

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой
_____ Т.Г. Волова
Подпись, инициалы фамилия
« ____ » ____ 2023г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Биосинтез и исследование бактериальной наноцеллюлозы в качестве
носителя для ферментных препаратов**

тема

06.04.01 Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель _____ к.т.н, доцент Е.Г. Киселёв

Выпускник _____ А.В. Мякишева

Рецензент _____ к.т.н, доцент Н.Ю. Демиденко

Красноярск 2023

РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Биосинтез и исследование бактериальной наноцеллюлозы в качестве носителя для ферментных препаратов» содержит 74 страницы текстового документа, 31 иллюстрацию, 1 таблицу и 59 использованных источников.

Ключевые слова: БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЦЕЛЛЮЛОЗА, КОМПОЗИТЫ, АЛЬГИНАТ-НАТРИЯ, ФЕРМЕНТ, ЛИПАЗА, ИММОБИЛИЗАЦИЯ.

Цель работы – получить и исследовать композитные образцы из бактериальной наноцеллюлозы и полисахарида альгината-натрия для иммобилизации липазы.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Биосинтезировать бактериальную целлюлозу;
- Изготовить композитные образцы из БЦ, полученной разными способами высушивания, и альгината-натрия;
- Исследовать физико-химические свойства полученных композитных образцов такие, как влагоемкость и сорбция;
- Провести иммобилизацию модельного фермента (липаза) на композитный материал;
- Оценить активность иммобилизованного фермента в зависимости от pH среды и времени;
- Определить параметры константы Михаэлиса-Ментена, а также скорости утилизации субстрата.

Проблема, на решение которой направлена работа – это изучение и исследование свойств БЦ как нового и перспективного биоматериала, а также его усовершенствование для создания биосовместных покрытий.

Актуальность изучаемой темы обусловлена тем, что в настоящее время все больший интерес склоняется к применению в медицине и косметологии природных материалов. Развивающийся прогресс идет к тому, что спустя несколько лет используемые бинты и марлевые повязки уйдут из широкого пользования, и именно их место сможет занять природных биополимер бактериального происхождения – бактериальная целлюлоза.

Новый материал превосходит уже известные тем, что отвечает такому требованию, как биосовместимость, который является неотъемлемой частью современных биотехнологий. С помощью нового материала можно ускорить процесс восстановления ран путем добавления биоактивных веществ, тем самым улучшив качество жизни многих людей.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1 Биосинтез бактериальной целлюлозы	11
1.1.1 Продуценты бактериальной целлюлозы	11
1.1.2 Условия культивирования.....	13
1.1.3 Состав питательной среды и ее влияние на свойства бактериальной целлюлозы	16
1.2 Свойства бактериальной целлюлозы	18
1.2.1 Строение и структура	18
1.2.2 Физико-химические и механические свойства.....	21
1.3 Гидролитические ферменты и их значение.....	24
1.3.1 Трипсин и пепсин	24
1.3.2 Липаза.....	25
1.3.3 Лизоцим	26
1.4 Способы иммобилизации ферментов на носитель	27
1.4.1 Бактериальная целлюлоза	28
1.4.2 Хитозан	29
1.4.3 Альгинат-натрия	30
1.5 Методы модификации бактериальной целлюлозы полисахаридами	31
1.5.1 Модификация альгинатом-натрия.....	31
1.5.2 Модификация пектином.....	32
1.5.3 Модификация желатином	32
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	34

2.1	Объекты.....	34
2.2	Методика исследования	34
2.2.1	Биосинтез БЦ и ее модификация с помощью сушки	34
2.2.2	Получение композитов БЦ с альгинатом	34
2.2.3	Изучение свойств БЦ и композитов с альгинатом.....	35
2.2.3.1	Влагоемкость образцов	35
2.2.3.2	СЭМ-микроскопия.....	35
2.2.3.3	Адсорбционные характеристики.....	36
2.2.4	Иммобилизация липазы	36
2.2.4.1	Иммобилизация на БЦ.....	36
2.2.4.2	Иммобилизация липазы на композиты.....	37
2.2.5	Изучение свойств липазы на носителях	37
2.2.5.1	Определение содержания липазы на БЦ и композитах	37
2.2.5.2	Активность липазы	38
2.2.5.3	Определение зависимости активности фермента от рН среды.....	38
2.2.5.4	Определение зависимости активности фермента от времени.....	38
2.2.5.5	Десорбционные характеристики	39
2.2.6	Кинетика ферментативной реакции.....	39
2.2.8	Статистическая обработка данных	40
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ.....	41
3.1	Получение бактериальной целлюлозы	41
3.2	Полученные образцы БЦ и композиты с альгинатом	42
3.3	Влагоемкость образцов.....	44
3.3	СЭМ-микроскопия	46
3.3	Сорбционные характеристики	47

3.3.1 Сорбция альбумина	47
3.3.2 Сорбция метиленового оранжевого	48
3.4 Иммуобилизация липазы.....	50
3.5 Свойства иммобилизованного фермента.....	52
3.5.1 Количество впитавшейся липазы	52
3.5.2 Активность липазы	53
3.5.3 Влияние рН на активность липазы.....	54
3.5.4 Десорбционные характеристики	56
3.5.5 Зависимость активности от времени	57
3.6 Кинетика ферментативной реакции	58
3.6.1 Утилизация субстрата.....	58
3.6.2 Константа Михаэлиса-Ментена.....	60
ВЫВОДЫ.....	64
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	66
СПИСОК ИСТОЧНИКОВ.....	67

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальная целлюлоза – полисахарид, который образован с помощью звеньев β -D-глюкопиранозы, связанными β -(1→4) гликозидными связями. Полисахарид можно обнаружить при культивировании бактерий рода *Comagataeibacter*, целлюлоза будет выделяться микроорганизмами на поверхность среды в форме желе. На сегодняшний день известно, что биополимер является нетоксичным материалом, обладающим необходимыми сорбирующими свойствами, что способствует его широкому применению в разных сферах [1].

В настоящее время все чаще используется бактериальная целлюлоза для восстановления кожи человека в качестве косметических масок. Как и в других отраслях, в косметологии и медицине применяются современные экологические подходы к созданию материалов. Известно, что в большинство косметических масок и различных повязок входят отходы нефтепродуктов, это приводит к снижению высвобождения нагруженных средств и образованию микрозагрязнений. В свою очередь бактериальная целлюлоза является биоразлагаемой, это решает множество проблем ее утилизации после использования [2].

Биополимер бактериального происхождения отличается от других полимеров физико-механическими свойствами. Бактериальная целлюлоза способна удерживать влагу в количестве 309 г воды на грамм сухого веса материала. Она обладает устойчивостью к высоким температурам – до 150°C, также до 275°C при химической обработке. Это дает возможность использовать разные виды сушки с сохранением свойств целлюлозы [3]. Еще одна важная характеристика биополимера заключается в том, что его можно использовать как сорбент.

В одном исследовании было продемонстрировано, что БЦ можно нагружать лекарственными компонентами, которые будут постепенно высвобождаться, при этом, не теряя своих свойств. Целлюлоза обладает

уникальной пористостью, которая повышает показатель влагопоглощения с течением времени [4]. Таким образом, БЦ может быть использована в качестве матрикса для веществ разной природы. К примеру, на целлюлозу в виде пленок можно иммобилизовать ферменты. С помощью физической адсорбции фермент равномерно распределяется по поверхности, не теряя своей протеолитической активности. Это открывает возможность широкого применения БЦ в биотехнологии, медицине, а также в косметологии [5].

Свойства БЦ можно также улучшить с помощью создания биосовместных матриксов с полисахаридами. Полисахарид с БЦ дает возможность создания нетоксичных, биodeградируемых матриксов. Известно, что БЦ обладает рядом полезных характеристик, однако не всегда их может быть достаточно для конструирования узко специализированных материалов. Поэтому существуют технологии, которые способны повысить качество и свойства биополимера. В качестве полисахаридов могут использоваться альгинат, пектин, желатин.

Альгинат – анионный полисахарид, выделенный из клеточной стенки бурых водорослей. Представлен сополимером β -d-маннуриновой и β -1-гулуриновой кислот. С помощью альгината можно улучшить эластичность материала, полисахарид придает БЦ устойчивость на разрыв, что очень важно для создания биомедицинских и косметических материалов. Также альгинат улучшает сорбционные качества биополимера, повышая площадь поверхности [6], [7].

В части исследований для модификации БЦ используют такой полисахарид, как пектин. Пектин представляет собой группу сложных полисахаридов, содержащийся в клеточной стенке, имеет в своем составе большое количество галактуроновых кислот [8].

Пектин в составе композитов с БЦ придает материалу большую прочность за счет пластифицирующего действия. Биополимер в виде пленок обладал улучшенными физическими свойствами такие, как жесткость, водостойкость [9].

Еще один из методов улучшения БЦ – это создание композитов с

желатином. Желатин является подходящим белком для целей создания биополимерных материалов ввиду своих свойств. Он обладает устойчивостью, нетоксичностью, биосовместимостью и низкой стоимостью, в сравнении с другими белками [10]. Композиты БЦ/желатин представляют в настоящее время особый интерес, так как желатин положительно влияет на структуру полимера. Созданные материалы можно нагружать лекарствами или ферментами для придания композитам таких свойств, как антибактериальность и антиоксидантная активность [11].

Кроме пленочных композитов из БЦ можно поучить конструкции разной объемной формы. В одном из исследований удалось получить подобную 3D-модель. Она отличается высокой пористостью и взаимосвязанной структурой, что повышает сорбционную активность БЦ. Трехмерная структура дает возможность большому количеству вещества адгезироваться на поверхности [12].

Также существуют методы создания сфероидов из БЦ, отличительной чертой которых является их строение. Они обладают большей поверхностью и могут быть модифицированы с помощью флуоресцентных бактерий. Это открывает новые большие возможности в проектировании 3D-модель из биополимера, которые будут обладать привлекательными свойствами для многих отраслей [13].

Таким образом, БЦ – материал нового поколения, который обладает улучшенными показателями биосовместимости, биodeградации и подходящей сорбируемостью. Также биополимер может быть улучшен или модернизирован с помощью современных технологий.

