

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій

Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему:

«Розробка технології отримання мікробної целюлози»

Рівень вищої освіти другий (магістерський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

Виконала: студентка групи МгБТ-23

Валова К. О.

Науковий керівник: к.т.н., доц Волошина І.М.

Рецензент: к.б.н., доц Юнгін О.С.

Київ 2024

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія високомолекулярних сполук</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА
« ____ » _____ 2024 р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ
Валовій Катерині Олександрівні**

1. Тема кваліфікаційної роботи: **Розробка технології отримання мікробної целюлози**

Науковий керівник роботи Волошина Ірина Миколаївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «3» вересня 2024 року №188-уч.

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо властивостей бактеріальної целюлози, мікробна асоціація (SCOBY) виділена із чайного гриба, результати дослідів, отримані у лабораторії, матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

3. Зміст кваліфікаційної роботи: вступ, огляд літератури, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки.

4. Дата видачі завдання 03.09.2024 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний терміни виконання	Примітка про виконання
1	Вступ	07.09.2024	
2	Розділ 1 Огляд літератури	09.10.2024	
3	Розділ 2 Методи та матеріали	16.10.2024	
4	Розділ 3 Експериментальна частина	30.10.2024	
5	Висновки	07.11.2024	
6	Оформлення кваліфікаційної роботи (чистовий варіант)	14.11.2024	
7	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для Відгуку (за 14 днів до захисту)	15.11.2024	
8	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 12 днів до захисту)	18.11.2024	
9	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		
10	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент _____ Катерина ВАЛОВА

Науковий керівник роботи _____ Ірина ВОЛОШИНА

АНОТАЦІЯ

Валова К. О. Розробка технології отримання мікробної целюлози. – Рукопис.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2024 рік.

У дипломній роботі аналізується процес розробки технології отримання бактеріальної целюлози за допомогою асоціації мікроорганізмів SCOBY. Досліджується вплив різних джерел вуглецю та азоту на біосинтез бактеріальної целюлози. Результати експериментів продемонстрували, що застосування глюкози, сахарози, а також додавання кукурудзяного борошна, дріжджового екстракту та пептону значно підвищує вихід біоплівки, які характеризуються високими показниками кристалічності та міцності, що робить їх перспективними для медичних застосувань. Для підтвердження структури отриманих біоплівок були використані методи спектроскопії Фур'є.

Ключові слова: бактеріальна целюлоза, мікробна асоціація, SCOBY, біотехнологія, біоплівки, культивування.

ABSTRACT

Valova K. O. Development of a Technology for Producing Microbial Cellulose. – Manuscript.

Qualification work in the specialty 162 – Biotechnology and Bioengineering. – Kyiv National University of Technologies and Design, Kyiv, 2024.

This thesis analyzes the process of developing a technology for producing bacterial cellulose using a SCOBY. The study investigates the impact of different carbon and nitrogen sources on the biosynthesis of bacterial cellulose. The experimental results demonstrate that the use of glucose, sucrose, as well as the addition of corn flour, yeast extract, and peptone significantly enhances the yield of biofilms characterized by high crystallinity and strength, making them promising for medical applications. Fourier spectroscopy methods were used to confirm the structure of the obtained biofilms.

Keywords: *bacterial cellulose, microbial association, SCOBY, biotechnology, biofilms, cultivation.*

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1	10
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	10
1.1 Продуценти бактеріальної целюлози	10
1.2 Біохімічні основи біосинтезу бактеріальної целюлози	13
1.3. Основні параметри для отримання бактеріальної целюлози	15
1.4. Використання бактеріальної целюлози.....	18
1.4.1. Використання бактеріальної целюлози в якості біоплівки	18
1.4.2 Модифікації бактеріальної целюлози.....	19
1.4.3 Використання бактеріальної целюлози в різних галузях промисловості.....	25
1.4.3.1 Застосування в харчовій промисловості	25
1.4.3.2 Застосування в засобах особистої гігієни та побутовій хімії	26
1.4.3.3 Застосування в електричних приладах.....	27
1.4.3.4 Застосування в текстильних матеріалах	27
1.4.3.5 Застосування в біомедицині	28
Висновки до розділу 1.....	29
РОЗДІЛ 2.....	30
МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ.....	30
2.1 Характеристика мікробної асоціації (SCOBY).....	30
2.2 Поживні середовища для культивування мікробної асоціації (SCOBY)	30
2.2.1 Середовище HS (Хестрином и Шраммом)	32
2.2.2 Середовища для отримання біоплівки	32
2.3 Отримання посівного матеріалу	32
2.4 Отримання біоплівки.....	33
2.5 Визначення рівня значення рН.....	33
2.6 Визначення товщини та ваги біоплівки	34
2.7 Аналіз біоплівки за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії	34
2.8 Статистичний аналіз.....	35
Висновки до розділу 2.....	35

	5
РОЗДІЛ 3	37
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	37
3.1 Дослідження впливу вуглецевого субстрату на утворення біоплівок	37
3.2. Дослідження впливу співвідношення C/N на утворення біоплівок	39
Висновки до розділу 3.....	45
ВИСНОВКИ	46
СПИСОК ВИКОРИСТОНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	47
Додатки	52

ВСТУП

Целюлоза - один із найпоширеніших біополімерів на планеті, на частку якого припадає близько 1,5 трильйона тонн загального річного виробництва біомаси. Целюлоза міститься в бавовні, деревині, коноплях та інших рослинних матеріалах і служить основним зміцнювальним елементом структури рослин. Хоча целюлоза є одним з основних компонентів рослин, її біосинтез не обмежується лише рослинами. Відомо, що целюлоза синтезується широким колом бактерій, протистів, грибів і водоростей, і навіть деякими гігантськими вірусами (рід *Pandoravirus*). Багато родів бактерій, що продукують бактеріальну целюлозу (БЦ), мешкають у різних екологічних нішах, включно з фруктовими колонієутворювальними бактеріями (*Comagataeibacter*), ґрунтовими бактеріями (*Burkholderia* і *Pseudomonas*) і патогенними для рослин бактеріями (*Agrobacterium* і *Pseudomonas*). До них належать фітопатогенні бактерії (*Agrobacterium* і *Dickeya*), симбіонти рослин (*Rhizobium* і *Azotobacter*), зоопатогенні бактерії (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella* і *Alcaligenes*) і ґрунтові бактерії з високою метаболічною здатністю.

Бактеріальна целюлоза (БЦ) – це природний полімер з унікальними та цікавими структурними, фізичними та хімічними властивостями. Ці властивості є дуже привабливою відправною точкою для низки нових розробок у галузі інноваційних досліджень і роблять її привабливим кандидатом для широкого спектра застосувань у різних галузях, особливо щодо біомедичних і біотехнологічних застосувань.

Порівняно з властивостями рослинної целюлози, бактеріальна целюлоза (БЦ) володіє такими чудовими властивостями, як висока чистота, висока водоутримувальна здатність і біосумісність. Однак низький вихід продукту і тривалий час інкубації є основними проблемами при великомасштабному виробництві БЦ. Протягом десятиліть ведуться дослідження з оптимізації виробництва целюлози шляхом зміни методів і умов культивування. У відповідь на зростаючий попит на целюлозу дослідники зараз вивчають можливості поліпшення виробництва і функціональності целюлози в різних категоріях - на

генетичному, біопроектному і продуктовому рівнях – з використанням модельного підходу для кожної з цих категорій.

Актуальність теми. Бактеріальна целюлоза (БЦ) є новаторським біоматеріалом, що володіє унікальними фізико-хімічними характеристиками, такими як висока міцність, еластичність та здатність утримувати вологу. Це робить її перспективною для використання в медицині, зокрема як основу для перев'язувальних матеріалів. Зниження витрат на вирощування БЦ шляхом вибору оптимальних умов культивування є важливим етапом у її комерційному виробництві.

