

**Савицкая И.С.¹, Кистаубаева А.С.²,
Шокатаева Д.Х.³, Абдулжанова М.А.⁴**

¹доктор биологических наук, доцент, e-mail: irasava_2006@mail.ru

²кандидат биологических наук, заведующая кафедрой биотехнологии, e-mail: aida_kaz@mail.ru

³студентка PhD-докторантуры, преподаватель, e-mail: dina_ibrayeva_91@mail.ru

⁴студентка PhD-докторантуры, e-mail: malika_81_@mail.ru

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ПОЛУЧЕННОЙ
НОВЫМ ШТАММОМ *KOMAGATAEIBACTER XYLINUS C-3*
НА ОПТИМИЗИРОВАННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ**

Бактериальная целлюлоза (БЦ) – природный полимер, характеризующийся высокой адсорбционной способностью, биологической совместимостью и механической прочностью. В отличие от растительной целлюлозы, БЦ химически чистый внеклеточный продукт. Благодаря своим уникальным свойствам БЦ является перспективным материалом для медицины.

Исследования по разработке и применению БЦ в области медицинского материаловедения проводятся во многих странах. Однако в Казахстане до сих пор не налажено производство БЦ, а в коллекциях отсутствуют штаммы-продуценты для ее получения в производственных масштабах.

Для этого было предпринято настоящее исследование, цель которого – выделить штамм продуцент бактериальной целлюлозы и подобрать оптимальные условия для его роста и биосинтеза гель-пленки БЦ в поверхностных условиях культивирования.

Штаммы-продуценты бактериальной целлюлозы выделяли из смешанной культуры чайного кваса, а также яблочного уксуса фирмы «Эль-иксир» на среде S. Hestrin, M. Shramm. Факторами оптимизации питательной среды служили верхний и нижний уровни концентрации глюкозы, пивного сусла и этанола. Продуктивность штаммов оценивали путем измерения массы БЦ, которую предварительно высушивали при 80°C. Культурально-морфологические свойства выделенного штамма изучали с помощью лабораторного микроскопа «БИОЛАМ». Для биохимической идентификации штаммов применяли баканализатор Vitek с стандартизованные тест-системы API 50 CH и API 20 E с программным обеспечением идентификации Apiweb производства BioMérieux (Франция). Видовая принадлежность штамма и чистота на контаминацию посторонней микрофлорой определена путем анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рНК. Исследование структуры пленок проводили на растровом электронном микроскопе. Механическую прочность БЦ определяли на разрывной машине «Instron».

Выделен, идентифицирован и генотипирован новый продуцент бактериальной целлюлозы *Komagataeibacter xylinus C-3*. Определены параметры роста и продуктивности двух коллекционных (*Gluconoacetobacter xylinus* B-11240 и *G. hansenii* B-6756) и нового штамма *Komagataeibacter xylinus C-3* на средах, содержащих разные источники углерода и питательные добавки в условиях статического культивирования. Подобраны условия поверхностного культивирования штамма, обеспечивающие максимальный уровень биосинтеза БЦ, разработан способ очистки пленки. Оптимальной питательной средой для образования гель-пленки БЦ штаммом *Komagataeibacter xylinus C-3* в статических условиях культивирования является среда HS с 1% глюкозой, 0,5% этанолом и добавлением пивного сусла в количестве 0,1%. Максимальный выход БЦ – 7,11 г/л достигался при культивировании продуцента в течение 5 дней при 30°C. Новый штамм по уровню продуктивности превосходит коллекционные штаммы *G. xylinus* B-11240 и *G. hansenii* B-6756, рекомендованные для промышленного получения целлюлозы. Штамм размещен в Gen Bank под номером KU598766.

Электронно-микроскопическое исследование структурных особенностей полученной гелевой пленки показало, что она состоит из микрофибриллярных лент наноразмерных размеров (15-55 нм). Пористая структура гелевой пленки и высокая степень кристалличности обеспечивает ей отличную механическую прочность (17,01 ± 0,5 МПа). Пленка характеризуется высокой сорбционной мощностью, позволяющей удерживать 11 г воды на 1 г дегидратированного полимера.

Бактериальная целлюлоза, синтезируемая штаммом *Komagataeibacter xylinus* C-3 в условиях поверхностного культивирования, может быть основой для получения сверхпрочных наноконпозиционных материалов в биомедицинских и других смежных областях.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, гелевая пленка, *Komagataeibacter xylinus*.

Savickaja I.S.¹, Kistaubaeva A.S.², Shokataeva D.H.³, Abdulzhanova M.A.⁴

¹doctor of biological sciences, associate professor, e-mail: irasava_2006@mail.ru

²candidate of biological sciences, head of Biotechnology department, e-mail: aida_kaz@mail.ru

³PhD-student, lecturer, e-mail: dina_ibrayeva_91@mail.ru

⁴PhD-student, e-mail: malika_81_@mail.ru

Kazakh national University named after al-Farabi, Kazakhstan, Almaty

Physicochemical properties of bacterial cellulose formed by the novel *Komagataeibacter xylinus* C-3 strain on an optimized nutrient medium

Bacterial cellulose (BC) – a natural polymer, characterized by high adsorption capacity, biocompatibility and mechanical strength. Unlike plant cellulose, BC is a chemically pure extracellular product. Due to its unique properties BC is a promising material for medicine.

Studies on development and application of BC in field of medical materials science are conducted in many countries. However, the obtaining of BC in Kazakhstan has not been established yet, and there are no strains in collections for its production on an industrial scale.

The purpose of present study was to isolate the bacterial cellulose producer and to select optimal conditions for its growth and BC gel film biosynthesis under surface cultivation conditions.

Bacterial cellulose-producing strains were isolated from a mixed culture of Kombucha, as well as apple cider vinegar of «El-iksir» firm on S. Hestrin, M. Shramm media. The optimization factors of nutrient medium were the upper and lower concentration levels of glucose, beer wort and ethanol. The productivity of strains was assessed by measuring the BC mass, which was previously dried at 80 °C. The culture-morphological properties of isolated strain were studied using a BIOLAM laboratory microscope. For biochemical identification of strains, a Vitek bacterial analyzer (BioMerieux, France) with standardized API 50 CH and API 20 E test systems with Apiweb identification software was used. The strain species and purity on extraneous contamination was determined by analyzing the nucleotide sequence of 16S rRNA gene. A study of films structure was studied on a scanning electron microscope. The mechanical strength of BC was determined on an «Instron» testing machine.

A new producer of bacterial cellulose *Komagataeibacter xylinus* C-3 was isolated, identified and genotyped. The parameters of growth and productivity of two collection strains and new *Komagataeibacter xylinus* C-3 strain on media containing different carbon sources and nutritional supplements under static cultivation conditions were determined. The conditions for surface cultivation of strain, which ensure the maximum level of BC biosynthesis, were selected, and a method for purifying the film was developed. The optimum nutrient medium for BC gel film formation by the *Komagataeibacter xylinus* C-3 strain under static culture conditions is the HS medium with 1% glucose, 0.5% ethanol, and 0.1% addition of beer wort. The maximum yield of BC – 7.11 g/l was achieved when the producer was cultivated for 5 days at 30°C. The new strain is more efficient than the collection strains of *Gluconoacetobacter xylinus* B-11240 and *Gluconoacetobacter hansenii* B-6756, recommended for industrial production of cellulose. The strain's Gen Bank accession number is KU598766.

Electron microscopic examination of obtained gel film structural features showed that it consists of microfibrillar bands of nanoscale sizes (15-55 nm). The porous structure of gel film and a high degree of crystallinity provide an excellent mechanical strength to it (17.01 ± 0.5 МПа). The film is characterized by high sorption capacity, which allows to hold 11 g of water per 1 g of dehydrated polymer.

Bacterial cellulose synthesized by *Komagataeibacter xylinus* C-3 strain under surface culture conditions can be the basis for production of ultra-strong nanocomposite materials in biomedical and other related fields.