Цель работы – получить и исследовать композитные образцы из бактериальной наноцеллюлозы и полисахарида альгината-натрия для иммобилизации липазы.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Биосинтезировать бактериальную целлюлозу;

- Изготовить композитные образцы из БЦ, полученной разными способами высушивания, и альгината-натрия;
- Исследовать физико-химические свойства полученных композитных образцов такие, как влагоемкость и сорбция;
- Провести иммобилизацию модельного фермента (липаза) на композитный материал;
- Оценить активность иммобилизованного фермента в зависимости от рН среды и времени;
- Определить параметры константы Михаэлиса-Ментена, а также скорости утилизации субстрата.

Работа была выполнена на базе лаборатории новых биоматериалов Сибирского федерального университета.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Биосинтез бактериальной целлюлозы

1.1.1 Продуценты бактериальной целлюлозы

Бактериальная целлюлоза – полукристаллический полимер, состоящий из кристаллических (регулярных) и аморфных (нерегулярных) микрофибрилл. Важной характеристикой, влияющей на свойства БЦ, является выбор микроорганизма как штамма-продуцента. Ими могут быть грамотрицательные представители (*Acetobacter azotobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes*) и грамположительные (*Sarcina ventriculi*). Однако отличаются большей производительностью БЦ такие штаммы микроорганизмов, как *K. xylinus*, *K. hansenii*, *K. pasteurianus*, *K. sucrofermentans* рода *Komagataeibacter* [14].

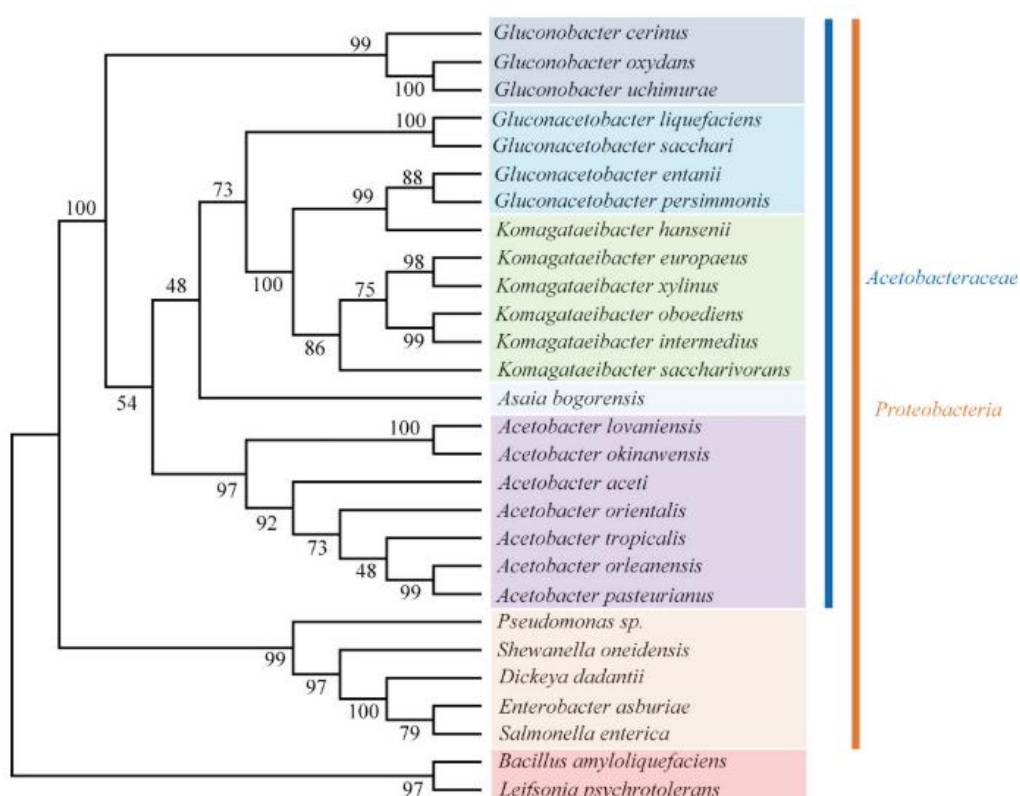


Рисунок 1 – виды бактерий, синтезирующие БЦ

Бактерии разных родов производят отличающиеся друг от друга волокна

с разными характеристиками, от чего в дальнейшем будут отличаться свойства БЦ. Полимер может обладать различной морфологией, формой, размером, а также поверхностью, это на прямую влияет на область применения материала. Помимо различных видов бактерий существуют пути продуцирования БЦ бесклеточными системами с помощью ферментов [15].

В настоящее время большинство исследований включает в себя получение БЦ из вида *K. Xylinus*, ранее известный как *Acetobacter xylinum* или *Glucanacetobacter xylinus*. Данный вид распространен повсеместно, его можно выделить из сока цитрусовых фруктов, яблочного уксуса, сливы и винограда. Для штамма характерным температурным оптимумом является 33°C и pH 6,5, выход при таких условиях составляет на стандартной питательной среде от 0,035 г/л до 0,04 г/л. В исследовании (Julia Fernández, 2020) было продемонстрировано, что культура *K. Xylinus*, выращенная на винном уксусе, показала высокий выход продукта. БЦ отличалась от эталона более высокой кристалличностью и морфологией поверхности [16], [17].

K. Xylinus – строго аэробные бактерии, грамотрицательные, палочковидной формы, трансформирующие глюкозу в целлюлозы в ходе своей жизнедеятельности. Также рассматриваемый штамм способен к окислению этанола до уксусной кислоты, после чего происходит ее превращение в глюкозу, а затем в глюконовую кислоту [18].

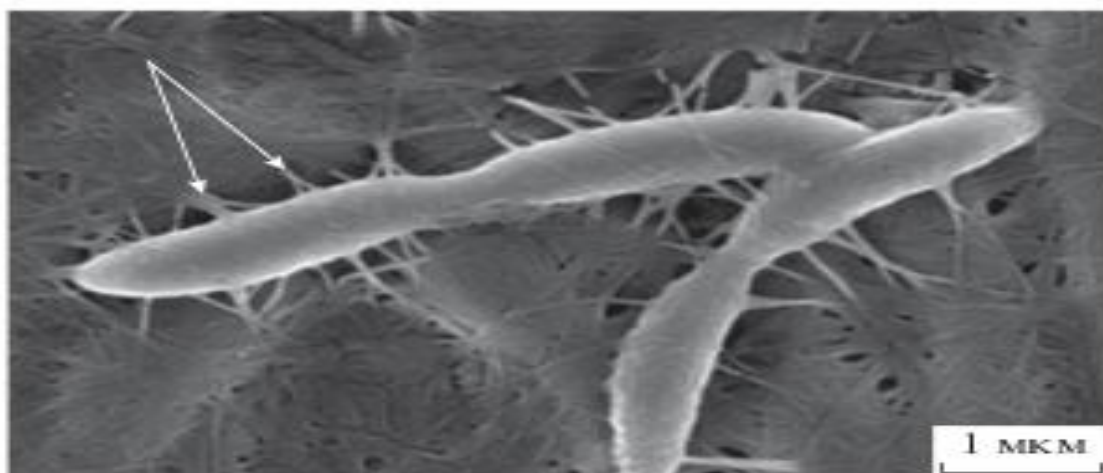


Рисунок 2 – бактерии рода *K. Xylinus*

Для синтеза БЦ могут быть использованы также такие штаммы бактерий, как *Escherichia coli* и *Salmonella sp.*, однако приведенные микроорганизмы являются патогенными. Также они, в отличие от *K. Xylinus*, отличаются меньшей производительностью. *E. Coli* может быть модифицирована введением гена от *K. Xylinus* для целей увеличения выхода продукта, однако эта технология пока не нашла широкого применения [19]. Еще одним патогенным штаммом, который способен накапливать БЦ в ходе жизнедеятельности – это анаэробный грамположительный микроорганизм *Sarcina ventriculi*, однако в роли постоянного продуцента БЦ он также используется крайне редко [20].

На сегодняшний день наиболее продуктивным штаммом остается *K. Xylinus*. Однако еще одним новым видом бактерий, синтезирующий БЦ, является *Komagataeibacter rhaeticus*, который находит все более широкое применение в культивировании. Данный штамм получают из чайного гриба с зеленым чаем в статистических условиях, также существуют методы генетического изменения этого вида для получения целлюлозы с новыми свойствами. Полученный полимер был исследован в работе (J. Caro-Astorga, 2021) в целях получения из него 3D-моделей [13].

Существует несколько версий о необходимости БЦ в жизнедеятельности бактерий. Первая – клетки бактерий, которые синтезируют полимер, иммобилизованы в сплошной сетке, что способствует поддержанию доступа кислорода во внутрь организма. Вторая – частицы, попадающие в бактерию, адсорбируются на полимере, это дает возможность легче их поглотить [21]. Также есть исследования, которые подтверждают, что БЦ способна защищать микроорганизмы от УФ-излучения, отражая его [22].

1.1.2 Условия культивирования

От условий культивирования зависят дальнейшие свойства БЦ, именно подбор условий является важным этапом в биосинтезе полимера. Существует

два основных варианта получения целлюлозы – это стационарное и глубинное культивирование. С помощью стационарного метода получают пленки целлюлозы, однако этот способ отличается высокой стоимостью. Продуценты, способные к накоплению целлюлозы в стационарных условиях, могут переходить в мутантные формы, это приводит к образованию глобул вместо пленок.

При глубинном культивировании БЦ образуется в виде сфер разного диаметра. Такой вид наиболее подходит для применения в промышленных масштабах, так как для него могут использоваться автоматизированные ферментеры, что исключает человеческий фактор. Это главное отличие от стационарного метода. Целлюлоза, полученная при глубинном культивировании, отличается низкой степенью полимеризации и кристалличности. Также у такой целлюлозы низкий модуль Юнга и более высокое влагопоглощение, чем у стационарной БЦ [3].

При культивировании БЦ уделяется большое внимание условиям среды таким, как значение рН, температуры, концентрации кислорода и скорости перемешивания. Без соблюдения заданных условий культура бактерий существовать не будет.