Наукова новизна даної роботи полягає в дослідженні впливу різних комбінацій вуглецевих і азотних джерел (глюкоза, сахароза, кукурудзяне борошно, дріжджовий екстракт і пептон) на вихід та характеристики мікробної целюлози, отриманої за допомогою SCOBY. Інноваційність дослідження також полягає в застосуванні чорного чаю як економічно вигідного основного компонента середовища для культивування, що дозволяє оптимізувати процес і зменшити його вартість.

Метою роботи є створити ефективну технологію виробництва мікробної целюлози для медичних цілей шляхом оптимізації складу живильного середовища та умов вирощування.

Об'єктом дослідження цієї роботи є мікробна асоціація (SCOBY), виділена з комбучі.

Предметом дослідження є біосинтез бактеріальної целюлози на різних поживних середовищах з використанням різних джерел вуглецю та азоту. Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Дослідити вплив різних джерел вуглецю (глюкоза, сахароза, їх суміші) на вихід мікробної целюлози.
2. Вивчити, як додаткові джерела азоту (кукурудзяне борошно, дріжджовий екстракт, пептон) впливають на характеристики біоплівки.
3. Провести порівняльний аналіз фізико-хімічних властивостей біоплівки, отриманих на різних субстратах.

4. Оптимізувати склад середовища для досягнення максимальної ефективності у виробництві мікробної целюлози.

5. Здійснити аналіз отриманих біоплівки за допомогою інфрачервоної спектроскопії для підтвердження їхньої структури.

Методи дослідження: мікробіологічні, біотехнологічні, фізико-хімічні, біохімічні методи, аналіз та узагальнення результатів.

Отримані результати мають важливе **практичне значення** для вдосконалення технології виробництва бактеріальної целюлози. Визначення оптимальних джерел вуглецю та азоту, а також їх співвідношення в середовищі для культивування, дозволяє підвищити ефективність процесу і зменшити виробничі витрати. Це сприятиме більш широкому використанню бактеріальної целюлози як біоматеріалу в медицині, харчовій промисловості, косметології та екологічному пакуванні.

Публікації. Результати досліджень опубліковано в збірнику матеріалів науково-практичної міжнародної конференції та розділу наукової монографії Збірнику матеріалів VI-го студентського сателітного регіонального симпозіумі Міжнародного Електрохімічного Товариства.

1. **Валова К.О.**, Федько М.М., Волошина І.М. Перспективи бактеріальної целюлози // «Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині»: матеріали III науково-практичної міжнародної дистанційної конференції (м. Харків, 22 березня 2024 р., м. Харків) / – Х.: НФаУ, 2024. – С. 95-96 (додаток А), сертифікати (додаток Б, В).

2. Волошина І.М., Федько М.М., **Валова К.**, Шкотова Л.В. Біосинтез бактеріальної целюлози для отримання матеріалів медичного призначення. Публікація статті у Збірнику матеріалів VI-го студентського сателітного регіонального симпозіумі Міжнародного Електрохімічного Товариства (ISE) «Перспективні матеріали та процеси в прикладній електрохімії», (22 травня 2024 року, м. Київ) (друк). (додаток Г).

Структура і обсяг кваліфікаційної роботи. Основна частина кваліфікаційної науково-дослідницької роботи викладена на 51 сторінці, і

включає три основні розділи та висновки. В роботі представлено список використаних джерел, що налічує 37 найменування публікацій зарубіжних дослідників. В роботі представлено чотири додатки, що представляють виконання індивідуального плану магістра, представлені на 11 сторінках.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Продуценти бактеріальної целюлози

Різні види бактерій можуть виробляти целюлозу за допомогою біосинтезу, який включає секрецію полісахаридів, що утворюються з джерел вуглецю, наявних у культуральному середовищі, або з внутрішніх джерел [8, 16].

Досі відомими продуцентами целюлози є різні роди грамнегативних бактерій, таких як *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Salmonella*, *Azotobacter* і *Rhizobium*, а також грампозитивна бактерія *Sarcina ventriculi*. Серед усього перерахованого вище *Komagataeibacter* (раніше відомий як *Acetobacter* і *Gluconacetobacter*) *xylinus* (*K. xylinus*) широко використовувався як модельний організм для виробництва БЦ. Це пов'язано з тим, що *K. xylinus* є непатогенною бактерією і була успішно використана для розширення виробництва БЦ до комерційного рівня. Ефективність *G. xylinus* у виробленні БЦ надзвичайно висока. Одна бактерія *G. xylinus* дозволяє полімеризувати 200 000 молекул глюкози в ланцюги β -1,4 глюкану і тим часом організовувати полімерні ланцюги в нановолокна [7]. Завдяки високому врожаю *G. xylinus* був використаний як модельний мікроорганізм для вивчення механізму синтезу БЦ та як промислові штами для комерційної ферментації. Тому, намагаючись отримати поглиблене розуміння шляху біосинтезу целюлози та його регуляції, переважно досліджували *G. xylinus*. Під час біосинтезу БЦ нанофібрили целюлози виділяються клітинами як екзополісахариди на поверхню рідини та повітря [16, 23].

Gluconacetobacter xylinus

БЦ є висококристалічним лінійним біополімером глюкози, який виробляється з шириною менше 100 нм переважно бактерією *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*) як у синтетичних, так і в несинтетичних середовищах шляхом окислювальної ферментації. Цей нефотосинтетичний організм може отримувати цукор, гліцерин, глюкозу та деякі інші органічні матеріали, перш ніж перетворити їх на чисту целюлозу. Дуже небагато видів бактерій здатні

виробляти целюлозу. Однак грамнегативні бактерії *G. xylinus* виділяють велику кількість целюлози у вигляді мікрофібрил із ряду синтетичних ділянок уздовж поздовжньої осі клітини. Ця аеробна грамнегативна бактерія ефективно ферментується при рН 3–7 і в діапазоні температур 25–30 °С, використовуючи сахариди як джерело вуглецю. Чудові фізико-хімічні властивості БЦ є в основному результатом його мікрофібрилярної структури, наприклад чудової міцності на розрив, високого ступеня полімеризації та кристалічності. Мікрофібрили з кожного синтетичного місця збираються, утворюючи велику стрічку целюлози в середовищі росту. Утворені стрічки та пов'язані з ними клітини переплітаються, утворюючи плаваючу плівку, що дозволяє цій стабільній і суто аеробній бактерії розвиватися під високим тиском кисню, який знаходиться на поверхні середовища для росту. Хоча виробництво БЦ в основному вивчалось в *G. xylinus*, деякі мікроорганізми, такі як інші види *Agrobacterium tumefaciens*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium* spp., і грампозитивні *Sarcina ventriculli*, також демонструють здатність продукувати цей біополімер [17].

Agrobacterium tumefaciens

Збудник рослин *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) є вільноживучим ґрунтовим організмом, який легко виділити та вирощувати в лабораторії. Метаболізм глюкози цим грамнегативним облігатним аеробом включає шлях Ентнера-Дудорова (55%) і пентозний цикл (44%). Культури цього організму синтезують целюлозу з широкого розмаїття субстратів. Синтез целюлози в *A. tumefaciens*, мабуть, є конститутивною ознакою роду, тому що клітини синтезують целюлозу під час росту за відсутності рослинних клітин, а клітини в стані спокою зберігають високу здатність до синтезу целюлози. Цей синтез целюлози є внутрішньою властивістю *A. tumefaciens*, яка підтверджується здатністю спочиваючих клітин виробляти целюлозу та на генетичній основі [17].

***Rhizobium* spp.**

Коріння бобових рослин пов'язані з бактеріальними бульбочками в, можливо, одному з найважливіших симбіотичних відносин біосфери.

