis D., Skandamis P.N. Control of listeria monocytogenes by applying ethanol-based antimicrobial edible films on ham slices and microwave-reheated frankfurters // Food Microbiol. – 2016. – Vol. 54. – P. 80–90.
40. Atarés L., Chiralt A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging // Trends Food Sci. Technol. – 2016. – Vol. 48. – P. 51–62.
41. Vanti G., Ntallis S.G., Panagiotidis C.A., Dourdouni V., Patsoura C., Bergonzi M.C., Lazari D., Bilia A.R. Glycerosome of Melissa officinalis L. essential oil for effective anti-HSV Type 1 // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 14. – p. 3111.
42. Marutescu L., Trusca R. et al. Multifunctional Hydroxyapatite coated with *Arthemisia absinthium* composites // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – p. 413.
43. Barberis A., Deiana M., Spissu Y., Azara E., Fadda A., Serra P.A., D’Hallewin G., Pisano M., Serreli G., Orrù G. et al. Antioxidant, antimicrobial, and other biological properties of Pompia juice // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – p. 3186.
44. Cattelan M.G., De Castilhos M.B.M., Sales P.J.P., Hoffmann F.L. Antibacterial activity of oregano essential oil against foodborne pathogens // Nutr. Food Sci. – 2013. – Vol. 43. – P. 169–174.
45. Fournomiti M., Kimbaris A., Mantzourani I., Plessas S., Theodoridou I., Papaemmanouil V., Kapsiotis I., Panopoulou M., Stavropoulou E., Bezirtzoglou E.E. et al. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia* *officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae* // Microb. Ecol. Health Dis. – 2015. – Vol. 26. – p. 883.
46. Preuss H.G., Echard B., Enig M., Brook I., Elliott T.B. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria // Mol. Cell. Biochem. – 2005. – Vol. 272. – P. 29–34.
47. Castilho P.C. Savluchinske-Feio S., Weinhold T.S., Gouveia-Figueira S.C. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal // Food Control. – 2012. – 23. – P. 552–558.
48. Huang Y., Pang Y., Wang H., Tang Z., Zhou Y., Zhang W., Li X., Tan D., Li J., Lin Y. et al. Occurrence and Characterization of *Cronobacter spp*. in Dehydrated Rice Powder from Chinese Supermarket // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10. – 11 p.
49. Alsonosi A., Hariri S., Kajsík M., Orieskova M., Hanulik V., Röderová M., Petrželová J., Kollárová H., Drahovská H., Forsythe S.J. et al. The speciation and genotyping of Cronobacter isolates from hospitalised patients // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 34. – P. 1979–1988.
50. Mullane N.R., Iversen C., Healy B., Walsh C., Whyte P., Wall P.G., Quinn T., Fanning S. *Enterobacter sakazakii* an emerging bacterial pathogen with implications for infant health // Minerva Pediatr. – 2007. – Vol. 59. – P. 137–148.
51. Healy B., Cooney S., O’Brien S., Iversen C., Whyte P., Nally J., Callanan J.J., Fanning S. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): An opportunistic foodborne pathogen // Foodborne Pathog. Dis. – 2010. – Vol. 7. – P. 339–350.
52. Forsythe S. Updates on the *Cronobacter* Genus // Annu. Rev. Food Sci. Technol. – 2018. – Vol. 9. – P. 23–44.
53. Iversen C., Mullane N., Mc Cardell B., Tall B.D., Lehner A., Fanning S., Stephan R., Joosten H. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter* *sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* *sp*. nov., *Cronobacter turicensis sp*. nov., *Cronobacter muytjensii sp*. nov., *Cronobacter dublinensis sp*. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. dublinensis subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. lausannensis subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. lactaridi subsp. Nov // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. –2008. – Vol. 58. – P. 1442–1447.
54. Stoop B., Lehner A., Iversen C., Fanning S., Stephan R. Development and evaluation of rpoB based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter* // Int. J. Food Microbiol. – 2009. – 136. – P. 165–168.
55. Don. J. Brenner. Bergey,s Manual of Systematic Bacteriology – second edition, – Vol. 2, - Part C. – The Alpha-, Beta-. Delta-, and *Epsilonproteobacteria*/Noel R.Krieg, James T. Staley / Springer, 2005. – P. 41-96.
56. Jayabalan Rasu, Malbaša Radomir V., Lončar Eva S., Vitas Jasmina S.,Sathishkumar Muthuswamy. [A Review on Kombucha Tea - Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus](https://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12073)  // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.  – 2014. – Vol. 13. –  P. 538-550.
57. Практикум по микробиологии / под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Московского университета, 1976. – 307 с.
58. Wu S.C., Lia Y.K. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization // J Mol Catal B Enzym. – 2008. – Vol. 54. – P. 103-108.
59. Wei B., Guang Y., Hong F. Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties // Carbohydrate Polymers. – 2011. – Vol. 5, № 84. – P. 533-538.