Значение рН всегда находится в пределах 4,0 – 7,0, в зависимости от штамма микроорганизма. Для бактерий вида *K. Xylinus* преимущественно значение рН равно 4,7. рН необходимо поддерживать для нормального роста бактерий и накопления полимера так, как в процессе их культивирования образуется глюконовая кислота, способна закислить среду [23].

Strain	Carbon source	Nitrogen source	Additives	T (°C)	pH	Time (days)	Yield (g/l)	Ref
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 53524	sucrose	Peptone yeast extract	-	30	5		3.83	(Mikkelsen et al., 2009)
<i>Gluconacetobacter hansenii</i> UAC 09	sucrose	-	grape skin	-	-	14	7.47	(Rani et al., 2011)
<i>G. xylinus</i> ATCC 10245	molasses	corn syrup	-	30		6	4.70	(El-Saied et al., 2008)
<i>G. hansenii</i> PJK KCTC 10505BP	glucose	beer fermentation broth	-	30	5	14	13.95	(Ha et al., 2008)
<i>Gluconacetobacter</i> sp.4B-2	sucrose	Peptone yeast extract	-	30	6–7	8	11.98	(Pourramezan et al., 2009)
<i>G. xylinus</i> ATCC 23770	wheat straw hydrolysate	Peptone yeast extract	-	30	5	11	15.40	(Hong et al., 2011)
<i>Acetobacter Xylinum</i> ATCC 23769	glucose	Peptone yeast extract	oligosaccharides	30	3.5	15	15.28	(Ha & Park, 2012)
<i>G. xylinus</i> BCRC 12334	glucose	Peptone yeast extract	lees	30	6	7	10.38	(Wu & Liu, 2012)
<i>G. xylinus</i> ATCC 23770	cotton cloth hydrolysate	Peptone yeast extract	-	30	-	7–14	10.80	(Hong et al., 2012)
<i>Gluconacetobacter Xylinus</i> ATCC 23770	fiber hydrolysate	Peptone yeast extract	-	30	5	7	11.00	(Cavka et al., 2013)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 13693	glucose	Peptone yeast extract	lignin sulfonate	28	6	7	16.32	(Keshk & Sameshima, 2006a)

Рисунок 3 – параметры культивирования бактерий

На рост бактерий также влияет температурные параметры окружающей среды. Культивирование в среднем длится 14 суток с постоянной температурой в $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ в условиях перемешивания. Перемешивание производится для постоянной аэрации среды при 150 об/мин. Содержание кислорода в среде может варьироваться в пределах от 2,5 мг/л до 15 мг/л. Кислород крайне важен в начальной стадии культивирования, в последствии его высокая концентрация может привести к повышению содержания глюконовой кислоты [24], [25].

Полученная БЦ в статистических условиях имеет желтый цвет и подлежит очистки горячей водой и гидроксидом натрия для достижения нейтрального рН. В статистически условиях полимер образуется на границе раздела двух фаз воздух-жидкость, вследствие чего захватывается углекислый газ в процессе метаболизма бактерий. Толщина целлюлозы увеличивается с течением времени культивирования. Этот методом является часто используемым в лабораторных условиях. Однако высокая стоимость и низкая производительность – главные проблемы приведенного метода, поэтому существует метод с перемешиванием.

При глубинном культивировании перемешивание играет главную роль в

снабжении кислородом культуру бактерий, что увеличивает накопление БЦ, но несмотря на это в данном методе есть высокая вероятность возникновения мутантных бактерий. Выбор условий культивирования влияет главным образом не на количество целлюлозы, а на размер ее частиц от 10 мкм до 10 мм и на их форму [26].

1.1.3 Состав питательной среды и ее влияние на свойства бактериальной целлюлозы

Состав питательной среды является важным фактором для культивирования бактерий. От этого в дальнейшем будет зависеть качество БЦ на выходе – ее молекулярная масса и микроструктура. Необходимо поддерживать постоянную концентрацию углерода и азота: больше углерода и меньше азота [16].

В качестве источника углерода отдается предпочтение глюкозе или фруктозе, которые входят в состав питательной среды NS. Помимо глюкозы туда входят пептон, экстракт дрожжей, фосфорнокислый натрий, лимонная кислота. Для удешевления питательной среды вместо глюкозы, как основного углерода, могут использоваться сахароза, мальтоза и др [27].

Важно поддерживать содержание глюкозы в питательной среде. При ее повышенной концентрации будут образовываться большое количество глюконовой кислоты, которая снижает значение pH. В совокупности это приведет к снижению накопления целлюлозы бактериями [23].

В настоящее время разрабатываются технологии использования в качестве источника углеводовсодержащие отходы производств пищевой и аграрной промышленности. Это положительно скажется на решении проблемы их утилизации и поиска более дешевого субстрата для бактерий. Однако в большинстве случаев в промышленном сырье могут содержаться частицы тяжелых металлов или токсинов, что может сказаться на качестве целлюлозы. Поэтому необходима очистка углеводовсодержащих отходов перед их

использованием [28].

Стоит уделять внимание содержанию азота в питательной среде для культивирования. В качестве источника азота могут выступать как органические, так и неорганические соединения. В питательную среду HS преимущественно входят пептон и дрожжевой экстракт, они являются поставщиком азота и главным фактором роста полимера. Содержание в питательной среде азотсодержащих компонентов увеличивает биомассу микроорганизмов и снижает выход целевого продукта.

Также исследуются альтернативные источники азота, которые смогут удешевить синтез БЦ. Это использование кукурузного экстракта, который обеспечивает более высокий выход БЦ в сравнении с контролем. Известно, что лактоза в качестве углеродного субстрата практически не используется из-за отсутствия генов β -галактозидазы у бактерий рода *Gluconacetobacter*. Однако в исследовании (Biassander C, 2021) было продемонстрировано, что лактоза в сочетании с кукурузным экстрактом приводит к высокой концентрации БЦ [29].

В качестве неорганического источника азота рассматривали производные сульфата аммония, однако было продемонстрировано, что выход БЦ оказался крайне низким. Именно поэтому приоритет отдается новым органическим источникам, например, отрубей риса, которые оказались более подходящей заменой традиционных субстратов азота. В исследовании (Rice Bran, 2020) доказано, что выращенная культура бактерий *A. Xylinum* успешно приспособилась к новому источнику азота, а БЦ отличалась лучшей кристалличностью [30].

Таким образом, приведенное выше указывает на то, что источник азота может критично влиять на синтез БЦ, обеспечивая высокий или низкий выход.

1.2 Свойства бактериальной целлюлозы

1.2.1 Строение и структура

Целлюлоза – самый распространённый полимер, который встречается в природе. Она входит в состав клеточной стенки растений, грибов, реже водорослей. Бактериальная целлюлоза представляет собой экзополимер, который состоит из остатков D-глюкозы, соединенных друг с другом β -1,4-гликозидными связями. Внутри целлюлозы молекулы располагаются параллельно, что ведет к образованию фибриллярных структур.

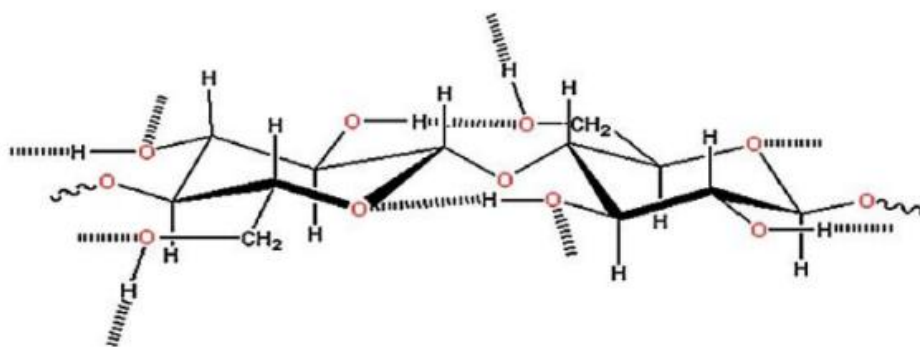


Рисунок 4 – молекулярное строение БЦ

Первые результаты культивирования целлюлозы были опубликованы в 1886 г. Брауном, он указал виды рода *Acetobacter* как перспективные для синтеза полимера.

Бактериальная целлюлоза – это полностью биоразлагаемый, экологичный, нетоксичный биополимер. Волокна БЦ имеют длину около 10 мкм и диаметр 10-20 нм, они образуют трехмерную сетевую структуру, которые и переходят в микрофибриллы. Эти микрофибриллы представляют собой гидрогелевую пленку с большой площадью поверхности и повышенным количеством пор [31].

Отличительным свойством БЦ является ее гидрофильность, это объясняется тем, что в состав полимера входит много гидроксильных групп. Эти группы также обуславливают способность БЦ к биоразложению и

химическому модифицированию, что является крайне необходимым в настоящее время для создания разного рода материалов.

Известно, что БЦ, синтезируемая разными видами бактерий и на разных субстратах, может обладать отличительными друг от друга свойствами. К примеру, целлюлоза, синтезируемая на древесине, обладает волокнами меньшего диаметра, чем волокна БЦ на стандартной среде NS. Также целлюлоза, синтезируемая на субстрате с большим содержанием азота, характеризуется многослойностью и выраженной рельефностью поверхности [32].

В среднем волокна целлюлозы могут обладать размером от 20 нм до 58 нм, это доказывает, что структуры бактериального полимера почти в 100-200 тоньше растительных волокон. БЦ в отличие от растительной является наноразмерной, это открывает большие перспективы для производства композитов. Также БЦ является более химически чистой, так как в составе у нее отсутствуют лигнин, смолы, воска и все возможные эфирные масла. При очистки растительной целлюлозы от примесей укорачивается длина ее полимерной цепи, это ограничивает ее применение в широком масштабе, поэтому БЦ является отличной альтернативой.