Атмосферні азотфіксуючі ризобії зустрічаються як вільноживучі, так і колонізаційні бактерії, які, як правило, виявляють високий ступінь специфічності для свого рослинного господаря. Величезна кількість енергії, необхідної для фіксації азоту, проявляється в катаболічних послідовностях цієї аеробної грамнегативної бактерії. Хоча штами, що швидко ростуть, здатні рости на різноманітних вуглецевих субстратах, більш обмежені, повільно зростаючі штами виявляють велику харчову різноманітність щодо ароматичних субстратів. Хоча всі штами використовують шлях Ентнера-Дудороффа та цикл Кребса, пентозофосфатний шлях обмежений штамми, що швидко ростуть.

Синтез целюлози є внутрішньою властивістю штамів *Rhizobium*. Клітини виробляють фібрили целюлози як позаклітинний продукт під час росту за відсутності рослинних клітин. Утворення фібрил сильно залежить від фази росту. Фібрили целюлози, що утворюються *Rhizobium leguminosarum* (від 1 до 10 на клітину), мають діаметр від 5 до 6 нм і довжину до 10 мкм. При культивуванні в стоячих культурах утворюється поверхнева плівка [17].

Sarcina ventriculi

Sarcina ventriculi є грампозитивною, облігатною анаеробною ґрунтовою бактерією, яка здатна рости на цукрах у надзвичайно широкому діапазоні рН (від 2 до 10). Целюлоза, яку виробляє *S. ventriculi*, накопичується поза клітиною. Целюлоза *S. ventriculi* залишається тісно пов'язаною з клітинною стінкою та виконує структурну функцію щільного зв'язування клітин у великі пакети. У клітинних стінках *S. ventriculi* целюлоза не відкладається. Видалення целюлози з пакетів реактивом Кросса і Бевана не впливає на клітинні стінки. Клітини, з яких видалено цементуючий матеріал, все ще мають неушкоджені клітинні стінки, але більше не поглинають целюлозну пляму. У невеликих агрегатах клітин, отриманих при обробці великих пакетів реактивом Кросса і Бевана, решта целюлози, швидше за все, щільно стиснута сусідніми клітинами, в результаті чого розчинник не може ефективно діяти на неї [17].

1.2 Біохімічні основи біосинтезу бактеріальної целюлози

Біосинтез БЦ, полімеризація та транслокація мікрофібрил здійснюються добре контрольованим мембранно-асоційованим мультибілковим комплексом. Багатобілковий комплекс складається з окремих ферментів, каталітичних субодиниць і регуляторних білків. Біосинтез БЦ служить різним цілям для мікроорганізму, таким як захист фізіологічної, механічної та хімічної стабільності, посилення взаємодії та дифузії поживних речовин. БЦ утворюється шляхом біохімічного процесу шляхом окисного бродіння як у несинтетичних, так і в синтетичних середовищах, під контролем специфічних ферментів. Виробництво починається в мікробних клітинах, цитоплазмі, з синтезу β -1,4-глюканових ланцюгів. Ці ланцюги кристалізуються та утворюють мікрофібрили, які пізніше утворюють маленькі плівки, які потім утворюють мембрану

Найновіша запропонована модель біосинтезу БЦ складається з послідовних біохімічних реакцій, добре організованих чотирма ключовими ферментативними біокаталізаторами, які включають: 1) глюкокіназу, яка каталізує фосфорилування глюкози до глюкози-6-Р, 2) фосфоглюкомутазу, яка каталізує ізомеризацію глюкозо-6-Р до глюкозо-1-Р, 3) UDPG пірофосфорилаза (UGPase), яка синтезує UDP-глюкозу (UDPGlc), і 4) целюлозосинтазний комплекс (BcsA, BcsB, BcsC і BcsD), який зв'язує два UDPGlc мономерів під час полімеризації [3, 23, 27].

UDPGlc є звичайною молекулою в багатьох організмах, яка, однак, є прямим попередником целюлози; не багато з цих організмів є продуцентами целюлози. UGPase приблизно в 100 разів активніший у продуцентах целюлози, ніж у нецелюлозних бактерій, тому вважається, що вона відіграє важливу роль у синтезі целюлози [17].

Циклічна дигуанілова кислота (c-di-GMP) також відіграє важливу роль у синтезі БЦ як алостеричного активатора целюлозосинтази. BcsA є мембранним білком з доменом глікозилтрансферази та доменом PilZ. c-di-GMP зв'язується з доменом PilZ субодиниці BcsA целюлозосинтази *G. xylinus*. Дослідження

показали, що біосинтез целюлози в *G. xylinus* та інших целюлозосинтезуючих бактеріях насправді сприяв підвищеному рівню c-di-GMP.

Окрім ферментативних етапів, структурна збірка целюлозних волокон має два проміжні етапи. Перший етап біосинтезу БЦ являє собою полімеризацію одиниць УДФ-глюкози шляхом утворення ланцюгів β -1,4-глюкану у внутрішній мембрані. Після цього етапу відбувається секреція полімеру та збірка фібрил. Фібрили утворюються між зовнішньою і цитоплазматичною мембранами клітини. Ланцюги β -1,4-глюкану обертаються через експортні компоненти целюлози з утворенням протофібрил, які мають діаметр приблизно 2–4 нм. Мікрофібрила у формі стрічки приблизно 80 нм збирається з цих протофібрил, а потім відбувається кристалізація та збірка фібрил.

Основний механізм біосинтезу целюлози каталізується опероном синтази целюлози (*bcs*), який оточений допоміжними генами (*сmсАх*, *ссрАх* і *bglАх*). *BcsA* є інтегральним білком внутрішньої мембрани з трансмембранними (ТМ) доменами. *BcsB* є периплазматичним білком, приєднаним до *BcsA*, і містить домени зв'язування вуглеводів, які супроводжують синтезований глюкановий ланцюг через периплазму. Целюлозні нановолокна синтезуються спільною дією *BcsA* (каталітичної субодиниці) і *BcsB* з використанням UDP-глюкози як субстрату. Потім волокна секретуються через пори зовнішньої мембрани, утворені *BcsC*, що демонструє подібність до білків, залучених до мембранних каналів або утворення пор. *BcsD*, здається, є несуттєвим геном для біосинтезу БЦ; однак без нього виробництво целюлози знижується на 90%. *BcsD*, здається, допомагає в правильній орієнтації лінійних кінцевих комплексів уздовж поздовжньої осі клітини, вказуючи на те, що *BcsD* бере участь у кінцевому рівні ієрархічної збірки целюлози [3, 18].

Численні допоміжні гени беруть участь у регуляції, синтезі, кристалізації та експорті БЦ. Білки *СсрАх*, *СmсАх* і *ВlгАх*, що фланкують оперон *bcs*, не є важливими для біосинтезу БЦ, але вони беруть участь у формуванні правильного глюканового ланцюга. *СсрАх* кодує білок, що доповнює целюлозу, *сmсАх* і *bglАх* кодують ендо- β -1,4-глюканазу і β -глюкозидазу, відповідно, обидва

з яких сприяють біосинтезу целюлози шляхом гідролізу плутаного глюкану ланцюгів, якщо сталася несправність ланцюга. Було висунуто гіпотезу, що CsrA бере участь у структурній організації термінальних комплексів, співпрацюючи з BcsD. Крім того, Ремлінг і Гальперін запропонували модель організації всього комплексу синтази БЦ на основі даних про кристалічну структуру комплексу BcsA-BcsB *Rhodobacter sphaeroides*, BcsC-подібного білкового комплексу AlgK-AlgE *синьогнійної палички* та білка BcsD *G. xylinus* [3, 12, 18, 24].

1.3. Основні параметри для отримання бактеріальної целюлози

Виробництво БЦ зазвичай досягається в середовищі бродіння, збагаченому головним чином С і N, або при перемішуванні, або в статиці, або в біореакторі. Джерела вуглецю та азоту, а також солі сірки, фосфору, магнію і калію, необхідні для розвитку мікробів, повинні бути присутніми в середовищі бродіння принаймні в мінімальних кількостях [7, 21, 22].