Key words: bacterial cellulose, gel film, *Komagataeibacter xylinus*.

Савицкая И.С.¹, Қыстаубаева А.С.², Шоқатаева Д.Х.³, Абдулжанова М.А.⁴

¹биология ғылымдарының докторы, доцент, e-mail: irasava_2006@mail.ru

²биология ғылымдарының кандидаты, биотехнология кафедрасының меңгерушісі, e-mail: aida_kaz@mail.ru

³PhD-докторантураның студенті, оқытушы, e-mail: dina_ibrayeva_91@mail.ru

⁴PhD-докторантураның студенті, e-mail: malika_81@mail.ru

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Оптимизацияланған қоректік ортадағы *Komagataeibacter xylinus* C-3 штаммы арқылы пайда болатын бактериалды целлюлозаның физико-химиялық қасиеттері

Бактериалды целлюлоза (БЦ) – жоғары адсорбциялық қабілеті және механикалық беріктігі бар табиғи полимер. Өсімдік целлюлозасымен салыстырғанда, БЦ химиялық таза жасушадан тыс өнім. Оның ерекше қасиеттеріне байланысты медицина үшін перспективті материал болып табылады.

Медицина саласында БЦ өнімдерін пайдалану және зерттеу жұмыстары көптеген елдерде жүзеге асырылып отыр. Дегенмен, Қазақстанда целлюлоза өндірісі әлі де жолға қойылмаған, оның себептерінің бірі БЦ өндіретін штаммдардың болмағандығында.

Осы мақсатта негізгі зерттеулер жолға қойылды, олардың мақсаты-бактериалды целлюлозаны бөліп алу және оның өсуіне және БЦ гель-қабықшасының биосинтезіне қолайлы жағдайларды жасау.

С. Hestrin, M. Shramm орталарында «Эль-иксир» фирмасында алма қышқылынан, шай дақылынан бактериалды целлюлозаның штамм-продуценттері бөліп алынды. Қоректік ортаның оптимизациясы ретінде этанолдың және глюкозаның концентрациясы қарастырылды. Штаммдардың өнімділігін БЦ массасын өлшей отырып анықталды.

Бөліп алынған штаммның дақылдық-морфологиялық қасиеттері «БИОЛАМ» лабораториялық микроскобы арқылы зерттелді. Штаммдардың биохимиялық идентификациясы үшін Vitek баканализаторы қолданылды. Штаммның түрі және бөгде микрофлорадан тазалығы 16S rRNA генінің нуклеотидтік реттілігі бойынша анықталды. Қабықшаның құрылымын электронды микроскопта анықтадық. БЦ-ның механикалық беріктігін «Instron» аппаратында тексердік.

Komagataeibacter xylinus C-3 жаңа бактериалды целлюлозасы бөлініп алынды. Оның өсу параметрлері мен өнімділігі көміртегісі бар қоректік орталарда анықталды. Штаммды беттік дақылдау жағдайлары таңдалып, қабықша тазалаудан өткізілді. *Komagataeibacter xylinus* C-3 штаммы үшін оптималды қоректік орта сыра суслосы бар қоректік орта танылды. БЦ-ның максималды шығымы оны 5 күн бойы 30°C дақылдағанда көрсетті (7,11 г/л). Штамм KU598766 бойынша нөмірленген GenBank салынған.

Микроскопиялық зерттеулер алынған гель-қабықшаның құрылымы микрофибриллярлы жіпшелерден тұратынын анықтады. Оның механикалық беріктігі 17,01 ± 0,5 МПа құрады.

Komagateibacter xylinus C-3 штаммымен беттік дақылдау барысында синтезделетін бактериалды целлюлоза өте берік наноккомпозициялық материалдарды биомедициналық және басқа да аймақтарда алуға мүмкіндік тұғызады.

Түйін сөздер: бактериалды целлюлоза, гель-пленка, *Komagateibacter xylinus*

Введение

Бактериальная целлюлоза (БЦ) представляет собой уникальный природный полимер, состоящий из волокон диаметром 20-175 нм, образуя нано-гелевую пленку, которая имеет удельную площадь внутренней поверхности по меньшей мере 500 м²/г (Lynd 2002: 506). БЦ обладает уникальными свойствами, которые отсутствуют в целлюлозе растительного происхождения (Shah 2013:585-598; Klemm 2005:3358-3393). В отличие от растительной целлюлозы, БЦ химически чистый внеклеточный продукт, так как не содержит лигнин, гемицеллюлозу, пектин и воск. БЦ имеет высокую степень кристалличности, ее плотность составляет 300-900 кг/м³, обладает высокой механической прочностью (до 20

МПа), поглощает и удерживает до 20 г воды на 1 г сухого полимера (Guzun 2014: 280).

Уникальные свойства БЦ привели к использованию ее в ряде коммерческих продуктов (Yang 2014: 175-176). БЦ является основой для получения сверхпрочных облегченных нанокпозиционных материалов: волокон, пленок, трубок, аэрогелей, мембран.

Она обладает биологической совместимостью, т.е. не токсична, не вызывает аллергии и физического отторжения (Czaja 2007: 1-12). В связи с этим пленку БЦ, произведенную с помощью статической культуры, особенно широко применяют в области биомедицины, где она используется в качестве сосудистых трансплантатов, каркаса для тканевой инженерии, искусственных кровеносных сосудов, медицинских

подкладок и зубных имплантатов (Yang 2014: 175-175).

Раневые покрытия, использующие в качестве основы гидрогелевые или гидроколлоидные сорбенты, обеспечивают пластифицирующее воздействие на ткани, размягчают некротические образования за счет тканевой регидратации, облегчают механическое удаление раневого детрита и предотвращают развитие инфекции на поверхности раны и под струпом (Jeong 2010: 373-380). Повязки на основе таких сорбентов создают в ране влажную среду, оптимальную для нормального течения процессов регенерации. Гидрогели и гидроколлоиды способствуют элиминации раневого отделяемого и микроорганизмов. Поскольку пленка БЦ обеспечивает влажную среду, ускоряя заживление, она является отличным перевязочным материалом. Плоская гель-пленка БЦ применяется для создания раневых покрытий при пересадке кожи, лечении ран, послеоперационных швов и язв, а также гнойных воспалений, потертостей и пролежней (Andrade 2010: 9-17; Dahman 2009:5105-5122). Biofill, мембрана, полученная из БЦ, используется в качестве временного заменителя кожи у пациентов с ожогами и язвами (Saska 2011: 1-7).

Исследования по разработке и применению БЦ в области медицинского материаловедения проводятся во многих странах. Наиболее интенсивно такие работы осуществляются в Китае (College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, National Engineering Research Center for Nano-Medicine). В России в рамках Технологической платформы «Медицина будущего» такие исследования объединены в научно-технический совет «Многокомпонентные биокомпозиционные медицинские материалы». В него входят Институт высокомолекулярных соединений РАН, Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Санкт-Петербургский, Бийский Государственные университеты, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева.

Судя по большому количеству публикаций и проектов, изучение и внедрение БЦ развивается стремительными темпами. Однако в Казахстане до сих пор не налажено производство БЦ, а в коллекциях отсутствуют штаммы-продуценты для ее получения в производственных масштабах. В нашей стране пока не ведутся работы в направлении создания новых композиционных материалов для биоактивных раневых покры-

тий, использующих в качестве несущей сорбирующей матрицы БЦ.

Для этого было предпринято настоящее исследование, цель которого – выделить штамм продуцент бактериальной целлюлозы и подобрать оптимальные условия для его роста и биосинтеза гель-пленки БЦ в поверхностных условиях культивирования.