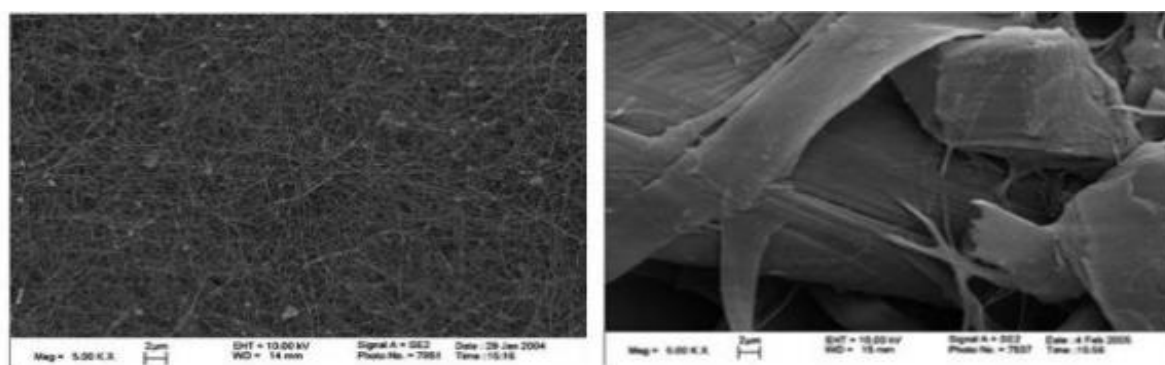


Рисунок 5 – микрофотографии волокон БЦ

БЦ обладает высокой влагоудерживающей и влагопоглощающей способностями, это играет важное значение для ее потенциального применения. Исследование доказали, что влагопоглощение целлюлозы составляет около 90-350%. С использованием альгината это свойство можно улучшить, так как

альгинат образует водородные связи с молекулами воды. Также было доказано, что БЦ является проницаемой для паров и газов.

Структуру целлюлозы можно модифицировать. В исследовании (Indriyati et al. 2019) пленки БЦ получили путем добавления пчелиного воска, это повышает гидрофобность полимера, что подтверждается большим контактным углом смачивания с 53° до 124° . В свою очередь, если добавить к БЦ гуаровую камедь, это не только увеличит показатели гидрофобности композита, но и также повысит прочность на растяжение [33], [34].

Целлюлоза по форме может также отличаться друг от друга. Например, полимер, полученный в динамических условиях, характеризуется преобладанием сферических форм. Преимущества сфер заключается в том, что они обладают большой поверхностью, пористостью и гидрофильностью, в сравнении с целлюлозой в статистических условиях.

Целлюлоза представлена четырьмя полиморфными модификациями. Известно, что природная целлюлоза I существует в двух видах: триклинной и моноклинной. Из целлюлозы I можно получить целлюлозу II путем регенерации (это растворение и осаждение), либо мерсеризации (это щелочная обработка). С помощью предварительной обработки аммиаком синтезируют целлюлозу III, а при высоком нагревании до 260°C с глицерином образуется целлюлоза IV [26]. Модификация целлюлозы необходима для создания материалов разного назначения, в том числе композитных. Методы модифицирования позволяют повысить физико-механические свойства полимера.

Для изменения поверхности целлюлозы применяют специальные добавки. Их можно ввести несколькими способами: первый – добавка вводится в расплав на стадии перемешивания компонентов. Второй – целлюлоза изначально покрывается добавкой путем распыления, после чего используется. Также для обработки целлюлозы в целях модифицирования рельефа поверхности используются гамма-облучение, ультразвуковое диспергирование и реакторные установки [35].

1.2.2 Физико-химические и механические свойства

Как пояснялось выше, БЦ – это уникальный биополимер, отличающийся от растительной целлюлозы по многим факторам такие, как высокой водоудерживающей и влагопоглощающей способностями, прочностью, растяжимостью и химической чистотой. Целлюлоза по своей структуре способна поглощать жидкость, в несколько раз превышающей ее вес.

Из целлюлозы можно получать максимально биосовместные материалы для разных целей с высокой степенью полимеризации и необходимыми механическими свойствами. С помощью ряда исследований было определено, что прочность БЦ варьируется от 200 до 300 МПа, модуль Юнга практически выше 20 ГПа. Для сравнения прочность на разрыв растительной целлюлозой 25-200 МПа, модуль Юнга 2,5 МПа. Ниже приведена сравнительная таблица двух видов целлюлоз разного происхождения [31].

Свойства	БЦ	Растительная целлюлоза	Ссылка
Прочность на разрыв (МПа)	20-300	25-200	Feng et al., 2015
Модуль Юнга (Мпа)	20000	2,5	Wang, Tavakoli, and Tang, 2019
Влагосвязывающая способность (%)	>95	25-35	Rebelo et al., 2018
Ширина волокон (нм)	20-100	Неск. мкм	Wang, Tavakoli, and Tang, 2019
Кристалличность (%)	74-96	40-85	Park et al., 2010
Относительная гидрофильность (%)	40-50	20-30	Wang, Tavakoli, and Tang, 2019
Чистота (%)	>99	< 80	Klemm et al., 2005
Степень полимеризации	14000-16000	300-10000	Wang, Tavakoli, and Tang, 2019
Пористость (%)	>85	< 75	Elham and Amir, 2013
Общая площадь поверхности (м ² / г)	>150	< 10	Islam et al., 2012

Рисунок 6 – сравнение физико-механических параметров БЦ и растительной целлюлозы

При помощи рентгенографического анализа была продемонстрирована высокая степень кристалличности, практически до 90% благодаря структуре БЦ. Ее фибриллы находятся в хаотичном порядке, что позволяет чередовать две

фазы кристалличности. С физической точки зрения степень кристалличности описывает соотношение упорядоченных молекул к неупорядоченным, аморфным. Именно от кристалличности будет зависеть дальнейшее применение полимера.

За счет приведенных выше свойств целлюлоза становится более термостабильной [36]. В свою очередь, это дает возможность для обработки БЦ с использованием высоких (автоклавирование) или низких температур (лиофильная сушка). В настоящее время разработки идут в сторону получения наиболее дешевых и экологических материалов, и именно целлюлоза является перспективным направлением многих исследований. Обработка БЦ путем стерилизации никак не нарушает ее структуру и свойства, она выдерживает нагрев до 100°C, не выделяя токсинов.

Известно, что БЦ обладает высокой пористостью, этот параметр крайне важен для создания материала в виде сорбента. Пористость может отличаться в зависимости от разных параметров культивирования, методов сушки. К примеру, в исследовании () для сушки БЦ использовалась заморозка до -70°C (лиофильная сушка), после чего была получена целлюлоза отличающаяся от исходной повышенной пористостью практически на 90% [37].

Также среда, в которой культивируется БЦ, влияет на степень кристалличности и молекулярную массу полимера. К примеру, если производится синтез полимера совместно с альгинатом-натрия, полисахарид водорослей, это повлияет на внутреннюю структуру БЦ. Альгинат натрия влияет на образование водородных связей, разрывая их, после чего степень кристалличности резко падает до 59%, вместо 80% у исходной. Подобный эффект можно наблюдать и при добавлении в среду культивирования других полисахаридов.

На кристаллизацию также влияет и условия ферментации. Если целлюлоза синтезируется в условиях перемешивания, то кристалличность полимера также падает, так как перемешивание нарушает процесс кристалличности. Для примера, целлюлоза полученная при статистических

условиях обладает кристалличностью 84,1%, в перемешиваемых условиях этот показатель заметно ниже и составляет 51% [38].

Таким образом, от степени кристалличности будут зависеть дальнейшие механические свойства. Низкая степень кристалличности ухудшает прочность полимера и уменьшает ее показатель до 22 МПа. Однако, на сегодняшний день именно метод перемешивания повышает выход целлюлозы, поэтому необходимо подобрать подходящую среду и условия культивирования для того, чтобы минимизировать образование недостатка процесса ферментации.

1.3 Гидролитические ферменты и их значение

Ферменты – это катализаторы химических процессов в клетке, обладающие такими свойствами, как высокая селективность, каталитическая активность, хорошая стабильность. Все эти характеристики на сегодняшний день обуславливают интерес к применению ферментов для различных практических целей. В больших масштабах идет изучение свойств гидролитических ферментов.

1.3.1 Трипсин и пепсин

Трипсин и пепсин – это протеолитические ферменты, относящиеся к классу гидролаз. Протеазы катализируют гидролиз белковых связей между молекулами, тем самым вызывая высвобождение полипептидов и свободных аминокислот. Это играет главную роль в метаболизме живых организмов. Протеазы классифицируются на основе их биохимических свойств и по структуре на 62 рода, разделенных на 268 семейств. В настоящее время трипсин и пепсин составляют почти 60% всех промышленных ферментов, из-за их подходящих характеристик, стабильности при использовании.

В последнее время протеазы используются в фармацевтике, медицине и пищевой отрасли. К примеру, они нашли применения в производстве сыров, моющих средств, а также получения белковых гидролизатов с биологически активными свойствами. Кроме того, трипсин и пепсин используются в качестве средств для терапии при лечении расстройств пищеварения, язв или улучшения иммунной системы [39], [40].

Трипсин является важным протеолитическим ферментом в пищеварительной системе человека, а также играет основную роль в гомеостазе, апоптозе, иммунном ответе и тд. Фермент обладает молекулярной массой в 23000 Да и состоит из 223 аминокислотных остатков. В своем составе трипсин имеет четыре остатка триптофана, 10 остатков тирозина и шесть

остатков фенилаланина.

По форме трипсин состоит из двух частей одинакового размера, а основная составляющая каждой части представляет собой набор из шести антипараллельных нитей полипептидной цепи, которые образуют между собой блок β -листа с водородными связями. Остатки таких аминокислот, как гистидин, аспартат и серин, расположенные между двумя частями, играют роль каталитического активного центра фермента.

Трипсин выделяет поджелудочная железа в тонкую кишку, где он участвует в пищеварении белков. Приведенный фермент нашел свое применение в качестве модели пищеварительной протеазы для исследования взаимодействий между лекарством и белком [41].

Одним из ферментов протеаз является пепсин, который входит в состав пищеварительных ферментов человека и животных. Этот фермент происходит от пепсиногена, который активируется с помощью желудочной кислоты. Пепсиноген происходит из клеток пищеварительных желез в эпителии стенок желудка. Пепсин производит расщепление связей между гидрофобными и ароматическими аминокислотами, например, фенилаланин, триптофан, тирозин. Фермент имеет одну полипептидную цепь из 326 аминокислотных остатков с молекулярной массой 35000 Да.