60. Jahan F., Kumar V., Saxena R.K. Distillery effluent as a potential medium for bacterial cellulose production: A biopolymer of great commercial importance // Bioresource Technology. – 2018. – Vol. 250. – P. 922-926.
61. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyu binding // Analytical Biochemistry. – 1976, - Vol. 72. – P. 248.
62. ГОСТ 5668-68 Хлеб и хлебобулочные изделия. Методы определения массовой доли жира.
63. [James Kong-Win Chang](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kong-Win%20Chang%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=29740574) et al. Two-Step Thermochemical Cellulose Hydrolysis with Partial Neutralization for Glucose Production // Frontiers in Chemistry. – 2018. – Vol. 6. – P. 1-11.
64. Treesuppharata W., Rojanapanthu, P., Siangsanohb C., Manuspiyac H., Ummartyotin S. Synthesis and characterization of bacterial cellulose and gelatin-based hydrogel composites for drug-delivery systems // Biotechnol. Rep. – 2017. – Vol. 15. – P. 84–91.
65. Schrecker S.T., Gostomski P.A. Determining the water holding capacity of microbial cellulose // Biotechnol Letters. – 2005. – 27. – P. 1435-1438.
66. Türkoglu N.L. Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing // Int. J. Biol. Macromol. – 2014. – 67. – P. 22–27.
67. Martin Dworkin et al. The Prokaryotes – A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses // Springer, 2006, 3rd, - Vol. 5, - p. 163 – 201.
68. Son H.J., Kim H.G., Kim K.K., Kim H.S., Kim Y.Q., Lee S.J. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter sp*. V6 in synthetic media under shaking culture conditions // Bioresource Technol. – 2003. – Vol. 86. – P. 215-219.
69. Islam M., Khan T., Pakk J.K. Water holding release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex sity modification // Carbohydrate polymers. – 2012. – Vol. 88, № 2. – P. 596-603.
70. Molina-Ramírez C., Enciso C., Torres-Taborda M., Zuluaga R., Gañán P., Rojas O.J., Castro C. Effects of alternative energy sources on bacterial cellulose 213 characteristics produced by *Komagataeibacter medellinensis* // Carbohydr. – 2018. – Vol.53. – P.98-103.
71. Park J.K., Hyun S., Jung J. Conversion of G. hansenii PJK into non-cellulose-producing mutants according to the culture condition // J.Biotechnol Bioprocess Eng. – 2004. – Vol. 9. – P. 383-388.
72. Zhong C., Zhang G.C., Liu M., Zheng X.T., Han P.P., Jia S.R. Metabolic flux analyses of *Gluconacetobacter xylinus* for bacterial cellulose production // Appl Microbiol Biotechnol. – 2013. – Vol. 97, № 1. – P.378-381.
73. [Naritomi](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0922338X98800123#!) T. et al. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture // J. of Fermentation and Bioengineering. – 1998. – Vol. 85. – P. 598-603.
74. Chawa P.R. et al. Fermentative production of Microbial Cellulose // Food Technol. Biotechnol. – 2009, - Vol. 47, № 2. – P. 107-24.
75. Toda K. Cellulose production by acetic acid-resistant *Acetobacter xylinum* // J. Ferment. Bioeng. – 1997. –Vol. 84. – P. 228-231.
76. Rebelo A.R., Archer A.J., Chen X., Liu C., Yang G. Lin Y. Dehydratation of bacterial cellulose and the water content effects on viscoelastic and electrochemical properties // Sci Thechnol Adx Mater. – 2018. – Vol. 19, № 1. – P. 203-211.
77. Schrecker S.T., Gostomski P.A. Determining the water holding capacity of microbial cellulose // Biotechnol Letters. – 2005. – Vol. 27. – P. 1435-1438.
78. Mohamed F. Synthesis of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum sp.* using watermelon rind waste for biocomposite application. Thesis, University Malaysia Pahang. – Pahang, 2010. – 26 p.
79. Huang Y., Pang Y., Wang H. et al. Occurrence and Characterization of *Cronobacter spp*. in Dehydrated Rice Powder from Chinese Supermarket // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10. – P. e0131053.
80. Alsonosi A. et al. The speciation and genotyping of *Cronobacter* isolates from hospitalised patients // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 34. – P. 1979–1988.
81. Mullane N.R. et al. *Enterobacter sakazakii* an emerging bacterial pathogen with implications for infant health // Minerva Pediatr. – 2007. – Vol. 59. – P. 137–148.
82. Healy B. et al. *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*): An opportunistic foodborne pathogen // Foodborne Pathog. Dis. – 2010. – Vol. 7. – P. 339–350.
83. Forsythe S. Updates on the *Cronobacter* Genus // Annu. Rev. Food Sci. Technol. – 2018. – Vol. 9. – P. 23–44.

**ПРИЛОЖЕНИЕ А**

**Патент на полезную модель**