Материалы и методы исследования

Выделение и идентификация штаммов-продуцентов по фенотипическим признакам

Штаммы-продуценты бактериальной целлюлозы выделяли из смешанной культуры чайного кваса, а также яблочного уксуса фирмы «Эль-иксир». Для выделения бактерий, синтезирующих целлюлозу использовали среду S. Hestrin, M. Shramm (HS), которая наиболее часто используется в подобных исследованиях (Lacin 2014: 22-27; Czaja 2006: 145-151; Solway 2011: 69-73). Питательную среду разливали в колбы по 100 мл, добавляли 5 мл образца культуральной жидкости и пленки, образующейся на поверхности чайного кваса и яблочного уксуса. После 3-х суток инкубирования полученные культуры вносили в плоские кюветы по 0,1 мл, в которые добавляли жидкую питательную среду в объеме 10 мл и снова инкубировали при 30°C в статических условиях. На 5-ые сутки культивирования на поверхности среды образовывались пленки прочной консистенции, что свидетельствовало о наличии целлюлозосинтезирующих бактерий. Условия культивирования?

Идентификацию выделенных изолятов проводили на основании данных микроскопии мазков, окрашенных по Граму и Ожешко (Нетрусов 2005: 608), морфологии клеток на бинокулярном световом микроскопе Micros MC10 (Австрия) и изучения биохимической активности и культуральных свойств с использованием определителя бактерий Берджи (Хоулт 1997: 800).

Для биохимической идентификации штаммов применяли баканализатор Vitek 2 Compact, (США) со стандартизированными тест-системами API 20 NE и API 10 S с программным обеспечением идентификации *Apiweb* производства BioMerieux (Франция). Данная тест-система включает 50 биохимических тестов по изучению углеводного обмена микроорганизмов.

Идентификация штаммов по генотипическим признакам

Идентификация штаммов была осуществлена методом определения прямой нуклеотидной

последовательности фрагмента *16S rRNA* гена, с последующим определением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных Gene Bank. ДНК выделялось методом Kate Wilson (Clayton 1995:595-599; Clarridge 2004:840-862). Реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами 8f 5' – AgAgTTTgATCCTggCT-CAg-3 и 806R- 5' ggACTACCAgggTATСТААТ в общем объеме 30 мкл. ПЦР смесь содержала 150 нг. ДНК, 1Ед. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 7 минут; 30 циклов: 95°C – 30 секунд, 55°C- 40, 72°C – 1 минута; заключительная элонгация 7 минут при 72°C, ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Получение гель-пленки БЦ

Синтез целлюлозы штаммами уксуснокислых бактерий осуществляли на питательных средах, содержащих водные растворы дрожжевого экстракта, глюкозы, пептона, этанола и пивного сула в концентрациях, установленных в результате оптимизации питательной среды с рН 5,9 – 6,0. Посевным материалом служила 48-часовая культура уксуснокислых бактерий, выращенная на среде, содержащей дрожжевой экстракт и пивное суло (6° Балинга) в соотношении 1:1 с 2 мас. % глюкозы 1 об. % этанола.

Культивирование вели при 30°C в течение 5 суток, после чего целлюлозу отделяли и периодически промывали 0,5-1% водным раствором NaOH при кипячении до удаления клеток. Затем целлюлозную пленку отмывали от раствора NaOH дистиллированной водой, 0,5% раствором уксусной кислоты и вновь дистиллированной водой до нейтральной реакции. Полученную целлюлозу хранили в виде гель-пленки в дистиллированной воде при 5°C (Cai 2010: 83-91).

Биомассу пленок БЦ определяли после предварительного высушивания в сухожаровом термостате при 80°C до постоянной массы образца.

Электронно-микроскопическое исследование гель-пленок БЦ

Структуру образцов пленок бактериальной целлюлозы исследовали на сканирующем электронном микроскопе Quanta 3D 200i Dual system, FEI (США) в ДГП «Национальная Нанотехнологическая Лаборатория Открытого Типа» КазНУ им. аль-Фараби. В качестве проводящего материала служила углеродная пленка. Для

анализа структуры микрофибрилл БЦ проводили статистическую обработку значений их диаметра. В расчете использовали выборку данных, включающую 1000 измерений.

Исследование прочности пленок бактериальной целлюлозы

Прочность БЦ определяли на разрывной машине «Instron» (3360, США) при одноосном режиме по показателям максимальная нагрузка разрыва (кг), напряжение разрыва (МПа), удлинение (%). Для этого готовили образцы БЦ в виде полосок размером 65x10 мм. Испытания проводили при температуре (25±2) °C и относительной влажности (55±5) %, при скорости деформирования образца 100 мм/мин. Модуль Юнга (модуль продольной упругости) пленок определяли по пределу прочности на разрыв со стандартным тестом ASTM D-882-97, предназначенным для определения прочности тонких пластиковых пленок.

Изучение сорбционной способности гель-пленок БЦ

Из одного большого пласта гель-пленки БЦ, толщиной 0,5+0,01 см специальным устройством вырезали пластины одного размера, которые отжимали под испытательным прессом (ИП-1А-1000ПК, Роспромаш, Россия). В эксперименте использовали дегидратированные описанным способом гель-пленки, вес которых до отжима составлял 2,5 +0,1 г, после отжима – 0,2 +0,01 г. Отжатые пленки целлюлозы погружали в кюветы со средами-адсорбатами: вода или раневой экссудат, полученный из Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева. Адсорбционные свойства БЦ определяли путем взвешивания предварительно отжатых от жидкости пленок до и после помещения в адсорбат при комнатной температуре в течение 8-ми часов. Взвешивание производили с точностью до 0,0001 г.

Количественное определение редуцирующих сахаров проводили с использованием реактива с 3,5-динитросалициловой кислотой (ДНС) (Miller 1959: 426–429).

Количество уксуснокислых бактерий определяли по оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 650 нм на спектрофотометре PD-303 (ApeI, Япония).

Статистическая обработка результатов экспериментов

Исследования проводились в 5-ти повторностях. Данные экспериментов обрабатывались с помощью прикладной программы «Statistics for Windows, v 5.0» и «BIOSTAT», «Microsoft Excel

for Windows 2007» табличный процессор Excel 7.0. вычисляли среднее значение, меридиану, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего значения и др.

Результаты исследования и их обсуждение

Для создания технологии получения БЦ требуется использование эффективных продуцентов. Основным объектом изучения и практического использования для получения гель-пленок целлюлозы являются уксуснокислые бактерии (Petriale 2011: 231-236; Ruka 2015: 1-12; Romanov 2008: 192-200). В связи с этим, необходимо было выделить продуцент БЦ и подобрать оптимальные условия биосинтеза пленки на питательных средах разного состава в поверхностных условиях культивирования.

Штаммы-продуценты бактериальной целлюлозы выделяли из смешанной культуры чайного кваса и яблочного уксуса на среде S. Hestrin, M. Shramm (HS). Образцы культуральной жидкости и пленки, образующейся на поверхности чайного кваса и яблочного уксуса помещали в жидкую питательную среду. На 5-ые сутки культивирования на поверхности среды образовывались пленки прочной консистенции, образуемые уксуснокислыми бактериями. В некоторых вариантах на поверхности среды наблюдалась кожистая крошащаяся пленка, характерная для роста дрожжей.

Из пленок и культуральной жидкости методом «истощающего штриха» были получены изолированные колонии. Микроскопия клеток из этих колоний позволила разделить эти микроорганизмы на несколько морфологических типов (Рисунок 1).



Пленки БЦ, выделенные из чайного кваса и яблочного уксуса

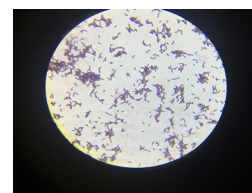


Колонии микроорганизмов, выделенные из чайного кваса и яблочного уксуса



x1000

Дрожжи



x1000

Уксуснокислые бактерии

Рисунок 1 – Морфология клеток микроорганизмов, выделенных из пленок чайного гриба и яблочного уксуса

Одни представляли собой очень крупные формы клеток овальной формы, характерные для клеток дрожжей. Другие – короткие клетки палочковидной формы со слегка округлыми краями, расположенные одиночно или в виде цепочек-нитей, не образующие спор. Такой морфотип позволил отнести их к уксуснокислым бактериям.

