

BIOSYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE FOR OBTAINING MEDICAL MATERIALS

Voloshyna I.M.¹, Fedko M.M.², Valova K.¹, Shkotova L.V.³

¹*Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, Ukraine*

²*FARMKHIM, LTD, Sums'ka obl., m. Shostka, Ukraine*

³*Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*
i_woloschina@yahoo.com

The article examines how a change in the source of carbon and nitrogen and their ratio affects the biosynthesis of bacterial cellulose using a microbial association (SCOBY) isolated from kombucha. It was shown that a higher level of microbial cellulose was observed when the microbial association was grown on glucose and glucose-sucrose with the addition of corn flour (159,5-163,5 g/l), yeast extract (141,5-167,5 g/l) and peptone (166,5-198 g/l). With the help of infrared Fourier spectroscopy, the formation of microcellulose biofilms was confirmed. It is also very important to optimize the C/N ratio and establish other cultivation parameters, since the use of microbial cellulose as dressing materials has great prospects for use in the biomedical field. Therefore, further research in this direction is necessary to optimize the process of obtaining bacterial cellulose.

Keywords: kombucha, SCOBY, bacterial cellulose, biosynthesis, polymers, dressing materials

БІОСИНТЕЗ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ ДЛЯ ОТРИМАННЯ МАТЕРІАЛІВ МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

Волошина І.М.¹, Федько М.М.², Валова К.¹, Шкотова Л.В.³

¹*Київський національний університет технологій та дизайну, м. Київ, Україна*

²*ТОВ «Фармхім», м. Шостка, Україна*

³*Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ, Україна*
i_woloschina@yahoo.com

Целюлоза – один з найпоширеніших біополімерів на планеті, який є основним компонентом клітинних стінок рослин і слугує основною зміцнюючою фазою в рослинних структурах. Бактеріальна целюлоза (наноцелюлоза, БЦ) – один із самих жорстких органічних матеріалів, що створила природа. Він складається із чистої целюлози без домішок, які

зазвичай містяться в целюлозі рослинного походження, а саме геміцелюлоза та лігнін [1-3]. Целюлоза складається з лінійних гомополісахаридів, кон'югованих одиницями β -D-глюкози, з'єднаними 1,4- β -глікозидними зв'язками. Це пов'язано з унікальною тривимірною структурою бактеріальної целюлози, яка забезпечує кращі фізичні властивості порівняно з рослинною целюлозою. Наприклад, бактеріальні целюлозні фібрили утворюють розширені агрегатні мережі із середнім діаметром 1,5 нм, що забезпечує набагато більшу площу поверхні, гнучкість, еластичність і міцність на розрив. Після успішного виробництва целюлозних екзополісахаридів лінійні ланцюги целюлози потім організовуються в 10–15 полімерних ланцюгів, у результаті чого утворюються нановолокна, які потім послідовно розташовуються з утворенням мікрофібрил, які в 100 разів менші за рослинні аналоги. Потім мікрофібрили з'єднуються разом, утворюючи пучки мікрофібрил. Групування пучків мікрофібрил утворює стрічки целюлози товщиною 3–4 нм і шириною 70–80 нм [1-3]. Потім ці стрічки випадковим чином переплітаються одна з одною, утворюючи щільну матрицю целюлозних волокон, які встановлюються через важкі між- та внутрішньохімічні зв'язки; головним чином водневий зв'язок, який виникає між послідовними листами целюлози. Цей високий рівень водневих зв'язків також дозволяє утворювати порожнини всередині целюлози, яка має іонний заряд, який дозволяє матеріалам бути вбудованими в матеріал, таким як іони срібла. Ця властивість целюлози дозволить проводити маніпуляції з точки зору завантаження целюлози специфічними антимікробними агентами, які мають іонний заряд, який може націлюватися на мікроорганізми, що викликають інфекції. Тобто БЦ представляє собою об'ємну структуру чистих і висококристалічних нановолокон целюлози, яка може бути у якості матриці для включення інших матеріалів [1-3].