Співвідношення вуглецю (C) до азоту (N) є важливим чинником для ефективного синтезу бактеріальної целюлози (БЦ). Це співвідношення визначає баланс поживних речовин, необхідних для розвитку бактерій, які часто використовуються у виробництві БЦ. Вуглець виконує роль основного джерела енергії та структурного елемента, тоді як азот потрібен для синтезу білків, ферментів і нуклеїнових кислот, які регулюють ріст і метаболічну активність бактерій.

Оптимальне співвідношення C є критично важливим, оскільки надмірна кількість азоту може активізувати ріст клітин, але водночас пригнічує виробництво бактеріальної целюлози. Це пояснюється тим, що азот спонукає бактерії зосереджувати метаболізм на синтезі білків та інших клітинних компонентів, що сприяє збільшенню бактеріальної маси, а не на виробництві екзополісахаридів, таких як целюлоза.

Надмірна кількість вуглецю (особливо при низькому рівні азоту) сприяє утворенню бактеріальної целюлози, оскільки бактерії використовують вуглецеві

джерела для синтезу полімерів позаклітинного матриксу. Високе співвідношення вуглецю створює умови, за яких бактерії активно виробляють целюлозу як вторинний метаболіт, що виконує роль захисного механізму або засобу адаптації.

Оптимальне співвідношення вуглецю (зазвичай в межах від 50:1 до 80:1, хоча точне значення залежить від специфіки виду та умов вирощування) дозволяє досягти балансу між ростом клітин і виробництвом целюлози, що забезпечує максимальний вихід бактеріальної целюлози [21].

Тож хімічні речовини та фізичні впливи, що виникають під час виробництва целюлози, можуть впливати на процес синтезу целюлози. Внаслідок цього, культуральне середовище, яке використовується, може впливати на такі аспекти, як врожайність, морфологія, структура та фізичні властивості, незалежно від обраного методу виробництва.

Ці методи створюють структури з різними властивостями та морфологією. Вибір способу виробництва залежить від передбачуваного застосування. У методі статичного бродіння БЦ утворюється в культуральному середовищі у вигляді плівки на межі повітря та рідини, сприяючи більш тонким тривимірним сітчастим структурам і відмінним механічним властивостям. Навпаки, у методі бродіння з перемішуванням БЦ представлена у формі волокнистих гранул або ниток з нижчим ступенем полімеризації, механічної стійкості та кристалічності, ніж плівки, утворені під час статичного бродіння. Однак бродіння з перемішуванням широко використовується в комерційних цілях, оскільки воно дає БЦ за менший час, а також має економічну життєздатність і бажане застосування, такі як іммобілізація білка та ліпази, вивільнення ліків та поглинання нанокompозитів [7].

Крім відбору мікроорганізмів і методу ферментації, вибір умов культивування має великий вплив на виробництво. Прикладом цього є важливість контролю таких параметрів, як температура та рН, незалежно від того, наскільки субстрати, що використовуються у виробництві БЦ, здатні підвищити свою продуктивність. Це пояснюється тим, що кожен мікроорганізм

має оптимальну температуру та оптимальний рН для свого росту, що, відповідно, впливає на його врожай [8, 22].

Температура є ключовим чинником, оскільки вона впливає на швидкість метаболічних реакцій та синтез бактеріальної целюлози. Зазвичай оптимальний температурний діапазон для бактерій, які виробляють БЦ, становить 28–30°C. Якщо температура підвищується вище цього рівня, метаболічна активність може знижуватися або навіть зупинятися через денатурацію білків і ферментів. Зниження температури, в свою чергу, уповільнює метаболічні процеси, що призводить до зниження продуктивності. Точний контроль температури дозволяє підтримувати бактерії в стані активного росту, що сприяє оптимізації виробництва БЦ.

Рівень рН середовища має критичне значення, оскільки більшість мікроорганізмів, що виробляють целюлозу, здатні рости лише в певному діапазоні кислотності. Для культур SCOBY (асоціації бактерій і дріжджів) оптимальний рівень рН коливається в межах 3–4. Така кисла реакція середовища сприяє активності оцтовокислих бактерій, які є основними виробниками целюлози, і стримує розвиток інших небажаних мікроорганізмів. Підтримка оптимального рівня рН також забезпечує стабільність ферментативних процесів у клітинах, що дозволяє бактеріям максимально ефективно виробляти целюлозу. Якщо рН виходить за межі цього оптимального діапазону, це може порушити метаболізм бактерій, знизити вихід продукту або навіть призвести до загибелі клітин [21, 22].

Як для статичних методів, так і для методів із перемішуванням, культуральне середовище є найважливішою частиною для виробництва БЦ, яке не тільки забезпечує необхідні поживні речовини для росту бактерій і виробництва БЦ, але також значно впливає на структуру та врожайність БЦ, а також його механічні та фізичні властивості. Типове ферментаційне середовище складається щонайменше з джерела вуглецю, джерела азоту та певних поживних елементів, таких як фосфор, калій, сірка та магній. Типове культуральне середовище, що використовується для виробництва БЦ, вперше описано Hestrin

і Schramm (1954). Він містить 2,0 мас.% глюкози, 0,5 мас.% пептону, 0,5 мас.% дріжджового екстракту, 0,27 мас.% Na_2HPO_4 і 0,115 мас.% лимонної кислоти в якій глюкоза служить джерелом вуглецю, пептон, і дріжджовий екстракт виступають джерелами азоту. Значення рН середовища доводять до 6,0 за допомогою HCl або NaOH [14, 22].

Однак вартість виробництва занадто висока, щоб перешкоджати промислового процесу. Є два шляхи зниження собівартості продукції. Один шлях полягає в підвищенні ефективності виробництва БЦ, а інший шлях полягає в пошуку економічно ефективних джерел поживних речовин, оскільки культуральні середовища становлять ~30% від загальної вартості виробництва. На сьогоднішній день існує кілька способів сприяння виходу БЦ: (I) виділення нових бактеріальних штамів, які ефективно продукують БЦ з природи; (II) використання традиційних мутагенних методів (таких як ультрафіолетовий і хімічний мутагенез) і методів генної інженерії для скринінгу високопродуктивних штамів; (III) оптимізація умов культивування. Стандартне середовище NS є дорогим через високу вартість поживних речовин. Однак бактерії можуть харчуватися різними джерелами вуглецю (такими як глюкоза, сахароза, фруктоза, маніт, арабіт і патока) і джерелами азоту (такими як дріжджовий екстракт, пептон і кукурудзяний розчин [37].

1.4. Використання бактеріальної целюлози

1.4.1. Використання бактеріальної целюлози в якості біоплівки

Бактерії можуть виживати в різноманітних екологічних нішах від гарячих джерел до холодних льодовиків завдяки своїй здатності адаптувати свій метаболізм до навколишнього середовища. Щоб захистити себе від суворих умов життя, бактерії утворюють біоплівки, використовуючи різноманітні біополімери [25]. Одним із таких позаклітинних біополімерів є бактеріальна целюлоза (БЦ), яка має чудові властивості, такі як високе утримання води та чудова механічна міцність порівняно з іншими природними гідрогелями. Традиційно БЦ утворюється на межі повітря-вода у вигляді біоплівки з

Gluconacetobacter xylinus, бактерії, що мешкає на поверхні та залежить від кисню. Результатом такого зростання біоплівки є високо взаємопов'язана нанопориста мережа БЦ, яку можна використовувати безпосередньо, наприклад, у біомедичній промисловості, оскільки нативна плівка дуже нагадує структуру колагену [20]. БЦ є біосумісним і успішно імплантований без утворення фіброзної тканини. Ця властивість робить природно сформовану структуру БЦ відмінним кандидатом для штучних виробів для шкіри, пов'язок для ран, імплантатів з поверхневими візерунками та кровоносних судин де клітини вже продемонстрували варті уваги властивості клітинного росту. Такі самовирощені каркаси БЦ були сформовані шляхом використання утворення біоплівки на межі вода-повітря для створення 3D-форми за допомогою форм на основі силікону, гідрофобних поверхонь, 3D-друку та емульсій. У той час як отримана геометрична свобода значно розширює область застосування БЦ, у цих підходах відсутній контроль пористості, який необхідний для застосувань регенеративної медицини. Оскільки мережі БЦ сильно переплетені, щільність сітки занадто низька, щоб забезпечити міграцію та диференціацію клітин у мережу БЦ. Щоб покращити ріст клітин на поверхні матеріалу та стимулювати диференціацію клітин у каркасі, необхідно створити спінений БЦ із певною пористістю, зберігаючи при цьому свою природну структуру [20, 25].