Было выделено 10 штаммов, способных к синтезу биополимера. Их продуктивность оценивалась по такому параметру, как вес целлюлозной пленки, которую снимали после 5-ти суточного культивирования штаммов в статических условиях. Новые штаммы сравнивали с двумя коллекционными: ВКПМ *Gluconoacetobacter*

xylinus В-11240 и *Gluconoacetobacter hansenii* В-6756, полученными из ВКПМ (Рисунок 2).

Максимальный выход целевого продукта (БЦ) – 4,56 г/л наблюдался для штамма С-3, его продуктивность оказалась достаточно высокой для данных условий культивирования. Штамм по уровню продуктивности превосходит коллекционные штаммы из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ФГБУ «ГосНИИгенетика», БРЦ ВКПМ, Москва) *Gluconoacetobacter xylinus* В-11240 (2,56 г/л) и *Gluconoacetobacter hansenii* В-6756 (3,45 г/л), рекомендованные для промышленного получения целлюлозы (Рисунок 3).

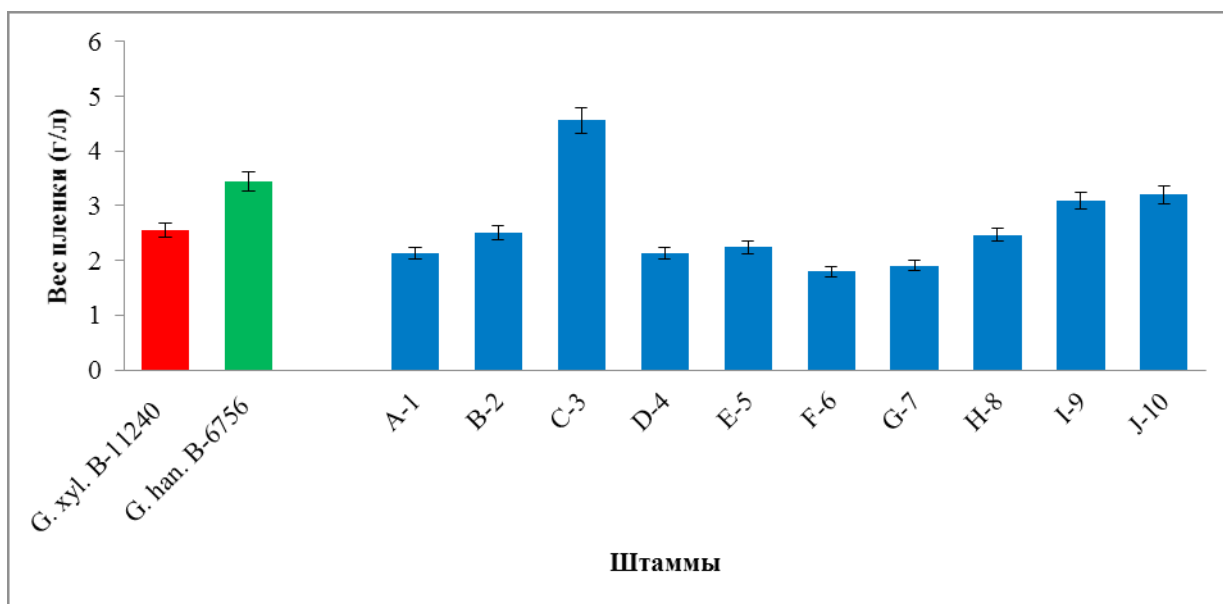


Рисунок 2 – Продуктивность коллекционных штаммов и новых изолятов уксуснокислых бактерий при росте в статических условиях на среде HS

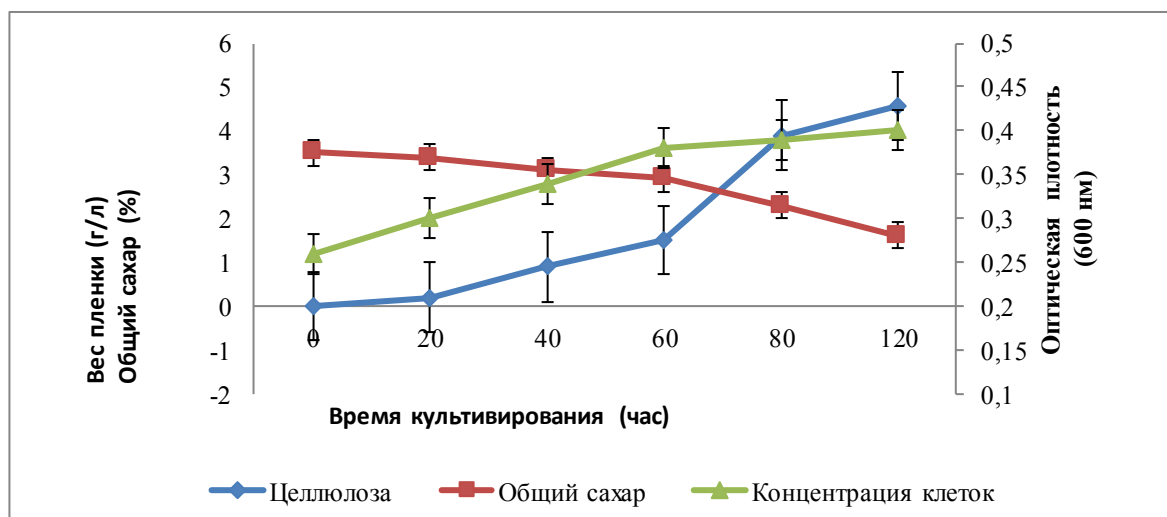


Рисунок 3 – Динамика синтеза целлюлозы штаммом C-3

Этот штамм был использован в дальнейших исследованиях, для чего была необходима его видовая идентификация. Согласно общепринятым правилам, штамм был охарактеризован по морфолого-культуральным и физиолого-биохимическим признакам (таблица 1).

Такие свойства характерны для двух видов: *Gluconoacetobacter hansenii* и *Gluconoacetobacter xylinus*, которые в настоящее время были переклассифицированы в род *Komagataeibacter* (Ross 1991: 35-58). Для точной видовой иден-

тификации продуцента определяли нуклеотидную последовательность, принятых для про-карриот переменных участков 16s рРНК. Тем более, что оценка этой последовательности молекулярно-генетическими методами показывает не только принадлежность к виду, но также и чистоту выделенной культуры. Скрининг последовательности 16s рРНК по базе данных GenBank показал, что исследуемый штамм гомологичен на 99% виду *Komagataeibacter xylinus* (таблица 2).

Таблица 1 – Морфологические и физиолого-биохимические характеристики штамма С-3

1. Признак	2. Результат
3. Принадлежность к грам-группе	4. отрицательный
5. Морфология клеток	6. палочковидная, по одной, попарно, скопления неправильной формы
7. Размеры (µм)	8. 1,5-2,5 x 0,5-1,0
9. Отношение к кислороду	10. облигатный аэроб
11. Подвижность	12. перитрих
13. Температура оптимального роста, °С	14. 25-30
15. Каталаза	положительный
16. Оксидаза	17. отрицательный
18. Рост без уксусной кислоты	19. положительный
20. Рост на источниках углерода: D-глюкоза, этанол, глицерин, D-фруктоза, сахароза, D-маннитол, Na-ацетат	21. положительный
22. Рост в присутствии 3% этанола и 10% уксусной кислоты	23. отсутствует
24. Рост в присутствии 10% этанола	25. отсутствует
26. Окисление этанола до уксусной кислоты	27. положительный