Широкое применение пепсин нашел в промышленности по производству моющих средств. Также он используется для получения гидролизата белка и гидролиза коллагена [42], [43].

1.3.2 Липаза

К сериновым гидролазам относится такой фермент, как липаза, который катализирует гидролиз триглицеридов и реакции этерификации. Липаза состоит из 250-700 аминокислотных остатков, конкретно серин, глицин и гистидин формируют активный центр фермента. Молекулярная масса может быть различной, для микробных она составляет от 27 кДа, для человека – 500 кДа.

Липаза показывает свою наибольшую активность при pH 8-9, однако при использовании добавок pH может сместиться в более кислую сторону. Также рассматриваемый фермент хорошо растворим в воде. Температурный диапазон работы липазы лежит в пределах 30-40°C. Липазы микробного происхождения являются более термостабильными, чем липазы человека, поэтому они привлекли большое внимание в использовании [44].

Этот фермент нашел применение во многих областях промышленности. Он обладает высокой специфичностью, повышенной скоростью действия, простые условия для проведения ферментативных реакций. К примеру, липазы используются для проведения гидролиза липидов или эфиров. Это качество легло в основу работы лекарственных препаратов с липолитической активностью. На сегодняшний день микробные липазы применяются в химической промышленности. Они входят в состав различных моющих средств, шампуней и другой бытовой химии [45].

Высокая универсальность липаз, как биокатализаторов, позволило открыть широкую область их применения. Также фермент способен выполнять крайне специфические химические и биологические трансформации.

Существует много стратегий скрининга липаз в микроорганизмах, которые их продуцируют. Преимущественно для этого необходимо культивирование штамма на твердом агаре или в жидкой среде. Далее производится скрининг, который может быть классифицирован как прямой или косвенный.

Таким образом, липаза является одним из самых применяемых ферментов в больших масштабах. Она обладает высокой специфичностью, быстрой скоростью действия, а также может быть выделена из микроорганизмов, что делает ее более доступной [44].

1.3.3 Лизоцим

Лизоцим – фермент, способный разрушать клеточную стенку бактерий. С

помощью гидролиза он разрушает 1,4-бета-связь между такими остатками, как N-ацетилмурановой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина в составе цепи пептидогликана. Фермент состоит из полипептидной цепи из 129 аминокислотных остатков. Стоит отметить важный факт, что устойчивость молекуле придают четыре дисульфидных мостиков.

Молекулярная составляющая фермента имеет в своем составе две части, в одной из которых присутствуют аминокислоты с гидрофобными группами, а другой – аминокислоты с полярными группами. Расстояние между ними – это активный центр молекулы. Ее вес составляет 14 кДа. Фермент растворяется в воде, однако плохо растворим в органических растворителях [46]. Важной характеристикой фермента является то, что он сохраняет свою активность при низких температурах, а также после высушивания.

Лизоцим имеется почти во всех живых организмах: фаги, насекомые, растения, человек. Эти ферменты разного происхождения, однако близки по химическому строению. Основная функция рассматриваемого фермента – это разрушение наружной оболочки грамположительных бактерий, он находится в слезах, слюне, почках, лейкоцитах.

Благодаря своим свойствам лизоцим применяется в медицине для лечения септических и гнойных процессов, при повреждениях кожных покровов разной природы. Также фермент используется для получения лекарственных средств. В настоящее время лизоцим нашел применение и в промышленности при создании герметических упаковок продуктов [47].

1.4 Способы иммобилизации ферментов на носитель

Иммобилизация ферментов крайне сложный процесс, однако перед ним необходимо активировать фермент и подготовить носитель. Существует всего четыре способа активации: необходимо активировать фермент до самой иммобилизации, которую проводят перед процессом взаимодействия с носителем. Следующий способ включает в себя активацию носителя перед

иммобилизацией. Также в качестве способа активации можно считать использования каких-либо дополнительных агентов-посредников между ферментом и носителем. И последний метод – модификация фермента с использованием рекомбинантной ДНК.

После активации фермента и носителя следует процесс их связывания – иммобилизация. Выделяют два основных метода иммобилизации такие, как физические и химические. К физическим можно отнести адсорбцию, когда фермент закрепляется на носителе с помощью водородных, гидрофобных, электростатических связей. Главным показателем высокой адсорбции является пористость носителя. Чем больше пор на поверхности, тем больше количество вещества сможет прикрепиться. Однако недостаток этого метода в том, что образуется низкое качество связывания фермента с поверхностью носителя.

При химической иммобилизации фермента происходит образование ковалентных связей с поверхностью носителя. С помощью этих связей происходит прочное присоединения фермента, отсутствуют, возможные при физической иммобилизации, диффузионные ограничения. При химической иммобилизации следует учесть тот факт, что образовавшиеся новые связи на должны взаимодействовать с активным центром белка [48].

1.4.1 Бактериальная целлюлоза

В настоящее время широко изучается возможность иммобилизации ферментов на бактериальную целлюлозу, благодаря ее физико-механическим особенностям. Бактериальная целлюлоза – природный биополимер, который выделяют из клеток бактерий. Эта целлюлоза на выходе не имеет никаких включений в отличие от целлюлозы растений. Ее пористость, большая площадь поверхности, биосовместимость дают возможность иммобилизации ферментов. Молекулярная структура биополимера захватывает фермент с поверхности, не влияя на каталитическую активность белка [49].

Для иммобилизации ферментов может быть использована целлюлоза,

полученная разными методами. К примеру, в исследовании (John Jacob, 2020) для иммобилизации фермента из БЦ получали магнетосомы путем культивирования микроорганизмов в специальной среде. После экстракции магнетосом из клеток их нагружали ферментным препаратом с помощью вымачивания. Как показали результаты, такие конструкции позволяют поддерживать активность фермента на более длительное время, что в дальнейшем даст возможность доставлять фермент в течении любого временного интервала [50].

Также БЦ могут использовать в виде суспензии и листов бумаги. Для получения суспензии мембраны БЦ необходимо было разрушить путем гомогенизатора. Для получения матрицы в виде листов БЦ после гомогенизатора высушивали при 60°C, таким образом было получено два вида БЦ. Для иммобилизации фермента на бумагу БЦ ее вымачивали в растворе в течении 18 часов. В свою очередь, иммобилизацию на суспензию БЦ производили путем легкого встряхивании в шейкере в течении 18 часов.

Таким образом, волокна БЦ удерживали фермент внутри, сохраняя его активность на первоначальном уровне. Такая матрица позволяет сохранять действие фермента на более длительный срок вне зависимости от влияний окружающей среды [5].

1.4.2 Хитозан

Хитозан – производное хитина, аминополисахарид 2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкан. С помощью реакций по отщеплению от молекулы хитина ацетильной группы под действием щелочи получают хитозан при температуре 130°C. Было доказано, что по структуре хитозан мало отличается от хитина, одна его молекулы менее упорядочены. Хитозан можно получать с разными молекулярными массами, что открывает большие перспективы для его использования.

Хитозан способен к образованию межмолекулярных взаимодействий, это

благоприятно влияет на образование комплексов с разными белками, полисахаридами и тд [51]. Также биополимер обладает такими свойствами как биоразлагаемость, антимикробная активность, нетоксичность. Функциональные группы на поверхности хитозана образуют комплексы с ферментом, что позволяет проводить физическую адсорбцию.

Иммобилизацию фермента производит преимущественно методом физической адсорбции, путем вымачивания хитозана в растворе фермента. Таким образом, фермент проникает во внутрь и фиксируется на нановолокнах биополимера, сохраняя свою активность. Это открывает широкую возможность для использования хитозана в качестве матрицы для ферментов [52].

1.4.3 Альгинат-натрия

Альгинат – полисахарид, выделяемый из бурых морских водорослей. Этот полисахарид представляет из себя полимерную цепь, состоящую из остатков полиуроновых кислот, связанных 1,4-β- связями. Альгинаты представляют собой гели, характеристики которых зависят от водорослей, общими их свойствами являются высокая степень гидратации, прочность, эластичность консистенции.

Альгинат-натрия нашел широкое применения в медицине, так как является не токсичным для человека. Также полисахарид обладает высокими сорбционными свойствами, что не мало важно для иммобилизации ферментов, стоит отметить, что альгинат является подходящим материалом для биоинкапсулирования. Это получения композитных систем из альгината совместно с биологическими активными веществами [53].

Альгинат нашел применение как конструктивный материал для создания раневых покрытий. Он способен стимулировать ранозаживление и обеспечивать пролонгированный процесс высвобождения нагруженных средств. Недостатком полисахарида является то, что он нестабилен, именно поэтому его необходимо применять совместно с другими материалами [54].

1.5 Методы модификации бактериальной целлюлозы полисахаридами

Как приводилось ранее, БЦ – это полимер бактериального происхождения, обладающим рядом положительных свойств, однако существует такие недостатки, которые могут сократить время использования целлюлозы. Именно поэтому существует необходимость в ее модификации с помощью разных полисахаридов, тем самым получая композитные материалы с усовершенствованными свойствами.

1.5.1 Модификация альгинатом-натрия

Одним из недостатков БЦ является ее короткое время высыхания, что, в свою очередь, ведет за собой ряд сложностей. Для использования раневых покрытий из БЦ необходимо постоянно проводить контроль влажности материала, также такое покрытие необходимо периодически менять, травмирую при этом поврежденную поверхность. Поэтому модификация БЦ с помощью альгината направлена на улучшение влагоудерживающих свойств.

Существует два подхода, влияющие на влагоудерживающие свойства БЦ. Первый – это контроль пористости, которая формируется в процессе биосинтеза, а второй – уже химические модификации после биосинтеза материала. Однако первый вид не дает стабильных результатов, поэтому преимущественно прибегают к постминтетическому модифицированию альгинатом-натрия [7].

Было продемонстрировано, что новый композитный материал из БЦ с альгинатом показал улучшенные влагоудерживающие свойства в сравнении с чистой БЦ. Композиты получают путем нанесения альгината на поверхность БЦ, либо добавления альгината к суспензии БЦ. После чего производят сшивку с помощью хлорида кальция. Такой способ получения является одним из самых распространенных, он также требует лиофильной сушки образцов [55].