Взагалі БЦ вважається потенційно важливим матеріалом для застосування в різних галузях, включаючи біомедицину, електроніку,

промисловість та сільське господарство. Це пов'язано з їх унікальними характеристиками, таким як висока кристалічність та механічна міцність. Тому з практичної точки зору наноцелюлозу розглядають як зручний та ефективний спосіб отримання стабільних волокон, що є екологічними. В даній роботі ми розглядаємо можливість отримання бактеріальної целюлози вирощеної на різних субстратах для отримання перев'язувальних медичних матеріалів.

1 Методика експерименту

Вирощували мікробну асоціацію (SCOB_Y) виділену із чайного гриба (Комбуча) на універсальному середовищі HS (Хестрином и Шраммом) [4] для отримання посівного матеріалу для подальшого культивування і отримання листів бактеріальної целюлози. Рідке середовище HS складається з глюкози (20 г/л), пептону (5 г/л), дріжджового екстракту (5 г/л), динатрійфосфату (2,7 г/л) та води. Посівний матеріал отримували за допомогою невеликої частини плівки чайного гриба в середовище HS об'ємом 100 мл в скляній колбі з подальшим культивуванням за температури 28 °C, 100 об/хв у продовж 48 год. Клітини концентрували центрифугуванням при 4000 об/хв упродовж 10 хв. Потім ними засівали свіже середовище HS.

Отримання самих біоплівок проводили на середовищах різного складу. За основу брали зелений чай, чорний чай та воду. Додавали різні цукри такі як: сахароза та глюкоза. Також використовували їх змішаний субстрат. У якості джерела вуглецю додавали пептон, кукурудзяну муку та дріжджовий екстракт. Середовища розливали по колбам, доводили рН оцтовою кислотою та вносили попередньо отриманий посівний матеріал у кількості 10-20 %. Вирощували у стаціонарних умовах. Температуру підтримували на рівні 30 °C. Час культивування складав від 48 до 168 год.

Після культивування БЦ промивали дистильованою водою при 100 °C упродовж 5 хв. Після чого плівки відмивали у перекису водню (24 %) 24 год та кип'ятили упродовж 10 хв для знищення залишкової мікрофлори.

Потім плівки центрифугували при 4000 об/хв упродовж 30 хв. Фільтрувальним папером забирали вологу, перевіряли їх товщину, вагу та висушували. Після чого перевірили їх належність до бактеріальної целюлози за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії.

2 Результати експерименту та їх обговорення

Досліджували використання різних субстратів та їх суміші для отримання бактеріальних біоплівки. На початку отримували біоплівки на субстраті з 2 % чорного чаю з додаванням різних джерел карбону та нітрогену. Контролювали вагу мокрої очищеної плівки на 7-му та 14-ту добу. Цей термін був обраний за допомогою літературних даних.

У якості джерела карбону використовували сахарозу та глюкозу, а як додаткове внесення нітрогену – кукурудзяну муку, дріжджовий екстракт та пептон. Варіанти складу поживного середовища № 1-3 використовували тільки джерело вуглецю (глюкоза, сахароза, та їх суміш), а у якості нітрогену слугував чорний чай у концентрації 2 г/л. У інших варіантах № 4-6, № 7-9, № 10-12 вносили додатково джерело нітрогену, а саме кукурудзяну муку, дріжджовий екстракт та пептон відповідно у рівних концентраціях.

Проаналізувавши всі 4 дослідні блоки бачимо, що додаткове внесення нітрогену збільшує масу біоплівки особливо на середовищах з глюкозою та сахарозою-глюкозою (рис. 1, 2).