Таблица 2 – Результаты генотипирования штамма С-3

Последовательность	Результаты идентификация в BLAST		
	Accession # GeneBank	Наименование штамма	% идентичности
1	2	3	4
GCAAGTCGCACGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTACGCTAGGGATCTGTCCATGGGTGGGGGATAACTTTGGGAAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGGCCTACCAAGGCGATGATTGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTTCGGGAGGCGGCAGTGGGGATATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTTCGGATTGTAAGCACTTTCAGCGGGGACGATGATGACGGTACCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCGGGGGCTGCATTTGATACGTGATGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATCCCFGT	KU598766	<i>Komagataei-bacter xylinus</i>	99

Продуктивность бактерий, главным образом, зависит от состава питательной среды и условий их выращивания. Оптимальный выбор питательных сред и условий для культивирования важен и для бактерий, образующих целлюлозу, поскольку клеточный рост влияет на стимулирование продуцирования этого полимера. Один из наиболее важных факторов, влияющих на выход, продуктивность и скорость синтеза БЦ – источник угле-

рода. Они синтезируют ее из глюкозы, поэтому этот сахар и используется в среде HS (Saibuatong 2010:455-460). Однако, в целом ряде работ приводится информация о влиянии и других источников углерода на биосинтез БЦ. Например, их авторы использовали помимо глюкозы, сахарозу, фруктозу, галактозу, манит и глицерин. Анализ этих источников показал, что наиболее высокий выход БЦ обеспечивает сахароза, затем в поряд-

ке убывания следуют глицерин, манит, глюкоза и фруктоза. Галактоза определена как наименее подходящий источник углерода. Полученные результаты авторы объяснили способностью бактерий образовывать глюкозу из разных источников углерода, так как любой субстрат первоначально должен быть конвертирован в глюкозу и только после этого глюкоза превращена в целлюлозу (Вае 2004:1366-1371; Czaja 2004:403-411; Bodin 2007:425-434).

При использовании маннита, фруктозы или глюкозы наблюдаются сходные скорости образования целлюлозы, обеспечиваемые эффективным транспортом этих сахаров через клеточную мембрану (маннит преобразуется сначала во фруктозу). Мембранный транспорт галактозы проходит неэффективно, поэтому и превращение галактозы в целлюлозу проходило с низким выходом (Chawla 2009:107-124).

Несмотря на то, что глюкоза в среде HS служит мономером в образовании БЦ и наиболее широко применяется в качестве источника углерода для культивирования целлюлозосинтезирующих штаммов, ее использование достаточно проблематично, так как параллельно с БЦ может накапливаться вторичный продукт – глюконовая кислота (Mikkelsen 2009:576-583). Глюконовая кислота снижает уровень pH питательной среды, вследствие чего уменьшается выход целевого продукта. Из этого следует, что концентрация глюкозы – очень важный параметр.

В связи с этим, подбирали оптимальную концентрацию глюкозы в среде HS, обеспечивающую максимальный выход БЦ, образуемой штаммом *Komagataeibacter xylinus* C-3. Верхний уровень концентрации глюкозы в среде составлял 3,5%, нижний уровень – 0,5%, шаг варьирования – 0,5% (Рисунок 4).

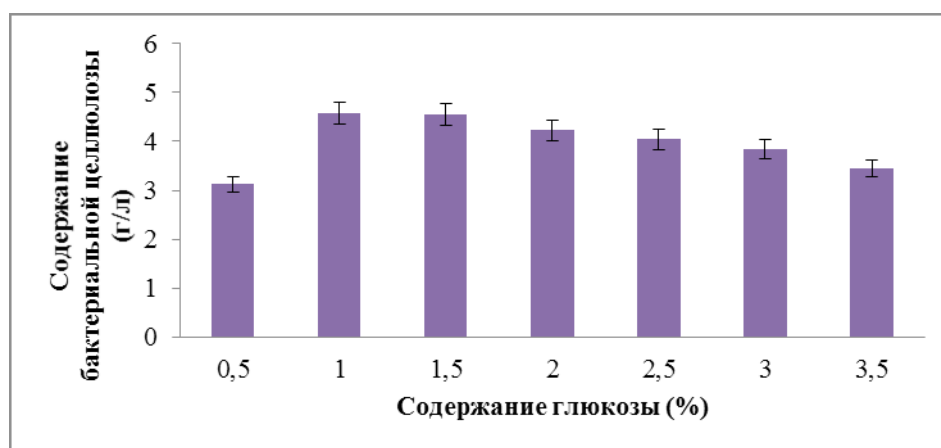


Рисунок 4 – Влияние концентрации глюкозы на продуктивность штамма *Komagataeibacter xylinus* C-3

Было установлено, что выход БЦ уменьшается с увеличением начальной концентрации глюкозы в питательной среде, что можно объяснить увеличением концентрации глюконовой кислоты в процессе культивирования. Вероятно, при высоких концентрациях глюкоза не используется для синтеза целлюлозы, а метаболизируется в глюконовую кислоту. К такому выводу приходят и другие авторы (Mikkelsen 2009:576-583). Судя по полученным данным, максимальный выход БЦ – при концентрации глюкозы 1%, минимальный выход – 3% и 3,5% (Рисунок 5).

Введение в ферментационную среду различных добавок, таких как дрожжевой экстракт, ко-

совое молоко, меласса, пивное сусло позволяют увеличить выход БЦ (Ramana 2000:245-248). Поскольку в Казахстане и в г. Алматы в частности, имеется много пивзаводов, решено было использовать такую добавку, как пивное сусло. Максимальная концентрация – 0,2%, минимальная – 0,1%, шаг варьирования 0,05%.

Есть данные, что положительную роль для производства БЦ играет добавление в питательную среду этанола (Son 2001:1-5; Naritomi 1998:598-603). Этанол подавляет спонтанные мутации целлюлозосинтезирующих бактерий, снижающие их продуктивность. Кроме того, этанол может использоваться как дополнительный источник углерода. Поэтому этиловый спирт ис-

пользовали в качестве третьего фактора для оптимизации питательной среды, верхний уровень концентрации которого составлял 1,0%, нижний

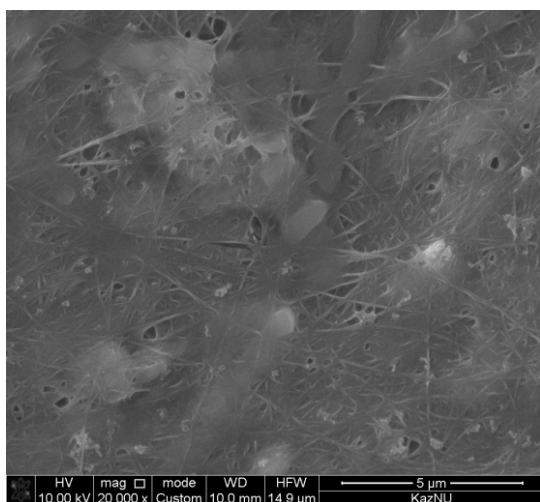
уровень – 0,5%, шаг варьирования – 0,25 %. Критерий оценки оптимизации питательной среды – урожай БЦ (Таблица 3).

Таблица 3 – Продуктивность синтеза БЦ (г/л) штаммом С-3 на среде с добавлением пивного сусла и этанола

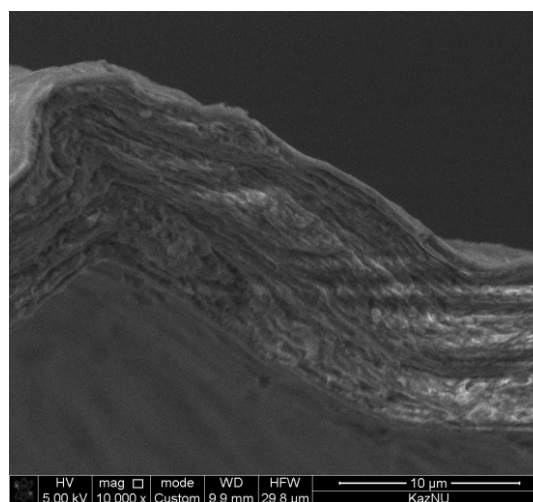
Пивное сусло (%)	Спирт (%)		
	0,5	0,75	1
0,1	7,11 ±0,04	4,95 ±0,05	4,13 ±0,02
0,15	5,12 ±0,02	3,87 ±0,07	4,56 ±0,04
0,2	3,45 ±0,09	3,50 ±0,01	3,13 ±0,05

Максимальный выход БЦ – 7,11 г/л достигался при культивировании продуцента на среде HS, с 0,5%-ной концентрацией спирта и добавлением пивного сусла в количестве 0,1%. Эти концентрации дополнительных компонентов среды благоприятно воздействуют на синтез целлюлозы исследуемым штаммом *Komagataeibacter xylinus* С-3, при которой отмечена высокая продуктивность полимера.