1.5.2 Модификация пектином

Пектин – это один из основных компонентов первичной клеточной стенки многих растений, также он может присутствовать во вторичных стенках клеток древесных тканей. Пектины являются сложными полимерами, выполняющие важную функцию у растений.

Известно, что пектины могут совместно использоваться с БЦ, влияя на ее механические свойства. Пектины в составе композита улучшают показатели эластичности, изменяя микроструктуру БЦ. Для создания таких композитов пектин добавляют во время культивирования бактерий, в следствии чего они начинают изначально культивировать целлюлозу с улучшенными свойствами. Также полисахарид влияет и на внешние показатели БЦ, она становится более вязкой в сравнении с первоначальными образцами.

Композиты из целлюлозы и пектина получили широкое распространение в качестве разных модельных систем. Все больше растет интерес к созданию биоупаковок из такого материала. В настоящее время продолжают идти исследования, направленные на детальное изучения свойств БЦ/пектин композитов [56], [57].

1.5.3 Модификация желатином

Еще одним методом модификации БЦ является создание композитов с желатином. Желатин является одной из самых важных биологической макромолекулой, обладающей привлекательными свойствами такими, как полупрозрачность, биоразлагаемость, клейкость. Также желатин обладает хорошей водопоглощающей способностью, он способен впитать воды в 5-10 раз больше своего веса. Это важное свойство, благодаря которому можно усовершенствовать целлюлозу [58].

С помощью желатина и БЦ можно создать гибкие и прочные материалы для биомедицинских целей. Такие композиты можно получить несколькими

свойствами: путем погружения БЦ в раствор желатина, либо добавления желатина к суспензии БЦ. Новые материалы в виде пленок могут применяться как перевязочные или раневые материалы.

Композиты на основе БЦ и желатина отличаются лучшим влагопоглощением, эластичностью, оба этих материала обладают биосовместимостью, что гарантирует их успешное применения. Именно поэтому в настоящее время ведутся исследования, направленные на создание и улучшение таких композитных материалов [59].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты

Для получения образцов и композитных материалов в работе был использован биоразлагаемый полимер природного происхождения, полученный в Лаборатории новых биоматериалов СФУ – бактериальная целлюлоза, а также коммерческий полисахарид из водорослей – альгинат-натрия. В ходе проведения исследования был использован коммерческий ферментный препарат – липаза.

2.2 Методика исследования

2.2.1 Биосинтез БЦ и ее модификация с помощью сушки

Образцы влажной БЦ получены при культивировании *Komagataeibacter xylinus* В-12068 в колбе на стандартной среде Hestrin-Schramm (HS) с добавлением глюкозы 20 гр/л. Культивирование бактерий проводилось при температуре 30°C в течении 5-6 суток. Полученную БЦ промывали от среды 0,5М раствором NaOH, затем производилась промывка дистиллированной водой. Хранение полученного образца производилось в холодильнике с добавлением спирта.

Были получены образцы БЦ с помощью прибора для сублимационной сушки LP10R ILSHIN Corporation (Корея) в течении 24 часов до полного высыхания. Также образцы БЦ были получены с помощью сухожаровой сушки на приборе BINDER ED 23 (Германия) в течении 15 минут при 105°C.

2.2.2 Получение композитов БЦ с альгинатом

Для получения композитных образцов было использовано три вида БЦ; полученные с помощью сухожаровой и лиофильной сушки и влажная БЦ. 450

мг порошка альгината-натрия необходимо растворить в 30 мл дистиллированной воды для получения 1,5%-раствора с использованием магнитной мешалки MR Hei-Standart (Heidolph, Германия) при 250 об/мин с подогревом до 30°C. После получения однородного раствора 15 мг пленки БЦ заливали 10 мл альгината. Из-за того, что лиофильная БЦ отличалась от пленки структурой, ее потребовалось 50 мг и 30 мл альгината. Влажная БЦ обладала весом 50 мг и также была погружена в 30 мл альгината.

Образцы были выдержаны в растворе 1,5 часа для получения композитов. Для того, чтобы альгинат смог принять необходимую форму, его обрабатывали 1%-раствором CaCl_2 и оставляли еще на час. По истечению времени образцы дважды промывали дистиллированной водой и помещали на сутки в морозильную камеру.

Спустя время образцы были подвержены лиофильной сушке Alpha 1-2 LD plus (Christ, Германия) в течении 24 часов при температуре -70°C до полного высыхания альгината. Образцы влажной БЦ сушке не подвергались.

2.2.3 Изучение свойств БЦ и композитов с альгинатом

2.2.3.1 Влагоемкость образцов

Влагоемкость – это способность материала впитывать жидкость. Для ее определения требовалось измерить первоначальный вес образцов, после чего они помещались в воду на разные промежутки времени – 30 минут, 2 часа, 3 часа, 5 часов и 24 часа. Спустя каждый промежуток времени образцы помещались в оборудование для измерения абсолютного содержания воды в их составе Moisture Analyzer HE53 (Mettler Toledo, США) до полного высыхания.

2.2.3.2 СЭМ-микроскопия

Для определения поверхности полученных разными методами высушивания образцов проводилось исследование с помощью сканирующей

электронной микроскопии. Для этого применялся прибор СЭМ-микроскопии HITACHI™-3000 со встроенной системой микроанализа BRUKERX Flash 430 N (Япония).

2.2.3.3 Адсорбционные характеристики

Для определения адсорбционных характеристик было выбрано два вещества разной природы. Органическое вещество – краситель метиленовый оранжевый в качестве низкомолекулярного вещества и высокомолекулярное соединение белковой природы – альбумин.

Методика адсорбции метиленового оранжевого проводилась с помощью ГОСТ 4453-74 с перерасчетом веществ. Затем образцы БЦ и композиты с альгинатом весом 15 мг для пленки БЦ и 30 мг для лиофильной и влажной БЦ погружались в раствор красителя на разные промежутки времени: 30 минут, 2 часа, 3 часа, 5 часов, 24 часа. После чего пипеткой отбирали 2 мл красителя и разбавляли его в 100 раз. Замер оптической плотности проводился на приборе Genesys 10S UV-Vis (Thermo, США) при длине волны 465 нм. С помощью построенного калибровочного графика была определена оптическая плотность образцов и высчитано количество сорбируемого вещества.

Методом Фолина было определено количественное содержание впитавшегося в образцы белка с помощью построенного калибровочного графика. Измерения проводились на приборе Genesys 10S UV-Vis (Thermo, США) при длине волны 600 нм.

2.2.4 Иммобилизация липазы

2.2.4.1 Иммобилизация на БЦ

Иммобилизация липазы на БЦ проводилась с помощью физической адсорбции путем вымачивания в ферментном растворе. Для этого 15 мг липазы

растворяли в 10 мл буфера с pH 7 для пленки БЦ и 50 мг липазы в 30 мл буфера до полного растворения фермента с помощью магнитной мешалки MR Hei-Standart (Heidolph, Германия). Затем в раствор погружались образцы БЦ в нескольких повторностях.

Иммобилизация проводилась в течение 18 часов с постоянным перемешиванием. После чего образцы были промыты дважды буфером и оставлены высыхать на сутки при комнатной температуре.

2.2.4.2 Иммобилизация липазы на композиты

Для получения иммобилизованных форм 10 мл 1,5%-раствора альгината-натрия смешивали с 15 мг сухого порошка липазы для получения однородной массы. После чего пленка БЦ весом 15 мг помещалась в полученный раствор на 1,5 часа для получения композита.

Ввиду различий морфологии лиофильная и влажная БЦ обладали массой 50 мг, поэтому 30 мл 1,5%-раствора альгината-натрия был смешан с 50 мг липазы до однородной консистенции. После чего образцы помещались в раствор на 1,5 часа для получения композитов.

Для того, чтобы альгинат смог принять необходимую форму, его обрабатывали 1%-раствором CaCl_2 и оставляли еще на час. По истечении времени образцы дважды промывали дистиллированной водой и помещали на сутки в морозильную камеру.

Спустя время образцы были подвержены лиофильной сушке с помощью прибора Alpha 1-2 LD plus (Christ, Германия) в течение 24 часов при температуре -70°C до полного высыхания альгината. Влажная БЦ заморозке и сушке не подвергалась, ее хранение производилось в холодильной камере.

2.2.5 Изучение свойств липазы на носителях

2.2.5.1 Определение содержания липазы на БЦ и композитах

Для определения содержания впитавшейся липазы на носителях, в том числе и на композитах, был применен метод Фолина. Ферментный раствор после иммобилизации подвергался дальнейшему анализу с использованием прибора для измерения оптической плотности Genesys 10S UV-Vis (Thermo, США). Чтобы определить количество впитавшегося фермента на композитный материал, необходимо было провести анализ непосредственно самого образца методом Фолина.

2.2.5.2 Активность липазы

Активность фермента – важный показатель, который определяет скорость катализирования реакции ферментом. Она характеризуется скоростью превращения субстрата или скоростью накопления продуктов реакции. Для определения ферментативной активности липазы применялся титриметрический метод Ото-Ямады [35]. Активность определялась на образцах БЦ, а также на композитах с альгинатом.

2.2.5.3 Определение зависимости активности фермента от pH среды

Для определения активности при разных pH использовались фосфатно-цитратные буферы с разными показателями кислотности и щелочности среды. Был применен метод Ото-Ямады с заменой буфера pH7 на другие показатели для анализа зависимости ферментативной активности от pH раствора. Были использованы такие параметры pH, как 3, 5, 8.

2.2.5.4 Определение зависимости активности фермента от времени

Для определения зависимости количества высвобождаемого фермента от времени инкубации, были проведены замеры активности липазы в течение заданного промежутка времени. Для этого композитные образцы пленки и

лиофильной БЦ с альгинатом-натрия были погружены в субстрат на 1 час, 3 часа, 5 часов и сутки, затем проводилась выдержка образцов в инкубаторе BINDER BD 260 (Германия) при 37°C с установленным временем в один час. По истечении времени проводился замер активности липазы у каждого образца с помощью титриметрического метода Ото-Ямады. В качестве контроля были использованы первоначально образцы БЦ без альгината.