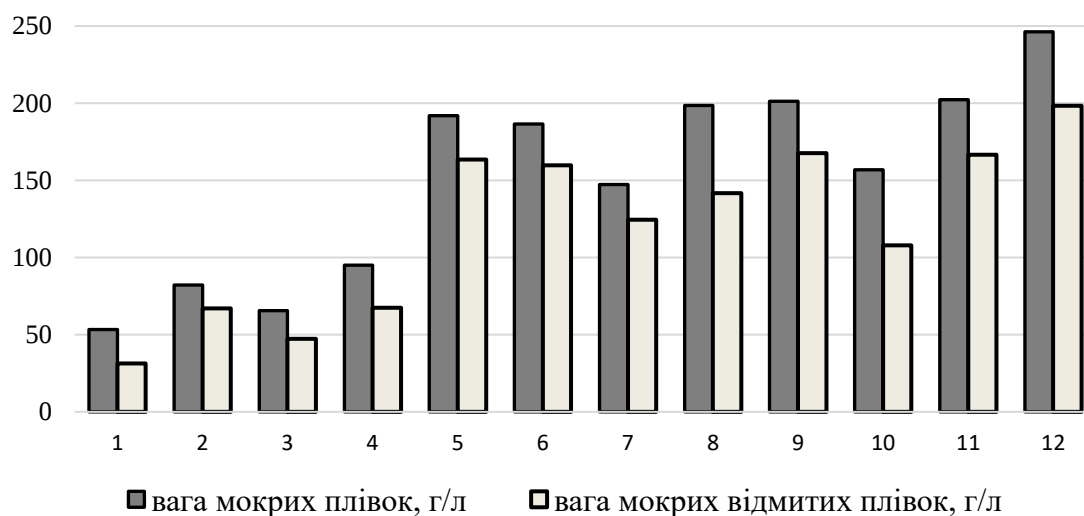


Рисунок 1 – Вага мокрих плівок вирощених на 12 різних субстратах

Найбільша маса відмитих БЦ (166,5-198 г/л) спостерігалась (рис. 1) при внесенні пептону, але його вартість набагато вища за кукурудзяну муку, тому можна сказати, що вигідніше використовувати все ж таки кукурудзяну муку (159,5-163,5 г/л) та дріжджовий екстракт (141,5-167,5 г/л).

Також слід зазначити, що показник товщини мокрих відмитих плівок (рис. 2) був найбільший у варіантах з кукурудзяною мукою (1,5-1,8 мм), що може свідчити про здатність утримувати такими біоплівками більшої кількості вологи, що актуально при використанні їх у якості перев'язувальних медичних матеріалів.