Структурные свойства, а именно морфологию поверхности гелевой пленки БЦ, диаметр и расположение микрофибрилл полимера относительно друг друга исследовали на растровом сканирующем электронном микроскопе. На рисунке 5 представлены электронные микрофотографии дегидратированной пленки БЦ. Видно, что она состоит из многочисленных микрофибрилл, без заметных агрегатов.



А



Б

Рисунок 5 – СЭМ изображения пленок БЦ
(А: морфология поверхности; Б: морфология поперечного среза)

Для определения среднего и наиболее часто встречающегося диаметра микрофибрилл проводили статистическую обработку результатов. В расчете использовали выборку данных, включающую 1000 измерений (Рисунок 6).

Толщина единичного волокна находится в пределах 10-55 нм, что в 100 раз тоньше микрофибрилл растительной целлюлозы. Средний диаметр наночастиц БЦ составил около 30±5 нм (Рисунок 6).

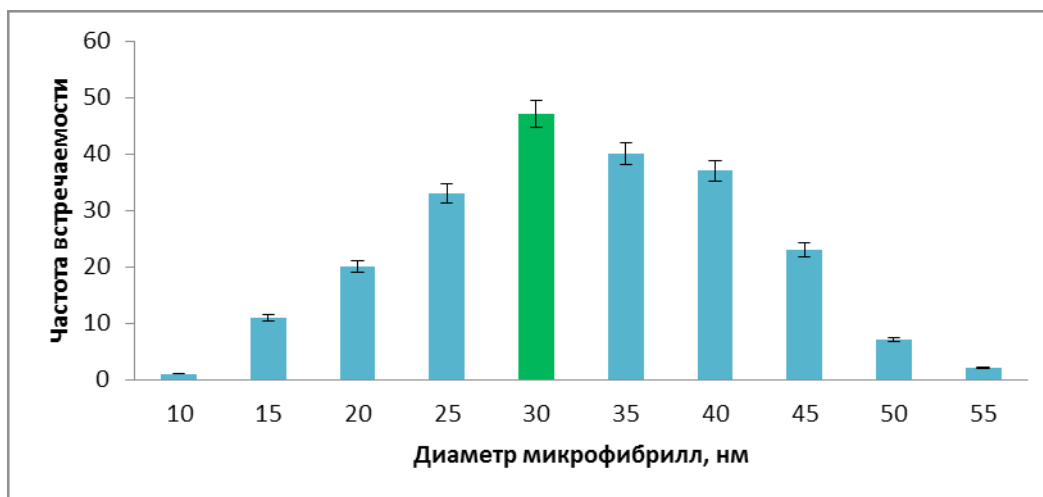


Рисунок 6 – Распределение значений диаметра микрофибрилл БЦ

Микрофибриллы соединяются в лентовидные волокна толщиной в одну миллионную сантиметра. Кроме того, очевидно наличие равномерного по плотности распространения волокон каркаса, что обеспечивает высокую прочность пленок. За счет правильного расположения волокон степень кристалличности пленок достигает более 60%, и чтобы их разорвать, нужно приложить силу до нескольких килограммов на квадратный миллиметр. Механическая прочность материала, представленная в таблице 4, является важным показателем качества полимерных материалов.

Таблица 4 – Механические свойства бактериальной целлюлозы, синтезируемой штаммом *Komagateibacter xylinus* C-3

Показатели	Предел прочности на разрыв (МПа)	17,01±0,5
	Относительное удлинение (%)	8,01±0,7
	Модуль Юнга (МПа)	33,02±1,1

Прочность на разрыв полученных образцов пленок бактериальной целлюлозы составляет 17,01±0,5 МПа. Такой показатель прочности связан с высокой степенью кристалличности БЦ, обеспечивающей устойчивость к высокому давлению (Backdahl 2006:2141-2149). Относительное удлинение БЦ, влияющее на пластичность

материала, составило 8,01±0,7 %. Модуль Юнга (коэффициент пропорциональности между напряжением и деформацией) для БЦ составляет 33,02±1,1 МПа. Этот показатель является достаточно высоким по сравнению со значениями модуля Юнга многих плоско ориентированных слоев органических полимеров (Nge 2010:349-363).

Поверхность пленки БЦ имеют ровную и гладкую поверхность (Рисунок 7). При достаточном увлажнении такие пленки будут сниматься с раны легко, не травмируя «свежий» эпителий.

Одной из основных задач, требующих решения на ранних стадиях раневого процесса, является сорбция раневого содержимого, включающего продукты микробного и тканевого распада (Lin 2013:349-363). Важным критерием в характеристике каждого сорбента является сорбционная емкость (мощность сорбента), которая определяется способностью поглощать максимальное количество токсинов, бактерий, раневого отделяемого и других веществ (Lin 2013:349-363). Чем выше сорбционная емкость, тем большие количества вещества способен поглотить и удержать конкретный сорбент. Адсорбционные свойства БЦ определяли путем взвешивания предварительно отжатых от жидкости пленок до и после помещения в адсорбат. Для установления времени насыщения БЦ была определена кинетика сорбции дистиллированной воды и раневого экссудата. Результаты исследования приведены на рисунке 8.