2.2.5.5 Десорбционные характеристики

Для определения количества высвобождающейся липазы из композитов были замерены показатели десорбции. В течение заданного временного промежутка от 1 часа до 24 часов образцы пленки БЦ/Alg массой 15 мг и лиофильная БЦ/Alg массой 50 мг были погружены в воду. Затем из каждого образца отбиралась проба для анализа с применением метода Фолина с помощью построенного калибровочного графика. Измерения проводились на приборе Genesys 10S UV-Vis (Thermo, США) при длине волны 600 нм.

2.2.6 Кинетика ферментативной реакции

Константа Михаэлиса-Ментена (K_m) – это показатель, который характеризует сродство фермента к субстрату. Эта кинетическая константа, которая приравнивается к такой концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равняется половине максимального значения. Чем ниже показатель K_m , тем выше сродство фермента к субстрату. Константа определяется с помощью графика.

В эксперименте были использованы образцы пленки БЦ, лиофильной БЦ, в качестве контроля выступала свободная липаза с концентрацией 1,5 мг/мл. Для определения K_m необходимы были следующие параметры: начальное время T_0 , конечное время T , начальная концентрация C_0 , конечная концентрация

S , а также максимальная скорость реакции V_{max} . Эксперимент проводился в трех повторностях. В качестве субстрата использовалось оливковое масло.

Для начала были найдены активности ферментов в иммобилизованной форме и свободной, затем с помощью этих данных были найдены скорости реакции для разной концентрации субстрата, который составлял 0,4 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,6 мг/мл и 0,7 мг/мл. Затем были построены графики по утилизации субстрата по времени от 1 часа до 24 часов. Также были построены линейные графики для расчёта константы K_m .

Также в ходе исследования были определены скорости утилизации субстрата при разной его концентрации от 4 мг/мл до 7 мг/мл. Для этого были построены графики зависимости концентрации утилизации субстрата от времени в течении суток.

2.2.8 Статистическая обработка данных

Все исследования были выполнены минимум в трех повторностях. Статистический анализ был выполнен с помощью программ Microsoft Excel 2019. Результаты представлены в виде среднего арифметического с учетом стандартного отклонения. Достоверность средних значений была проверена с помощью дисперсионного анализа и по t-критерию Стьюдента при уровне значимости $p = 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Страницы 41-63 изъяты в связи с авторским правом

ВЫВОДЫ

1. В процессе биосинтеза получены образцы бактериальной целлюлозы для дальнейшего исследования.

2. В ходе работы разработаны и исследованы образцы бактериальной целлюлозы, полученные с применением методов лиофильного высушивания и сухожарового высушивания, а также композитные образцы БЦ с альгинатом-натрия.

3. Показано, что добавление альгината-натрия к бактериальной целлюлозе в виде пленки увеличивает ее сорбционную способность в 2 раз, для лиофильной БЦ – в 3 раза, показатель влажной БЦ в 1,5 раза. Параметр влагоемкости достиг результата почти в 100% для композитных образцов лиофильной БЦ и пленки БЦ с альгинатом-натрия.

4. Проведена иммобилизация фермента на носители из бактериальной целлюлозы и композитные образцы с альгинатом-натрия. Установлено, что количество фермента в композитных образцах БЦ с альгинатом-натрия было в 2 раза больше для лиофильной БЦ и пленки БЦ по сравнению с первоначальными образцами.

5. Исследована активность иммобилизованного фермента в зависимости от рН среды и времени. Показано, что увеличение рН среды привело к снижению активности свободной липазы в 2 раза и иммобилизованных форм фермента в 4 раза для лиофильной БЦ и в 3 раза для пленки БЦ. При изучении активности фермента в зависимости от времени было установлено, что активность свободного фермента уменьшилась в 1,5 раза, в то время как иммобилизованный фермент сохранял и увеличивал свою активность в 2 раза за 24 часа.

6. Определены параметры скорости утилизации фермента, а также константы Михаэлиса-Ментена. С помощью константы Михаэлиса-Ментена показано взаимодействие фермента и субстрата, однако параметр отличался от

контроля ввиду того, что в процессе иммобилизации на композитные образцы возникают диффузионные ограничения для константы.

7. Таким образом, полученные в ходе исследования результаты показали, что добавление альгината-натрия в качестве дополнительной поверхностной пленке к бактериальной целлюлозе, положительно повлияло на параметры сорбции и влагоемкости, а также на иммобилизацию фермента. Созданный композитный материал может в дальнейшем применяться во многих областях, как носитель фермента, для сохранения его активности от влияния окружающих факторов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Alg – альгинат-натрия

BSA – бычий сывороточный альбумин

БЦ – бактериальная целлюлоза

ЛФ – лиофильная БЦ

ПЛ – пленка БЦ

ВЛ – влажная БЦ

Альг – альгинат-натрия

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. K. C. De Souza et al., “Kinetic study of a bacterial cellulose production by *Komagataeibacter rhaeticus* using coffee grounds and sugarcane molasses,” *Mater. Res.*, vol. 24, no. 3, 2021, doi: 10.1590/1980-5373-MR-2020-0454.
2. R. T. Bianchet, A. L. Vieira Cubas, M. M. Machado, and E. H. Siegel Moecke, “Applicability of bacterial cellulose in cosmetics – bibliometric review,” *Biotechnology Reports*, vol. 27. Elsevier B.V., 01-Sep-2020, doi: 10.1016/j.btre.2020.e00502.
3. М. Бахман, И. Ю. Петрухин, И. Е. Бутенко, К. В. Дутка, and П. С. Громовых, “Биосинтез бактериальной целлюлозы продуцентом *Glucanacetobacter hansenii* в глубинной культуре,” *Евразийское Научное Объединение*, vol. 6, no. 2, pp. 61–65, 2018.
4. D. Ciecholewska-Juśko et al., “Superabsorbent crosslinked bacterial cellulose biomaterials for chronic wound dressings,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 253, no. June 2020, 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117247.
5. C. Buruaga-Ramiro et al., “Bacterial cellulose matrices to develop enzymatically active paper,” *Cellulose*, vol. 27, no. 6, pp. 3413–3426, Apr. 2020, doi: 10.1007/s10570-020-03025-9.
6. N. Chiaoprakobkij, S. Seetabhawang, N. Sanchavanakit, and M. Phisalaphong, “Fabrication and characterization of novel bacterial cellulose/alginate/gelatin biocomposite film,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 30, no. 11, pp. 961–982, 2019, doi: 10.1080/09205063.2019.1613292.
7. I. Sulaeva et al., “Fabrication of bacterial cellulose-based wound dressings with improved performance by impregnation with alginate,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 110, no. August 2019, p. 110619, 2020, doi: 10.1016/j.msec.2019.110619.
8. D. Lin, P. Lopez-Sanchez, N. Selway, and M. J. Gidley, “Viscoelastic properties of pectin/cellulose composites studied by QCM-D and oscillatory shear rheology,” *Food Hydrocoll.*, vol. 79, pp. 13–19, 2018, doi:

10.1016/j.foodhyd.2017.12.019.

9. R. M. Viana, N. M. S. M. Sá, M. O. Barros, M. de F. Borges, and H. M. C. Azeredo, "Nanofibrillated bacterial cellulose and pectin edible films added with fruit purees," *Carbohydr. Polym.*, vol. 196, pp. 27–32, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.017.

10. N. Thongsrikhem, S. Taokaew, M. Sriariyanun, and S. Kirdponpattara, "Antibacterial activity in gelatin-bacterial cellulose composite film by thermally crosslinking with cinnamaldehyde towards food packaging application," *Food Packag. Shelf Life*, vol. 31, no. October 2021, p. 100766, 2022, doi: 10.1016/j.fpsl.2021.100766.

11. Y. N. Yang, K. Y. Lu, P. Wang, Y. C. Ho, M. L. Tsai, and F. L. Mi, "Development of bacterial cellulose/chitin multi-nanofibers based smart films containing natural active microspheres and nanoparticles formed in situ," *Carbohydr. Polym.*, vol. 228, no. September 2019, p. 115370, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115370.

12. A. M. Cakmak et al., "3D Printed Polycaprolactone / Gelatin / Bacterial Cellulose / Hydroxyapatite Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering," 2020.

13. J. Caro-Astorga, K. T. Walker, N. Herrera, K. Y. Lee, and T. Ellis, "Bacterial cellulose spheroids as building blocks for 3D and patterned living materials and for regeneration," *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-25350-8.

14. M. Ghozali, Y. Meliana, and M. Chalid, "Synthesis and characterization of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* using liquid tapioca waste," *Mater. Today Proc.*, vol. 44, pp. 2131–2134, 2021, doi: 10.1016/j.matpr.2020.12.274.

15. N. Sriplai and S. Pinitsoontorn, "Bacterial cellulose-based magnetic nanocomposites: A review," *Carbohydr. Polym.*, vol. 254, p. 117228, 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117228.

16. E. K. Gladysheva, "Effects of Cultivation Conditions on the Biosynthesis of Bacterial Nanocellulose," *Proc. Univ. Appl. Chem. Biotechnol.*, vol. 8, no. 3, pp.

33–40, 2018, doi: 10.21285/2227-2925-2018-8-3-33-40.

17. J. Fernández, A. G. Morena, S. V. Valenzuela, F. I. J. Pastor, P. Díaz, and J. Martínez, “Microbial Cellulose from a *Komagataeibacter intermedius* Strain Isolated from Commercial Wine Vinegar,” *J. Polym. Environ.*, vol. 27, no. 5, pp. 956–967, 2019, doi: 10.1007/s10924-019-01403-4.

18. W. Liu, J. Xiong, H. Zhang, X. Liu, G. Liu, and H. Zhao, “Characterization of *Komagataeibacter xylinus* by a polarization modulation imaging method,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 53, no. 12, 2020, doi: 10.1088/1361-6463/ab6519.

19. G. Buldum, A. Bismarck, and A. Mantalaris, “Recombinant biosynthesis of bacterial cellulose in genetically modified *Escherichia coli*,” *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 41, no. 2, pp. 265–279, 2018, doi: 10.1007/s00449-017-1864-1.

20. S. P. Lin, I. Loira Calvar, J. M. Catchmark, J. R. Liu, A. Demirci, and K. C. Cheng, “Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose,” *Cellulose*, vol. 20, no. 5, pp. 2191–2219, 2013, doi: 10.1007/s10570-013-9994-3.