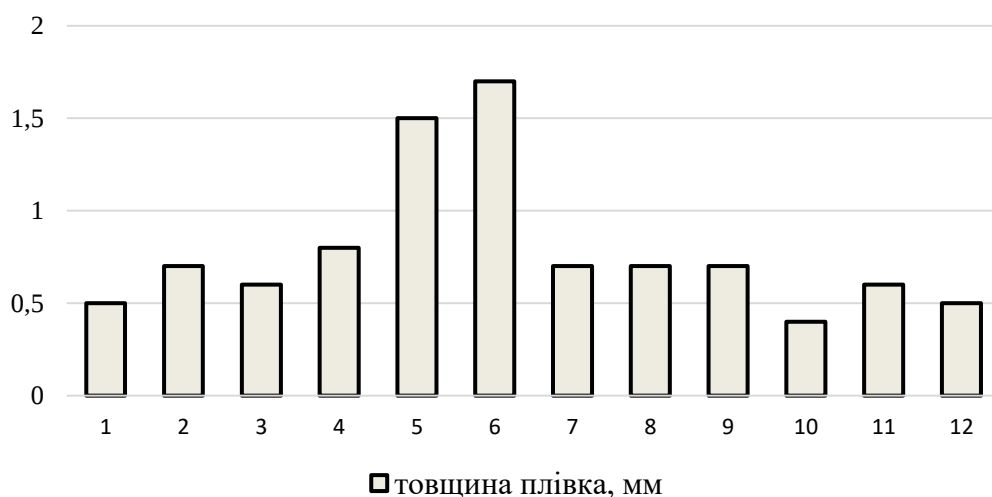


Рисунок 2 – Товщина мокрих відмитих плівок вирощених на 12 різних субстратах

Біоплівки, які були вирощені на субстратах представлених на рис. 3. Ці плівки у подальшому були висушені та проаналізовані за допомогою FTIR-спектрофотометра. Дані цього аналізу представлені на рисунку 4. Конформаційні характеристики БЦ, отриманих із середовищ № 5, № 7 та № 9, аналізували за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії (рис. 4). В інфрачервоному спектрі спостерігається інтенсивний пік поглинання з хвильовими числами 3433 і 2847 см^{-1} який пояснюється валентним коливанням вільних гідроксильних груп -ОН і валентних груп С-Н відповідно. У той час як пік, що з'явився при 1653 см^{-1} , вказує на

валентні коливання $C=O$. Смути в областях 1016, 1042 і 1051, 1070 см^{-1} відповідають подовженню кільця $C-C$, $C-OH$, $C-H$. При цьому розтяг $C-O-C$ з глікозидного зв'язку $\beta(1-4)$ у целюлозі та протифазний вигин $O-H$ при хвильових числах 633, 671 см^{-1} . Отримані результати порівнювалися з існуючими звітами [5, 6].

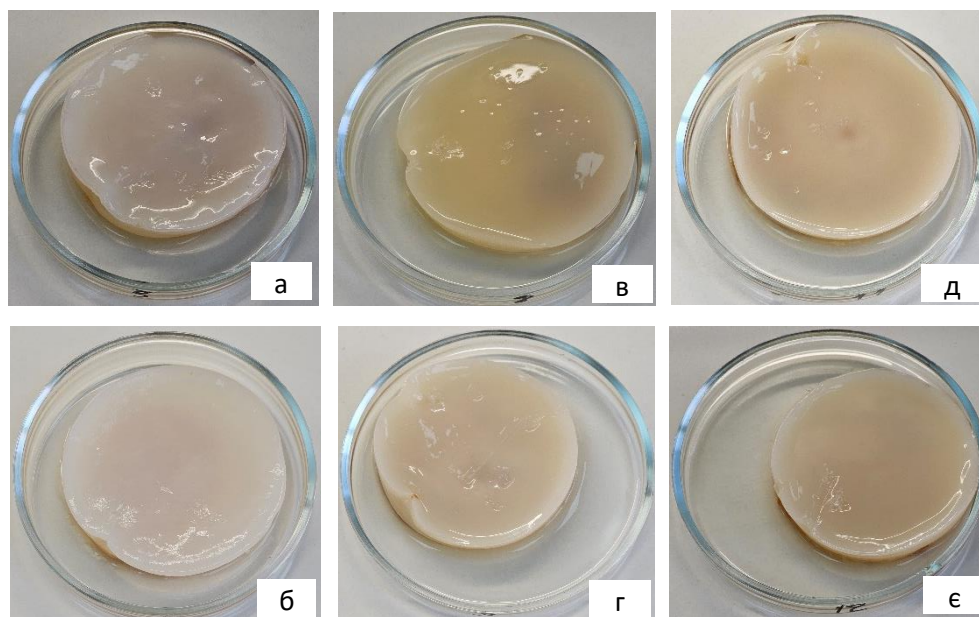


Рисунок 3 — Фотографії біоплівки вирощених на різних варіантах поживного середовищах (табл. 3): а – середовище № 5 (глюкоза, кукурудзяна мука), б – середовище № 6 (сахароза-глюкоза, кукурудзяна мука), в – середовище № 8 (глюкоза, дріжджовий екстракт), г – середовище № 9 (сахароза-глюкоза, дріжджовий екстракт), в – середовище № 11 (глюкоза, пептон), г – середовище № 12 (сахароза-глюкоза, пептон)