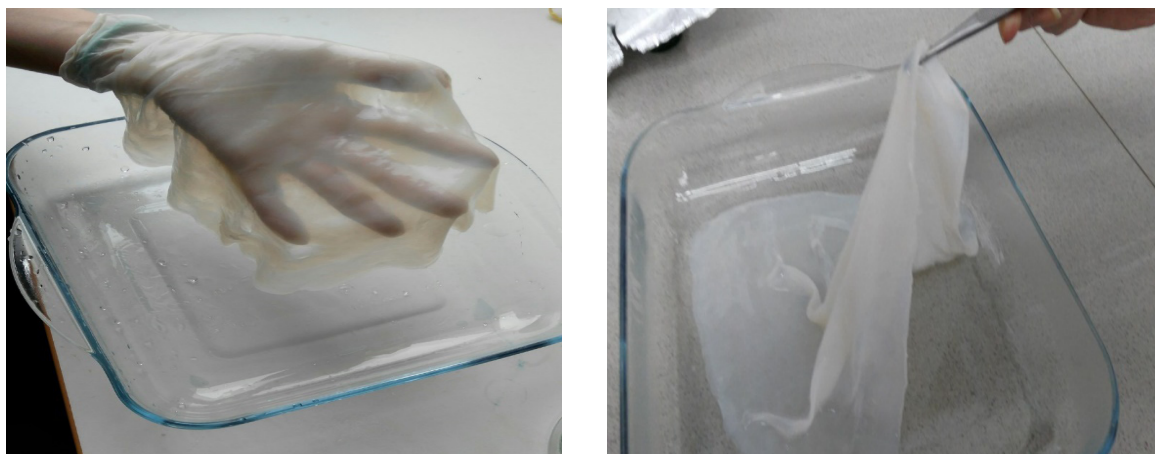


Рисунок 7 – Внешний вид пленок БЦ, образуемых *Komagataeibacter xylinus* C-3

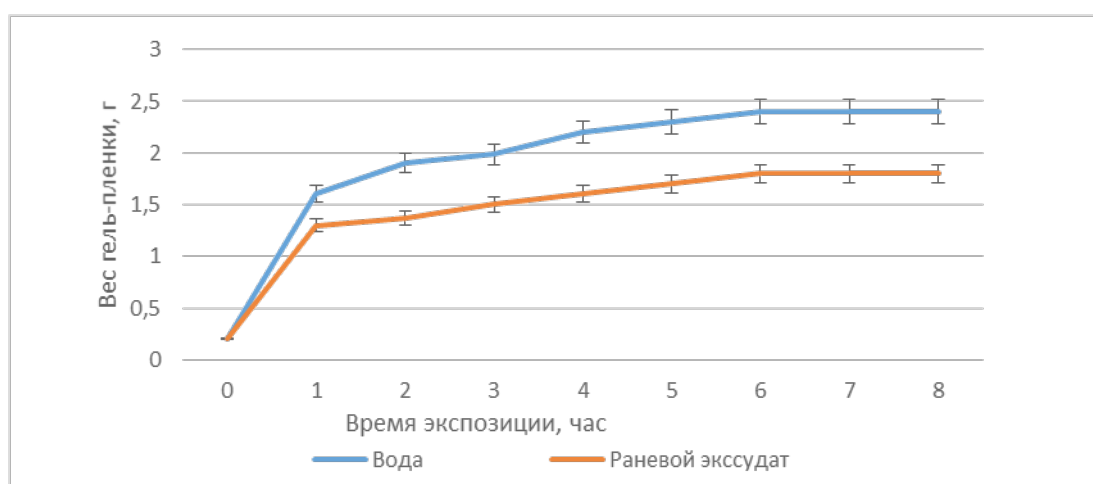


Рисунок 8 – Кинетика сорбции воды и раневого экссудата дегидратированными пленками БЦ

Количество адсорбата вычисляли как разность масс пропитанной водой или экссудатом пленки до адсорбции. Соотношение твердой (БЦ) и жидкой фаз (вода, раневой экссудат) было равным 1:11 и 1:8, соответственно. Это свидетельствует об отличной сорбционной активности полученного материала. Такая высокая сорбционная емкость обусловлена наличием пористой структуры, обладающей активной поверхностью. Микрофибриллярные ленты в архитектуре нано-гель-пленки БЦ позволяют удерживать огромное количество воды, сохраняя при этом высокую собственную прочность на разрыв (17,01±0,5 МПа). Экспериментальные данные для обеих жидкостей показали, что процесс практически заканчивается в течение 6 часов. Это означает, что патологическое отделяемое из раны может максимально сорбироваться на таком типе пленок в течение 6 часов, что

определяет сроки перевязок. Высокая адсорбционная способность трансдермальной системы на основе БЦ будет способствовать эффективному ранозаживлению.

Заключение

Выделен новый продуцент бактериальной целлюлозы. По совокупности морфологических, культуральных, физиологических свойств и молекулярно-генетического анализа установлена его принадлежность к виду *Komagataeibacter xylinus*. Новый штамм по уровню продуктивности превосходит коллекционные штаммы *Gluconoacetobacter xylinus* B-11240 и *Gluconoacetobacter hansenii* B-6756, рекомендованные для промышленного получения целлюлозы. Штамм *Komagataeibacter xylinus* C-3 размещен в Gen Bank под номером KU598766.

Подобрана оптимальная питательная, культивирование на которой обеспечивает максимальную продуктивность штамма – 7,11 г/л. Согласно электронно-микроскопическим данным, микрофибрильные агрегаты занимают незначительную часть объема геля-пленки, но образуют пористую структуру, что позволит вводить в них

самые разнообразные системы и лекарственные препараты. Таким образом, бактериальная целлюлоза, синтезируемая штаммом *Komagateibacter xylinus* С-3, может быть основой для получения сверхпрочных наноконпозиционных материалов в биомедицинских и других смежных областях.

Литература

- 1 Andrade F.K., Moreira S.M., Domingues L., Gama F.M. Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92. – 2010. – P. 9-17.
- 2 Backdahl H., Helenius G., Bodin A., Nannmark U., Johansson B. R., Risberg B., Gatenholm P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interaction with smooth muscle cells // *Biomaterials*, 27. – 2006. – P. 2141-2149.
- 3 Bae S., Shoda M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium // *Biotechnology Progress*, 20. – 2004. – P. 1366-1371.
- 4 Bodin A., Backdahl H., Fink H., Gustafsson L., Risberg B., Gatenholm P. Influence of cultivation conditions on mechanical and morphological properties of bacterial cellulose tubes // *Biotechnol Bioeng*, 97. – 2007. – P. 425-434.
- 5 Cai Z., Kim J. Bacterial cellulose/poly (ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility // *Cellulose*, 17. – 2010. – P. 83-91.
- 6 Chawla P.R., Bajaj I.B., Survase A.S., Singhal R.S. Microbial cellulose: fermentative production and application // *Food Technol Biotechnol*, 47. – 2009. – P. 107-124.
- 7 Clarridge III J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases // *Clinical Microbiology Reviews*, 17. – 2004. – P. 840-862.
- 8 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45. – 1995. – P. 595-599.
- 9 Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown R. J. Microbial cellulose – the natural power to heal wounds // *Biomaterials*, 27. – 2006. – P. 145-151.
- 10 Czaja W., Romanovicz D., Brown R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture // *Cellulose*, 11. – 2004. – P. 403-411.
- 11 Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki M., Brown R.M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications // *Biomacromolecules*, 8. – 2007. – P. 1-12.
- 12 Dahman Y., Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9. – 2009. – P. 5105-5122.
- 13 Guzun A.S., Stroescu M., Jinga S.I., Voicu G., Grumezescu A.M., Holban A.M. Plackett-Burman experimental design for bacterial cellulose-silica composites synthesis // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 42. – 2014. – P. 280.
- 14 Jeong S.I., Lee S.E., Yang H., Jin Y.H., Park C.S., Park Y.S. Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals // *Molecular & Cellular Toxicology*, 6. – 2010. – P. 373-380.
- 15 Klemm D., Heublein B., Fink H.P., Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material // *J Angew Chem Int Ed*, 44. – 2005. – P. 3358-3393.
- 16 Laçin N.T. Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing // *Int J Biol Macromol.*, 67. – 2014. – P. 22-27.
- 17 Lin W.C., Lien C.C., Yeh H.J., Yu C.M., Hsu S.H. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications // *Carbohydr Polym*, 94. – 2013. – P. 603-611.
- 18 Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66. – 2002. – P. 506.
- 19 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 // *J Appl Microbiol*, 107. – 2009. – P. 576-583.
- 20 Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / G.L. Miller // *Anal. Chem.* – 1959. – Vol. 31. – P. 426-429.
- 21 Naritomi T., Kouda T., Yano H., Yoshinaga F. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture // *J Ferment Bioeng*, 85. – 1998. – P. 598-603.
- 22 Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н. и др. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. (ред. Нетрусов А.И.). – М.: Академия. – 2005. – С. 608.
- 23 Nge T. T., Nogi M., Yano H., Sugiyama J. Microstructure and mechanical properties of bacterial cellulose/chitosan porous scaffold // *Cellulose*, 17. – 2010. – P. 349-363.
- 24 Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита и др. – М.: Мир, 1997. – Т 1. – С. 800 .
- 25 Pértile R. A., Moreira S., Costa R.M., Correia A., Guardão L., Gartner F., Vilanova M., Gama M. Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies // *J Biomater Sci Polym Ed*, 23. – 2011. – P. 231-236.