21. T. I. Gromovykh et al., “Bacterial cellulose synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* for medical applications,” *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 53, no. 1, pp. 60–67, 2017, doi: 10.1134/S0003683817010094.

22. P. Cazón, D. Cazón, M. Vázquez, and E. Guerra-Rodriguez, “Rapid authentication and composition determination of cellulose films by UV-VIS-NIR spectroscopy,” *Food Packag. Shelf Life*, vol. 31, no. December 2021, p. 100791, 2022, doi: 10.1016/j.fpsl.2021.100791.

23. D. H. Hur et al., “Enhanced production of cellulose in *Komagataeibacter xylinus* by preventing insertion of IS element into cellulose synthesis gene,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 156, no. October 2019, p. 107527, 2020, doi: 10.1016/j.bej.2020.107527.

24. Y. E. Agustin, K. S. Padmawijaya, H. F. Rixwari, and V. A. S. Yuniharto, “Glycerol as an additional carbon source for bacterial cellulose synthesis,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 141, no. 1, 2018, doi: 10.1088/1755-1315/141/1/012001

25. Leal A. N. R., Lima A. C. A., etc., “Removal of Remazol Black B dye using bacterial cellulose as an adsorbent”, *Scientia Plena*, vol. 17. p. 1-21, 2021, doi: 10.14808/sci.plena.2021.034201
26. J. Wang, J. Tavakoli, and Y. Tang, “Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 219, no. February, pp. 63–76, 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.05.008.
27. R. T. A. Machado et al., “Komagataeibacter rhaeticus grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 122, no. December 2017, pp. 637–646, 2018, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.06.048.
28. V. Revin, E. Liyaskina, M. Nazarkina, A. Bogatyreva, and M. Shchankin, “Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 49, pp. 151–159, 2018, doi: 10.1016/j.bjm.2017.12.012.
29. B. C. Tureck et al., “Obtaining and characterization of bacterial cellulose synthesized by *Komagataeibacter hansenii* from alternative sources of nitrogen and carbon,” *Matéria (Rio Janeiro)*, vol. 26, no. 4, 2021, doi: 10.1590/s1517-707620210004.1392.
30. C. Narh, C. Frimpong, A. Mensah, and Q. Wei, “Rice Bran, an Alternative Nitrogen Source for *Acetobacter xylinum* Bacterial Cellulose Synthesis,” *BioResources*, vol. 13, no. 2, pp. 4346–4363, 2018, doi: 10.15376/biores.13.2.4346-4363.
31. I. Betlej, K. J. Krajewski, P. Boruszewski, and S. Zakaria, “Bacterial cellulose-properties and its potential application,” *Sains Malaysiana*, vol. 50, no. 2, pp. 493–505, Feb. 2021, doi: 10.17576/jsm-2021-5002-20.
32. I. BETLEJ, “Studies on the diversity of substrate composition in the culture medium of Kombucha microorganisms and its influence on the quality of synthesized cellulose,” *Ann. WULS, For. Wood Technol.*, vol. 108, no. April, pp. 21–25, 2019, doi: 10.5604/01.3001.0013.7676.
33. J. D. P. Amorim, A. F. S. Costa, C. J. S. Galdino, G. M. Vinhas, E. M. S.

Santos, and L. A. Sarubbo, “Bacterial cellulose production using fruit residues as substrate to industrial application,” *Chem. Eng. Trans.*, vol. 74, no. May 2018, pp. 1165–1170, 2019, doi: 10.3303/CET1974195.

34. Indriyati, Y. Irmawati, and T. Puspitasari, “Comparative study of bacterial cellulose film dried using microwave and air convection heating,” *J. Eng. Technol. Sci.*, vol. 51, no. 1, pp. 121–132, 2019, doi: 10.5614/j.eng.technol.sci.2019.51.1.8.

35. A. Y. Anpilova, E. E. Mastalygina, N. P. Khrameeva, and A. A. Popov, “Methods for Cellulose Modification in the Development of Polymeric Composite Materials (Review),” *Russ. J. Phys. Chem. B*, vol. 14, no. 1, pp. 176–182, 2020, doi: 10.1134/S1990793120010029.

36. C. Campano, N. Merayo, C. Negro, and Á. Blanco, “Low-fibrillated bacterial cellulose nanofibers as a sustainable additive to enhance recycled paper quality,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 114, pp. 1077–1083, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.170.

37. P. Cazón, G. Velázquez, and M. Vázquez, “Bacterial cellulose films: Evaluation of the water interaction,” *Food Packag. Shelf Life*, vol. 25, no. May, p. 100526, 2020, doi: 10.1016/j.fpsl.2020.100526.

38. N. H. Avcioglu, M. Birben, and I. Seyis Bilkay, “Optimization and physicochemical characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium,” *Process Biochem.*, vol. 108, no. February, pp. 60–68, 2021, doi: 10.1016/j.procbio.2021.06.005.

39. A. Lukin, “Application and comparison of proteolytic enzyme preparations in technology of protein hydrolyzates,” *Food Sci. Technol.*, vol. 40, no. June, pp. 287–292, 2020, doi: 10.1590/fst.09319.

40. D. A. González-Velázquez et al., “Exploring the Milk-Clotting and Proteolytic Activities in Different Tissues of *Vallesia glabra*: a New Source of Plant Proteolytic Enzymes,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 193, no. 2, pp. 389–404, 2021, doi: 10.1007/s12010-020-03432-5.

41. C. D. Wang, B. S. Liu, G. Bian, L. H. Ma, H. C. Zhang, and X. Cheng,

“Potential influence on drug efficacy from interaction of tartrazine and trypsin,” *Spectrosc. Lett.*, vol. 51, no. 6, pp. 311–317, 2018, doi: 10.1080/00387010.2018.1463546.

42. M. M. Sholeh, L. Ambarsari, W. Nurcholis, and T. Nurhayati, “Characterization of ammonium sulphate fraction of pepsin from fish stomach,” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 404, no. 1, 2019, doi: 10.1088/1755-1315/404/1/012039.

43. F. S. Mohseni-Shahri, F. Moeinpour, and M. Nosrati, “Spectroscopy and molecular dynamics simulation study on the interaction of sunset yellow food additive with pepsin,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 115, pp. 273–280, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.080.

44. D. Bharathi and G. Rajalakshmi, “Microbial lipases: An overview of screening, production and purification,” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 22, p. 101368, 2019, doi: 10.1016/j.bcab.2019.101368.

45. D. Goswami, “Lipase Catalysis in Presence of Nonionic Surfactants,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 191, no. 2, pp. 744–762, 2020, doi: 10.1007/s12010-019-03212-w.

46. Y. Shimazaki and S. Yabu, “Characterization of enzymatic activity of lysozyme in lysozyme–ovotransferrin complex before and after treatment with trypsin,” *Sep. Sci. Plus*, vol. 4, no. 10, pp. 377–383, 2021, doi: 10.1002/sscp.202100030.

47. H. D. Kusumaningrum, S. Nasution, E. Kusumaningtyas, and D. N. Faridah, “Lisozim dari Putih Telur Ayam sebagai Agen Antibakterial,” *Indones. Bull. Anim. Vet. Sci.*, vol. 28, no. 4, p. 175, 2019.

48. S. Liu, M. Bilal, K. Rizwan, I. Gul, T. Rasheed, and H. M. N. Iqbal, “Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 190, no. August, pp. 396–408, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.006.

49. R. Zhai, X. Chen, M. Jin, and J. Hu, “Synthesis of a polydopamine nanoparticle/bacterial cellulose composite for use as a biocompatible matrix for

laccase immobilization,” *Cellulose*, vol. 26, no. 15, pp. 8337–8349, 2019, doi: 10.1007/s10570-019-02588-6.

50. J. J. Jacob and K. Suthindhiran, “Immobilisation of lipase enzyme onto bacterial magnetosomes for stain removal,” *Biotechnol. Reports*, vol. 25, p. e00422, 2020, doi: 10.1016/j.btre.2020.e00422.

51. Z. Shariatinia, “Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 120, pp. 1406–1419, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.131.

52. E. Silveira et al., “International Journal of Biological Macromolecules Chitosan – based nanofibers for enzyme immobilization,” vol. 183, no. May, pp. 1959–1970, 2021.

53. F. Xu, Q. Q. Cha, Y. Z. Zhang, and X. L. Chen, “Degradation and Utilization of Alginate by Marine Pseudoalteromonas: A Review,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 87, no. 17, pp. 1–17, 2021, doi: 10.1128/AEM.00368-21.

54. D. R. Sahoo and T. Biswal, “Alginate and its application to tissue engineering,” *SN Appl. Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–19, 2021, doi: 10.1007/s42452-020-04096-w.

55. A. A. Jack et al., “Cellulose Nanofibril Formulations Incorporating a Low-Molecular-Weight Alginate Oligosaccharide Modify Bacterial Biofilm Development,” *Biomacromolecules*, vol. 20, no. 8, pp. 2953–2961, 2019, doi: 10.1021/acs.biomac.9b00522.


56. P. Lopez-Sanchez et al., “Cellulose-pectin composite hydrogels: Intermolecular interactions and material properties depend on order of assembly,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 162, pp. 71–81, 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.01.049.

57. P. Lopez-Sanchez et al., “Pectin impacts cellulose fibre architecture and hydrogel mechanics in the absence of calcium,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 153, pp. 236–245, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.07.113.

58. X. Wang et al., “Preparing printable bacterial cellulose based gelatin gel to promote in vivo bone regeneration,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 270, no. May, p. 118342, 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118342.

59. S. Ye, L. Jiang, C. Su, Z. Zhu, Y. Wen, and W. Shao, “Development of gelatin/bacterial cellulose composite sponges as potential natural wound dressings,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 133, pp. 148–155, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.095.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой
 Т.Г. Волова
Подпись, инициалы фамилия
« 26 » 06 2023г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Биосинтез и исследование бактериальной наноцеллюлозы в качестве
носителя для ферментных препаратов**

тема

06.04.01 Биология

06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель



к.т.н, доцент

Е.Г. Киселёв

Выпускник



А.В. Мякишева

Рецензент



к.т.н, доцент

Н.Ю. Демиденко

Красноярск 2023