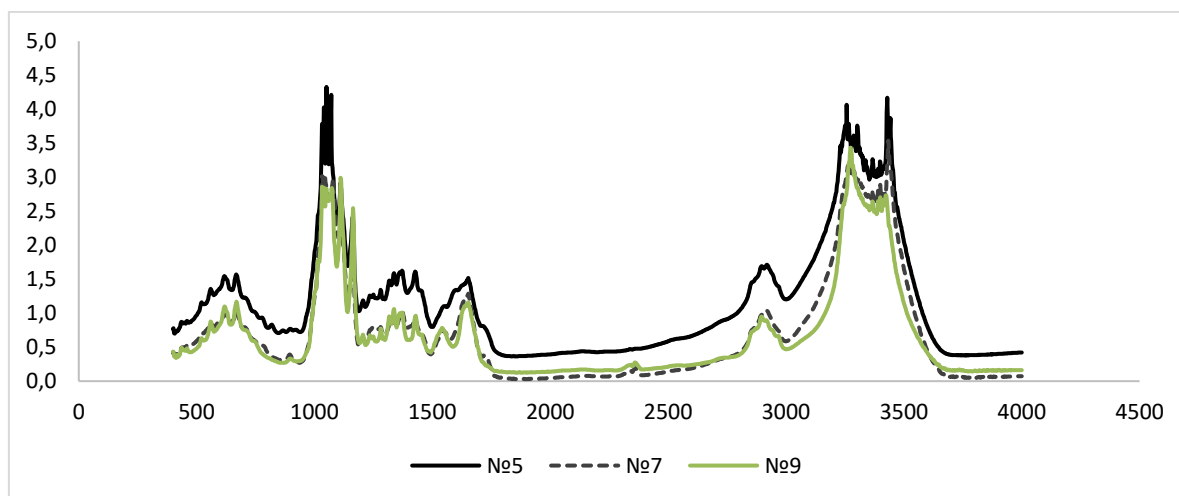


Рисунок 4 — Аналіз БЦ вирощених на середовищах № 5, № 7 та № 9 за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії

Оскільки культуральне середовище являє собою найбільшу вартість загальних витрат на виробництво БЦ, тому використання недорогого альтернативного поживного середовища є важливим для збільшення виходу БЦ, а також розширення області його комерційного виробництва та застосування. Чай вважається другим найбільш споживаним напоєм у всьому світі після води. Чорний чай містить біологічно активні сполуки, у тому числі; катехіни (3,95–38,69 мг/г), флавоноїди (6,36–62,10 мг/г), фенольні сполуки (11,33–101,29 мг/г) та вільні амінокислоти (13,38 мг /г) [7]. Ці компоненти допомогли відрегулювати рН ферментаційного середовища, посилили зростання SCOBY і в той же час запобігли псуванню забруднюючих речовин. У цьому дослідженні показана можливість додаючи джерело азоту в поживне середовище з чорним чаєм (кукурудзяного борошна, дріжджового екстракту та пептону) довела свою здатність виробляти ВС більше, ніж на середовищі чорний чай-цукроза. Джерело вуглецю необхідне для мікробного метаболізму та зростання. У цьому дослідженні сахароза, глюкоза та їх змішане внесення є основним джерелом вуглецю в середовищі ВТ, який можна використовувати як субстрат для виробництва ВС.

3 Висновки

На основі проведених досліджень можна розробити стратегії для підвищення виробництва бактеріальної целюлози з мінімальними витратами ресурсів. Для отримання бактеріальної целюлози нами були використані такі джерела вуглецю, як сахароза, глюкоза та їх суміш. Також додавали у субстрати додаткове джерело нітрогену. Було доведено, що вищий рівень БЦ спостерігали при вирощуванні мікробної асоціації на глюкозі та глюкозі-сахарозі з додаванням кукурудзяної муки (159,5-163,5 г/л), дріжджового екстракту (141,5-167,5 г/л) та пептоні (166,5-198 г/л). Знання про вплив різних джерел вуглецю та нітрогену на біосинтез мікроцелюлози може бути корисним для розробки технології підвищення виходу цієї біополімерної речовини. Також дуже важливо

оптимізувати співвідношення C/N та встановити інші параметри культивування. За допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії підтвердили утворення саме біоплівки мікроцелюлози. Тому проведення подальших досліджень у цьому напрямку є необхідним для оптимізації процесу отримання бактеріальної целюлози.