1.4.2 Модифікації бактеріальної целюлози

БЦ вважається природним полімерним гідрогелем з тривимірними полімерними мережами, гнучкістю та хорошими механічними властивостями. Вона може легко змінювати свій розмір, форму та властивості у відповідь на умови бродіння. Щоб покращити її властивості, модифікації можуть бути зроблені перед біосинтезом (*in situ*), який змінює внутрішні біофізичні властивості, такі як целюлозні волокна, шляхом включення біоактивних молекул, модифікації пористості та/або кристалічності. З іншого боку, БЦ можна модифікувати шляхом додавання матеріалів після біосинтезу (*ex situ*). У

цьому методі БЦ занурюється в розчин, де він може взаємодіяти з екзогенними молекулами, такими як нанокompозити, ферменти та білки [9].

Для модифікації бактеріальної целюлози (БЦ) методами *in situ* використовуються різні підходи, включаючи пряме додавання різних активних інгредієнтів до ферментаційного середовища. Це дозволяє включати додаткові матеріали в структуру БЦ під час синтезу, покращуючи властивості кінцевого продукту [26].

Основні методи модифікації БЦ *in situ* [17]:

Включення наночастинок: виробництво композитів з покращеними антимікробними або провідними властивостями шляхом додавання наночастинок, таких як срібло, золото, діоксид титану або графен.

Додавання полімерів: полімери, такі як полівініловий спирт і полімолочна кислота, додаються до культурального середовища для створення композитів із покращеними механічними властивостями та еластичністю.

Хімічні модифікатори: використання хімічних речовин, наприклад таких як оцтова кислота та фосфорна кислота для ацетилювання або карбоксилювання змінює властивості поверхні БЦ і надає нові функціональні можливості.

Модифікація ex-situ: отримавши чисту бактеріальну целюлозу, її можна модифікувати поза середовищем. Це включає в себе додавання різних інгредієнтів і хімікатів для поліпшення властивостей БЦ і виробництва композитних матеріалів.

Основні методи модифікації бактеріальної целюлози *ex situ* [17]:

Включення наночастинок: наночастки, такі як срібло, золото, діоксид титану та графен, можна включити в структури БЦ для надання нових властивостей, таких як антибактеріальні, провідні та фотоактивні властивості.

Полімерні композити: бактеріальну целюлозу можна змішувати з різними полімерними матеріалами, такими як полівініловий спирт, полімолочна кислота або полівінілпіролідон, щоб покращити механічні та фізичні властивості, щоб створити біокompозитні матеріали.

Хімічні модифікації: хімічні методи, такі як ацетилювання, карбоксилювання та фосфорилювання, можуть змінити властивості поверхні бактеріальної целюлози, щоб покращити взаємодію з іншими матеріалами або зробити її гідрофільною/гідрофобною.

Гібридні матеріали: поєднання БЦ з іншими природними або синтетичними матеріалами, такими як колаген, гіалуронова кислота та керамічні частинки, дозволяє виготовляти композитні матеріали з унікальними біомедичними або механічними властивостями.

Бактеріальна целюлоза має привабливі властивості в загоєнні ран, включаючи її придатність у використанні як матеріал для ранових пов'язок, еластичність, інгібування бактерій, паропроникність і низька вартість. Під час обробки рани необхідна відповідна вологість, щоб забезпечити коротший час відновлення. Гідрофільність і відносно високий коефіцієнт набухання бактеріальної целюлози дозволяють їй підтримувати вологе середовище на місці рани, зберігаючи ідеальний температурний діапазон 25,3–37,3°C. Гідрофільність бактеріальної целюлози також забезпечує оборотне набухання та зняття набряку пов'язки, що може бути використано для лікування ранового ексудату з сильно витікаючих ран. Ще одна важлива особливість ранових пов'язок полягає в тому, що вони залишаються структурно недоторканими між накладенням і видаленням, особливо якщо вони розміщені поблизу суглобів, оскільки рухи тіла можуть оголити рану [31].

Успіх БЦ у застосуванні пов'язок для ран підтверджується появою різноманітних комерційних продуктів на основі БЦ під такими торговими марками, як Biofill®, Bionext®, Dermafill™ Membracell®, Prima cel™ і Xcell®. Також повідомлялося, що ранові пов'язки на основі БЦ демонструють швидшу епітелізацію та швидкість регенерації тканин під час загоєння ран порівняно зі звичайною марлею або синтетичними матеріалами, такими як Tegaderm®, Xeroform™ або Cuprophane® [19].

Однак сам БЦ не має показників біоактивності, тобто антибактеріальних і протигрибкових властивостей. Крім того, нативна структура БЦ не може

утримувати прикріплення клітин на його поверхні 3D-волокна через його структуру високої щільності. Щоб підвищити ефективність БЦ та відобразити активні властивості ранової пов'язки, частіше використовують два інших біополімери, хітозан і колаген, для просочення волокон БЦ [19].

Завдяки мережі нанофібрил, добавки можуть бути включені в матрицю цих мембран, утворюючи фізичний бар'єр, який перешкоджає проникненню мікроорганізмів, зменшуючи не тільки ризик інфікування, але також біль і час загоєння.

Хітозан є одним з найважливіших біополімерів для ранових пов'язок. Включення хітозану до БЦ може сприяти значному поглинанню води порівняно з БЦ окремо. Крім того, розпад хітозану до N-ацетил-бета-D-глюкозаміну додатково сприяє росту фіброblastів і відкладенню колагену. Він має властивість зв'язуватися з еритроцитами, сприяючи швидкому згортанню крові. Також було показано, що хітозан відіграє важливу роль у запальних клітинах і сприяє утворенню грануляцій [10, 17, 19].

Колаген відомий як один із основних білків шкіри, біосумісний і може підтримувати ріст клітин і тканин. Тому колаген став популярним кандидатом на ранові пов'язки, оскільки активна ранова пов'язка має хімічно нагадувати білкову структуру, яка може підтримувати проліферацію та ріст фіброblastів у шкірі людини. Колаген складається з неполярних амінокислот, таких як гліцин, пролін або гідроксипролін, які формують повторювані триплети в ланцюзі, що містить понад 1000 амінокислот. Дослідження показали, що композит колагену (тип I) здатний знижувати рівень інтерлейкінів, активних форм кисню (АФК) та протеолітичну активність. Ці властивості роблять колаген перспективним полімером для покращення механічних і біологічних характеристик БЦ [10, 17, 19].

Включення гліцерину як пластифікатора до складу бактеріальної целюлози допомагає зберігати вологу, що є особливо важливим для пацієнтів з опіками. Гліцерин також надає високу пластичність і біосумісність, що робить

його ефективним засобом для лікування сухої шкіри та ран, зокрема при псоріазі [31].

Використання полі-2-аміноетилметакрилату (РАЕМ) для виготовлення композитів на основі бактеріальної целюлози дозволяє значно підвищити водопоглинальну здатність – до 6200% у порівнянні з чистою бактеріальною целюлозою. Ця здатність до набухання покращується завдяки гідрофільним властивостям РАЕМ, які допомагають зберегти структуру целюлози навіть при значному поглинанні води [31].