- 26 Ramana K.V., Tomar A., Singh L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum* // *World J Microbiol Biotechnol*, 16. – 2000. – P. 245–248.
- 27 Romanov D.P., Baklagina Yu.G., Lukasheva N.V., Khripunov A.K., Kachenko A.A., Lavrentyev V.K., Klechkovskaya V.V., Arkharova N.A., Tolmachev D.A. Investigation of Nanocomposites Based on Hydrated Calcium Phosphates and Cellulose *Acetobacter xylinum* // *Journal Glass Physics and Chemistry*, 34. – 2008. – P. 192–200.
- 28 Ross P., Mayer R., and Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 1991. – vol. 55, no. 1, P. 35-58.
- 29 Ruka R.D., Simon P.G., Dean K., Altering the growth conditions of *Gluconoacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose // *CSIRO Materials Science and Engineering.* – 2015. – P. 1-21.
- 30 Saibuatong O. A., Phisalaphong M. Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis // *Carbohydrate Polymers*, 79. – 2010. – P. 455-460.
- 31 Saska S., Barud H.S., Gaspar A.M.M., Marchetto R., Ribeiro S.J.L, Messaddeq Y. Bacterial cellulose – Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone regeneration // *International journal of biomaterials*, 2. – 2011. – P. 1-7.
- 32 Shah N., Ul-Islam M., Khattak W.A., Park J.K. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material // *Carbohydr. Polym.*, 98. – 2013. – P. 585-598.
- 33 Solway D. R., Clark W. A., Levinson D. J. A parallel open-label trial to evaluate microbial cellulose wound dressing in the treatment of diabetic foot ulcers // *International Wound Journal*, 8. – 2011. – P. 69-73.
- 34 Son H.J., Heo M.S., Kim Y.G., Lee S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp.A9 in shaking cultures // *Biotechnol Appl Biochem*, 33. – 2001. – P. 1–5.
- 35 Yang X.Y., Huang C., Guo H.J., Xiong L., Luo J., Wang B., Lin X.Q., Chen X.F., Chen X.D. Bacterial Cellulose Production from the Litchi Extract by *Gluconoacetobacter Xylinus* // *Prep Biochem Biotechnol*, 32. – 2014. – P. 175-176.

References

- 1 Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I. S., “Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (2002): 506.
- 2 Shah N., Ul-Islam M., Khattak W.A., Park J.K. “Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material”, *Carbohydr. Polym.*, 98 (2013): 585-598.
- 3 Klemm D., Heublein B., Fink H.P., Bohn A., “Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material”, *J Angew Chem Int Ed*, 44 (2005): 3358-3393.
- 4 Guzun A.S., Stroescu M., Jinga S.I., Voicu G., Grumezescu A.M., Holban A.M., “Plackett-Burman experimental design for bacterial cellulose-silica composites synthesis”, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 42 (2014): 280.
- 5 Yang X.Y., Huang C., Guo H.J., Xiong L., Luo J., Wang B., Lin X.Q., Chen X.F., Chen X.D., “Bacterial Cellulose Production from the Litchi Extract by *Gluconoacetobacter Xylinus*”, *Prep Biochem Biotechnol*, 32 (2014): 175-176.
- 6 Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki M., Brown R.M., “The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications”, *Biomacromolecules*, 8 (2007): 1-12.
- 7 Jeong S.I., Lee S.E., Yang H., Jin Y.H., Park C.S., Park Y.S., “Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals”, *Molecular & Cellular Toxicology*, 6 (2010): 373-380.
- 8 Andrade F.K., Moreira S.M., Domingues L., Gama F.M., “Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92A (2010): 9-17.
- 9 Dahman Y., “Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9 (2009): 5105–5122.
- 10 Saska S., Barud H.S., Gaspar A.M.M., Marchetto R., Ribeiro S.J.L, Messaddeq Y., “Bacterial cellulose – Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone regeneration”, *International journal of biomaterials*, 2 (2011): 1-7.
- 11 Laçin N.T., “Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing”, *Int J Biol Macromol.*, 67 (2014): 22-27.
- 12 Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown R. J., “Microbial cellulose – the natural power to heal wounds”, *Biomaterials*, 27 (2006): 145-151.
- 13 Solway D. R., Clark W. A., Levinson D. J., “A parallel open-label trial to evaluate microbial cellulose wound dressing in the treatment of diabetic foot ulcers”, *International Wound Journal*, 8 (2011): 69-73.
- 14 Netrusov A.I., Egorova M.A., Zaharchuk L.M., Kolotilova N.N. et al. (2005) Practicum po microbiologii: uchebnoye posobiye dlya studentov vysshih uchebnyh zavedeniy [Practical works on microbiology: textbook for students of higher educational institutions]. *Academy*, pp. 608.
- 15 J. Hault, N. Krig, P. Smith et al. (1997) *Opredelitel bakteriy Bergi* [Bergi identifier of bacteria]. Mir, vol. 1, pp. 800].
- 16 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C., “Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (1995): 595–599.
- 17 Clarridge III J. E., “Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases”, *Clinical Microbiology Reviews*, 17 (2004): 840–862.
- 18 Cai Z., Kim J., “Bacterial cellulose/poly (ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility”, *Cellulose*, 17 (2010): 83-91.

- 19 Miller G.L., "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Anal. Chem.*, 31 (1959): 426–429.
- 20 Pêrtille R. A., Moreira S., Costa R.M., Correia A., Guardão L., Gartner F., Vilanova M., Gama M., "Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies", *J Biomater Sci Polym Ed*, 23 (2011): 231-236.
- 21 Ruka R.D., Simon P.G., Dean K., "Altering the growth conditions of *Gluconoacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose", *CSIRO Materials Science and Engineering*, (2015): 1-21.
- 22 Romanov D.P., Baklagina Yu.G., Lukashova N.V., Khripunov A.K., Kachenko A.A., Lavrentyev V.K., Klechkovskaya V.V., Arkharova N.A., Tolmachev D.A., "Investigation of Nanocomposites Based on Hydrated Calcium Phosphates and Cellulose *Acetobacter xylinum*", *Journal Glass Physics and Chemistry*, 34 (2008): 192–200.
- 23 Ross P., Mayer R., and Benziman M., "Cellulose biosynthesis and function in bacteria", *Microbiol Mol Biol Rev* 55, no. 1, pp. (1991): 35-58.
- 24 Saibuatong O. A., Phisalaphong M., "Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis", *Carbohydrate Polymers*, 79 (2010): 455-460.
- 25 Bae S., Shoda M., "Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium", *Biotechnology Progress*, 20 (2004): 1366–1371.
- 26 Czaja W., Romanovicz D., Brown R. M., "Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture", *Cellulose*, 11 (2004): 403-411.
- 27 Bodin A., Backdahl H., Fink H., Gustafsson L., Risberg B., Gatenholm P. Influence of cultivation conditions on mechanical and morphological properties of bacterial cellulose tubes. *Biotechnol Bioeng*, 97 (2007):425–434.
- 28 Chawla P.R., Bajaj I.B., Survase A.S., Singhal R.S. Microbial cellulose: fermentative production and application. *Food Technol Biotechnol*, 47 (2009): 107–124.
- 29 Mikkelsen D., Flanagan B.M., Dykes G.A., Gidley M.J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconoacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *J Appl Microbiol*, 107 (2009):576–583.
- 30 Ramana K.V., Tomar A., Singh L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 16 (2000):245–248.
- 31 Son H.J., Heo M.S., Kim Y.G., Lee S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp.A9 in shaking cultures. *Biotechnol Appl Biochem*, 33 (2001):1–5.
- 32 Naritomi T., Kouda T., Yano H., Yoshinaga F. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *J Ferment Bioeng*, 85 (1998):598–603.
- 33 Backdahl H., Helenius G., Bodin A., Nannmark U., Johansson B. R., Risberg B., Gatenholm P., "Mechanical properties of bacterial cellulose and interaction with smooth muscle cells", *Biomaterials*. 27 (2006): 2141-2149.
- 34 Nge T. T., Nogi M., Yano H., Sugiyama J., "Microstructure and mechanical properties of bacterial cellulose/chitosan porous scaffold", *Cellulose*, 17 (2010): 349-363.
- 35 Lin W.C., Lien C.C., Yeh H.J., Yu C.M., Hsu S.H., "Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications", *Carbohydr Polym*, 94 (2013): P. 603-611.