Література

- [1] K.M. Pasaribu, S. Gea, S. Ilyas, T. Tamrin, I. Radecka. *Biomolecules*. 10 (2020) 1511. doi.org/10.3390/biom10111511
- [2] K.V.S. Hodel, B.A.S. Machado, G.d.C. *Pharmaceutics*. 14 (2022) 1222. doi.org/10.3390/pharmaceutics14061222
- [3] S.M. Choi, K.M. Rao, S.M. Zo, E.J. Shin, S.S. *Polymers*. 14 (2022) 1080. doi.org/10.3390/polym14061080
- [4] G Subbiahdoss, S Osmen, E Reimhult. *Biofilm*. 26 (2022) 100071. doi: 10.1016/j.biofilm.2022.100071.
- [5] H. Khan, A. Kadam, D. Dutt. *Carbohydr Polym*. 229 (2020) 115513. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115513.
- [6] S.S.A. Rahman, T. Vaishnavi, G.S. Vidyasri, K. Sathya, P. Priyanka, P. Venkatachalam, S. Karuppiyah. *Sci Rep*. 11 (2021) 2912. doi: 10.1038/s41598-021-82596-4.
- [7] D. Gonçalves Bortolini, C. Windson Isidoro Haminiuk, A. Cristina Pedro, I. de Andrade Arruda Fernandes, G. Maria Maciel. *Food Chem X*. 12 (2021) 100160. doi: 10.1016/j.fochx.2021.100160.

КОМПОЗИТНІ ВУГЛЕЦЬ-ПОЛІМЕРНІ ПОКРИТТЯ ДЛЯ ЗАХИСТУ ВІД ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

Марчукова К. Є., Бутенко О. О

*Київський національний університет технологій та дизайну, вул. Мала
Шияновська (Немировича-Данченка), 2 Київ 01011, Україна
e-mail: butenko.oo@knutd.com.ua*

Для експерименту було виготовлено зразки полімерних покриттів, що складаються з полімерного зв'язувального (полівінілбутиралу (ПВБ)); графітів КГП С1, ГАК-1, АВГ; графітізованої сажі Pure Black. Композити виготовлені шляхом змішування усіх компонентів у швидкісному змішувачі впродовж 20 хвилин та нанесені ракельним методом аплікатором із зазором 250 мкм за допомогою приладу компанії TMAXCN на папір щільністю 120 г/см². Всі досліджені зразки мають густину меншу 1·10³ кг/м³, що, очевидно, обумовлено наявністю внутрішніх пустот. Тому зразки ущільнили методом прокатки за допомогою приладу для вальцювання марки TMAXCN. Було визначено їх товщину та розраховано укривність та густину композитів, дані занесено до таблиці.

Таблиця – Склад та основні фізичні параметри одержаних композитів

№	Склад %	Товщина фарби, мкм	Укривність фарби, г/см ²	Густина фарби, г/см ³
1	20 РВ	128,4*	0,079	0,623
	40 КГП 20 ГАК-1 20 ПВБ	82,2**	0,08	0,9597
2	15 АВГ	125	0,065	0,5156
	15 ПВБ 50 ГАК-1 20 РВ	85	0,054	0,640
3	20 РВ	120	0,056	0,4537
	50 КГП 15 АВГ 15 ПВБ	83,2	0,054	0,6677

*перша строка відноситься до зразків без прокатки

** друга строка відноситься до зразків після прокатки

Експериментально визначено, що при ущільненні зразку методом прокатки зменшується поверхневий опір, а значить збільшується поверхнева електропровідність, від якої наряду залежить ефективність екранування.