Композити, що складаються з бактеріальної целюлози та акрилового гідрогелю, здатні збільшувати об'єм до 4000%. Дослідження виявили, що ці композити сприяють більш швидкому загоєнню ран, зокрема завдяки наявності амонійних груп у структурі РАЕМ, які володіють біоцидними властивостями [31].

Целюлозно-полівінілакриламідний композит відзначається високою міцністю завдяки перехресному зшиванню молекул PVA з целюлозою, що формує стабільну пористу структуру. Полімолочна кислота (PLA) також застосовується як покриття для бактеріальної целюлози, що сприяє покращенню поглинання вологи, міцності та здатності матеріалу до розширення [31].

Бактеріальна целюлоза виступає ефективним носієм для антимікробних агентів, таких як повідон-йод, полігексаметиленбігуанід, октенідин та інші сполуки. Додавання цих речовин до целюлозної матриці суттєво підвищує її антимікробну активність, зокрема проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, що робить її придатною для медичних цілей [31].

Комбінування з антимікробними агентами: насичення целюлози повідон-йодом, полігексаметиленбігуанідом та іншими сполуками підвищує її антимікробну активність, особливо щодо бактерій *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus epidermidis*, які часто є причинами лікарняних інфекцій [11, 31].

Поверхнево-активні речовини: застосування катіонних поверхнево-активних речовин, таких як бензалконію хлорид, надає матеріалу антимікробні

властивості, що дозволяє використовувати його як ранові пов'язки з низькою токсичністю [31].

Антибактеріальні композити: сполуки четвертинного амонію та тетрациклін, які зв'язуються з целюлозою, забезпечують тривале вивільнення активних речовин, зберігаючи їхню ефективність. Наприклад, композит з тетрацикліном знижує життєздатність бактерій до 99,9 %.

Бактеріальна целюлоза може бути ефективно використана як основа для місцевих анестетиків та нестероїдних протизапальних засобів у ранових пов'язках. Поєднання лідокаїну, ібупрофену та диклофенаку з бактеріальною целюлозою забезпечує стабільне вивільнення активних компонентів і підвищену ефективність у порівнянні з комерційними аналогами.

Лідокаїн: бактеріальна целюлоза, просочена лідокаїном, забезпечує рівномірне і повільне вивільнення анестетика.

Ібупрофен: целюлозні пов'язки з ібупрофеном демонструють швидке вивільнення препарату, що перевищує показники комерційних пов'язок.

Диклофенак: замочування бактеріальної целюлози в гліцерині з диклофенаком підвищує її здатність до набухання, що сприяє кращому вивільненню препарату [31].

Крім того, введення наночастинок срібла (AgNPs), вбудованих у матрицю БЦ, сприяє загоєнню ран. Антибактеріальні властивості AgNPs були широко вивчені. Дослідники вважають, що іони срібла мають антибактеріальну дію проти різних патогенів, руйнуючи клітинні мембрани та реплікацію та транскрипцію ДНК. AgNP також можуть сприяти вивільненню активних форм кисню (АФК) і вбивати бактерії. Композитний матеріал, просочений наночастинами срібла (AgNP), є прозорим, що дозволяє візуалізувати процес загоєння рани на місці рани [10, 12].

1.4.3 Використання бактеріальної целюлози в різних галузях промисловості

1.4.3.1 Застосування в харчовій промисловості

БЦ потенційно можна використовувати в традиційних десертах, дієтах з низьким вмістом холестерину, вегетаріанському м'ясі, харчових добавках/напоях, харчовій упаковці тощо. У комерційному застосуванні форми та функції БЦ варіюються залежно від методів бродіння. БЦ, отриманий шляхом статичного бродіння з желеподібною плівкою, в основному використовується як сировина для харчових десертів і харчових інгредієнтів, а тим часом БЦ, отриманий шляхом бродіння з перемішуванням, має гідроколоїдну природу використовується як загусник і суспензійний агент у напоях. Людському організму бракує целюлази, тому БЦ не може перетравлюватися та всмоктуватися в шлунково-кишковій системі та виводиться з організму разом з екскриментами [5].

З іншого боку, БЦ використовується як функціональна добавка для харчової промисловості. Існує багато напоїв і рідких харчових продуктів, що містять частинки, такі як молочні напої, кава, каші та соєве молоко, які потребують суспензії. Як правило, загусники та поверхнево-активні речовини, такі як ксантанова камедь, пектин, соєвий полісахарид, додають у рідкі продукти для суспендування частинок. Однак ці склади зазвичай демонструють низьку стабільність суспензії та часто мають проблеми з перешкодами прозорості та розділенням фаз. Крім того, висока в'язкість також викликає неприємний смак у клієнтів. Тому потрібні нові суспензії з відмінною стабільністю дисперсії та низькою в'язкістю. За цих умов гранули БЦ, отримані шляхом бродіння з перемішуванням, мають відмінні характеристики, щоб добре виконувати функцію суспендування частинок [37].

Він також використовується для виробництва ферментованого напою під назвою Kombucha з використанням бактеріальної целюлозної оболонки, колонізованої бактеріями та дріжджами, яка відома як «SCOBY» — симбіотична культура бактерій та дріжджів. Потім SCOBY ферментує чайний розчин, у

результаті чого виходить напій з високим вмістом пробіотиків. Бактеріальна целюлоза також використовувалася як варіант без м'яса для вегетаріанців, завдяки своїй структурі, а також використовується як харчова добавка з високим вмістом клітковини [5, 37].

1.4.3.2 Застосування в засобах особистої гігієни та побутовій хімії

Другою великою сферою застосування БЦ є засоби особистої гігієни та побутова хімія. Компоненти засобів особистої гігієни мають бути нетоксичними та біосумісними. Таким чином, споживачі віддають перевагу натуральному продукту з високою чистотою та високою безпекою. БЦ є натуральним продуктом, отриманим шляхом мікробної ферментації, який, як було продемонстровано, має високу біосумісність. У продуктах особистої гігієни плівки БЦ, зібрані в результаті статичного бродіння, використовувалися як сировина для масок для обличчя [37]. У порівнянні з нетканими целюлозними або шовковими масками для обличчя, маски для обличчя з БЦ мають кращу водоутримувальну здатність і дають сприятливе відчуття прохолоди та гладкості завдяки своїй нанорозмірній 3D сітчастій мережі. Крім того, високопориста мікроструктура дозволяє БЦ завантажувати різні поживні речовини та навіть інгредієнти з терапевтичними функціями. Пориста мікроструктура також надає плівці БЦ функцію контролю вивільнення цих захоплених агентів. Виходячи з цієї функції, маски для обличчя, що складаються з БЦ, також можна використовувати в косметичці та лікуванні легких шкірних захворювань [37].

Крім того, БЦ, отриманий у результаті бродіння з перемішуванням, також слугує суспензійним агентом, подібно до функції харчових продуктів, щоб забезпечити відмінну стабільність суспензії для частинок, таких як декоративні мікрокульки, інкапсульовані ароматизатори та інкапсульовані ферменти тощо [37].

1.4.3.3 Застосування в електричних приладах

Коли бактеріальна целюлоза поєднується з провідними сполуками, такими як металеві наночастинки або графіт, вона природним чином стає провідною для електрики. Саме з цієї причини виник інтерес до розробки матеріалів з бактеріальної целюлози для електричних застосувань. Одна з таких розробок була зроблена шляхом включення наночастинок поліаніліну та силікону, які зробили провідний, але гнучкий матеріал, який успішно використовувався як анод для літій-іонних батарей. Крім того, шляхом поєднання фериту кобальту в середовищі для вирощування були отримані нанотрубки з високопровідної целюлози, які можна було б використовувати як нанодроти в багатьох сучасних електричних пристроях. У результаті цього біомедична електронна інженерія є спеціальною сферою, яка може використовувати електропровідні бактеріальні целюлозні композити. Маючи здатність проводити електрику, невід'ємні властивості БЦ залишаються незмінними, в результаті чого матеріал залишається дуже гнучким і міцним [5, 31].

1.4.3.4 Застосування в текстильних матеріалах

Бактеріальна целюлоза має широкий спектр застосувань, які підкреслюють її екологічні переваги та інноваційний потенціал, зокрема в текстильній промисловості. Вона активно використовується як сировина для виробництва безрослинних волокон, таких як віскоза. Це особливо важливо в умовах зростаючої екологічної свідомості, оскільки традиційні синтетичні волокна, такі як нейлон, акрил і поліпропілен, виготовляються з нафти і не розкладаються в природі, що викликає серйозні проблеми з забрудненням [5]. Процес отримання віскози з бактеріальної целюлози є менш енергоємним і забруднюючим у порівнянні з рослинною целюлозою. Наприклад, традиційні методи очищення рослинної целюлози вимагають значних енергетичних витрат і використання агресивних хімікатів, тоді як БЦ легше обробляти, що зменшує негативний вплив на навколишнє середовище. Використання бактеріальної целюлози в якості сировини для виробництва волокон зменшує залежність від

природних ресурсів. Процес отримання БЦ часто ґрунтується на використанні промислових відходів, що не лише знижує витрати на сировину, але й підвищує ефективність виробництва. Виробництво волокон через бродіння БЦ є значно швидшим і потребує менше земельних ресурсів у порівнянні з вирощуванням рослин [5, 36].

1.4.3.5 Застосування в біомедичних областях

БЦ має великий потенціал у різноманітних біомедичних застосуваннях, включаючи перев'язки ран, штучну шкіру, зубні імпланти, доставку ліків, гемостатичні матеріали, судинні трансплантати, каркаси для тканинної інженерії, біосенсиори та діагностику. Висока чистота та біосумісність БЦ є передумовою для всіх біомедичних застосувань. Крім того, БЦ має унікальну 3D сітчасту мережу, яка надає низку переваг, таких як великі площі поверхні, чудова водоутримувальна здатність, проникність рідини/газу в свердловині, чудові механічні властивості та прозорість. Ці відмітні характеристики роблять БЦ дуже особливим матеріалом, який демонструє його перевагу в біомедичному застосуванні. Перев'язувальні пристрої на основі БЦ успішно комерціалізовані на ринку, і на шляху комерційної трансформації також є кілька продуктів, пов'язаних з доставкою ліків, контактними лінзами, судинними трансплантатами, заміною барабанної перетинки [5].

БЦ є природним наноматеріалом і, порівняно з іншими синтетичними полімерами, має певні переваги, такі як біосумісність, нетоксичність, здатність до біологічного розкладання та неканцерогенна активність [7]. Молекулярна структура БЦ надає деякі внутрішні характеристики, необхідні для перев'язки ран, особливо високу водоутримувальну здатність (WHC) і швидкість виділення води (WRR). Стверджується, що пов'язки БЦ мають здатність одночасно підтримувати вологість і поглинати екsudати з пошкодженої тканини, таким чином уникаючи інфекцій, зменшуючи місцевий біль і прискорюючи відновлення шкіри. Ці властивості можна контролювати за допомогою структурної модифікації БЦ за допомогою специфічних добавок, які надають

інший доступний об'єм пор і, як наслідок, змінене співвідношення WHC/WRR. Як приклад, альгінат хітозану та інші високогідрофільні сполуки використовуються для зменшення розміру пор БЦ, збільшуючи параметри WHC/WRR. Як наслідок, БЦ мембрани, посилені як хітозаном, так і альгінатом, демонструють вищу подовженість, регідратацію, коефіцієнт набухання та пропускання водяної пари [5, 7].

Висновки до розділу 1.

У цьому розділі було проаналізовано біосинтез бактеріальної целюлози, а також особливості її отримання і можливості хімічної модифікації для покращення функціональних властивостей. БЦ є цінним природним матеріалом завдяки своїм унікальним фізичним і хімічним характеристикам, таким як висока міцність, біосумісність, чистота та здатність утримувати значну кількість води. Це робить її перспективним матеріалом для медичних застосувань, зокрема для створення біосумісних покриттів для лікування ран.

Одним із ключових аспектів у виробництві БЦ є правильний вибір умов культивування, таких як температура, рН та склад поживного середовища. Оптимізація цих параметрів, включаючи співвідношення вуглецю до азоту (C/N), дозволяє досягти високої продуктивності та якості БЦ.

Хімічна модифікація бактеріальної целюлози, зокрема через методи ацетилювання, карбоксилювання та фосфорилювання, є перспективним шляхом для розширення її властивостей. Такі модифікації дозволяють змінювати поверхневу енергію бактеріальної целюлози, покращувати її гідрофільність або гідрофобність, а також підвищувати адгезійні властивості. Додавання наночастинок срібла до структури бактеріальної целюлози надає матеріалу антибактеріальні властивості, що є особливо важливим для розробки біоматеріалів з антимікробною дією.

Отже, бактеріальна целюлоза має великий потенціал для використання в медичній практиці, зокрема для створення інноваційних ранових покриттів, а також у сферах, де потрібні екологічно безпечні та біологічно розкладні матеріали.

РОЗДІД 2

МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ

2.1 Характеристика мікробної асоціації (SCOBY)

SCOBY, також відомий як чайний гриб, целюлозна плівка або консорціум, є мікробним співтовариством, яке варіюється в залежності від процесу ферментації. Основними його складовими є оцтовокислі бактерії (ААВ) найбільш поширеними представниками яких є *Komagataibacter kombuchae*, *K. saccharivorans*, *K. rhaeticus*, *K. intermedius*, *K. europaeus*, *K. hansenii* та *K. xylinus*; *Gluconobacter oxydans*, *G. potus*; *Gluconacetobacter sacchari* та *Gluconacetobacter* sp A4; *Acetobacter musti*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *A. nitrogenifigens* sp. та дріжджі. Найбільш розповсюдженими видами дріжджів, що зустрічаються в чайному грибі є *Brettanomyces bruxellensis*, *B. lambicus*, *B. intermedius*; *Candida albicans*, *C. kefir*, *C. zemplinina*; *Dekkera bruxellensis*, *D. anomala*; *Hanseniaspora valbyensis*; *Pichia fermentans*, *P. occidentalis*, *P. kudriavzevii*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Schizosaccharomyces pombe*; а також *Zygosaccharomyces bailii* і *Z. rouxii*. Також зафіксовано наявність невеликої кількості молочнокислих бактерій (LAB) серед яких *Lactocaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus mali*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, *Liquorilactobacillus nagelii*, *Oenococcus oeni* та *Bifidobacterium*. Ці мікроорганізми (LAB, ААВ та дріжджі) вважаються потенційними пробіотиками, що може сприяти корисним властивостям чайного гриба для здоров'я. Проте пробіотична ефективність живих культур, виявлених у чайному грибі, досліджувалася досить рідко.

2.2 Поживні середовища для культивування мікробної асоціації (SCOBY)

Для нормального росту та розвитку мікроорганізмів, як і всім живим істотам, необхідні органічні та неорганічні субстрати, які забезпечують їх енергією та матеріалом для біосинтезу. У природних умовах мікроорганізми

отримують усі необхідні елементи для харчування з навколишнього середовища. При лабораторному культивуванні використовують поживні середовища, які штучно задовольняють харчові потреби мікроорганізмів. Клітини мікроорганізмів потребують для свого розвитку макроелементів (вуглець, азот, водень, кисень, фосфор та ін.) і мікроелементів (цинк, марганець, йод, мідь тощо). Деяким мікроорганізмам також потрібні додаткові фактори росту, такі як амінокислоти, нуклеотиди, жирні кислоти, а також вітаміни. Таким чином, поживні середовища містять збалансований набір органічних і неорганічних речовин, що робить їх придатними для росту та розвитку мікроорганізмів.

Поживні середовища повинні відповідати таким критеріям:

- містити всі необхідні джерела макро- та мікроелементів, а за потреби – також вітаміни і фактори росту;
- усі компоненти, що входять до їх складу, мають бути у певному збалансованому співвідношенні;
- містити достатню кількість води;
- мати оптимальні значення рН для мікроорганізмів;
- бути ізотонічними, тобто мати такий же осмотичний тиск, як і внутрішнє середовище мікробної клітини;
- бути стерильними.

Ключові моменти при вирощуванні: SCOBY краще розвивається в легкокислому середовищі з рН 4-5. Оптимальний діапазон температури для вирощування SCOBY становить 20-30°C. Необхідно забезпечити доступ кисню, оскільки мікроорганізми, що входять до складу SCOBY, потребують як аеробних, так і анаеробних умов.

Основна мета стерилізації полягає в повному знищенні всіх живих мікроорганізмів і спор, які можуть бути присутніми всередині або на поверхні об'єкта. Стерилізації підлягають поживні середовища, лабораторний посуд, інструменти, розчини тощо. Саме культивування не потребує суворих асептичних вимог.

2.2.1 Середовище HS (Хестрином и Шраммом)

Середовище HS, застосовували для отримання посівного матеріалу мікробної асоціації SCOBY. Воно мало наступний склад: з глюкоза (20 г/л), пептону (5 г/л), дріжджового екстракту (5 г/л), дінатрійфосфату (2,7 г/л) та вода.

Зважували усі компоненти у зазначених кількостях, заливали водою. Ретельно перемішуємо та стерилізували за температури 121°C упродовж 20 хв. Перед використанням охолоджували [29].

2.2.2 Середовища для отримання біоплівки

Для ефективного вирощування біоплівки мікробіоти SCOBY використовували середовище на основі чорного чаю 2 та 5 г/л з внесенням різних додаткових компонентів для забезпечення оптимального виходу БЦ.

У приготоване середовище на основі 2 г/л та 5 г/л вносили компоненти вуглеводневого складу, а саме: сахароза (10, 20, 90 г/л), глюкоза (20, 40, 180 г/л), лактоза (10, 20 г/л), крохмаль картопляний (5, 10 г/л) та етанол (5 мл/л). Також використовували співвідношення сахароза-глюкоза, сахароза-лактоза, сахароза-крохмаль, сахароза-етанол, глюкоза-лактоза, глюкоза-крохмаль, глюкоза-етанол, лактоза-крохмаль та лактоза-етанол. Кукурудзяне борошно, пептон та дріжджовий екстракт вносили у сухому вигляді. Кукурудзяне борошно та дріжджовий екстракт та пептон використовували у концентрації 5 г/л.

Середовища розливали по колбам, доводили рН оцтовою кислотою до значення 4-5.

2.3 Отримання посівного матеріалу

Використовували фрагмент плівки чайного гриба, який містить як дріжджі, так і бактерії, необхідні для утворення SCOBY. Потім її поміщається в скляну колбу з поживним середовищем HS об'ємом 50 мл. Після додавання плівки в середовище, колбу ставили на вирощування на качалочну установку з перемішуванням 100 об/хв при температурі 28°C упродовж 48 год. Це

забезпечує рівномірний розподіл поживних речовин і запобігає осадженню клітин на дно колби. Таке перемішування також сприяє насиченню середовища киснем, що є критично важливим для аеробних мікроорганізмів.

Після завершення 48-годинного культивування мікроорганізми досягають необхідної щільності, і розпочинається етап центрифугування. Середовище центрифугується зі швидкістю 4000 обертів на хвилину протягом 10 хвилин. Центрифугування дозволяє відокремити клітини від рідкої фази, утворюючи осад, що містить живі мікроорганізми.

Після завершення центрифугування осаджені клітини обережно збираються, а зайве рідке середовище зливають. Отриманий концентрований посівний матеріал потім переноситься у свіже середовище HS для подальшого культивування. Цей етап є надзвичайно важливим для забезпечення великої кількості активних мікроорганізмів, які здатні формувати нові біоплівки та підтримувати ефективний процес ферментації.

2.4 Отримання біоплівок

Готували поживні середовища різного складу (див. п.2.2.2). У стерильні колби вносили по 150 мл поживного середовища у якому містилися усі необхідні для дослідження компоненти в нестерильних умовах. Потім вносили попередньо підготовлений посівний матеріал у кількості 10% від загального об'єму середовища. Усі колби з середовищем розміщували в стаціонарних умовах, де підтримували температуру на рівні 30°C, що є оптимальним для активної життєдіяльності SCOBY. Цей температурний режим сприяє швидкому росту дріжджів і бактерій. Вирощували упродовж 7, 14, 18 діб. Протягом цього періоду мікроорганізми активно розмножуються, формуючи біоплівку на поверхні середовища.

2.5 Визначення рівня значення pH

Рівень кислотності вимірювали за допомогою лакмусового чутливого індикатору, який має кольорову градацію для різних значень pH та pH-метру.

pH-метр визначає кислотність середовища, спираючись на електричний потенціал, що виникає при зануренні спеціального електрода в розчин. У електроді pH-метра формується потенціал, який пропорційний концентрації іонів водню (H^+) у розчині, і цей потенціал перетворюється пристроєм у точне цифрове значення pH.

Використання pH-метра забезпечує точний і швидкий контроль рівня кислотності, що є критично важливим для підтримки стабільних умов культивування. У разі необхідності, для корекції pH можна додавати кислоти (наприклад, оцтову кислоту), щоб підтримувати оптимальний рівень 3-4, який потрібен для SCOBY. Це сприяє успішному формуванню біоплівки і належній ферментації.

2.6 Визначення товщини та ваги біоплівки

Отримані плівки виймали з поживних середовищах, промивали водою, потім занурювали у 10% розчин NaOH і кип'ятили упродовж 10 хв. Після чого їх знов промивали водою 5 разів для видалення лужного середовища. Процес закінчували, коли pH плівки був нейтральний.

Для визначення ваги плівки використовували ваговий метод. Плівки мокрі клали на паперові фільтри для видалення надлишкової вологи. Папір змінювали до тих пір, поки 70% паперу не була сухою. Після чого плівки зважували на електронних вагах.

Товщину плівки перевіряли на товщиномірі індикаторному TP 0-20 мм. Затискали плівку і спостерігали за стрілкою приладу, поки вона не зупиниться. Товщину однієї плівки перевіряли в 3 різних місцях. Розраховували середнє значення.

2.7 Аналіз біоплівки за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії

Інфрачервона Фур'є-спектроскопія (FTIR) є потужним методом для дослідження хімічного складу мікробних біоплівки, таких як SCOBY, які складаються з різних мікроорганізмів, об'єднаних у полімерну матрицю. Ця

техніка дозволяє виявляти функціональні групи та молекули в складі біоплівки, що допомагає зрозуміти роль їх компонентів, зокрема полісахаридів і білків, у формуванні та стабілізації структури біоплівки. FTIR-спектроскопія з ослабленим повним відображенням (ATR) дає змогу проводити аналіз без попередньої підготовки зразків і досліджувати біоплівки в їх природному стані, що є особливо важливим для динамічного спостереження за їх розвитком і реакціями на навколишнє середовище.

Цей метод має ряд важливих переваг, серед яких можливість дослідження в водному середовищі, недеструктивний підхід та вимірювання в реальному часі. Він дозволяє оцінити динамічну природу полімерної матриці біоплівки та вивчити вплив навколишнього середовища, зокрема температури та рівня поживних речовин, на її склад. Проте, аналіз ускладнюється перекриттям спектральних смуг та неоднорідністю складу, що вимагає використання методів деконволюції спектрів та вдосконаленої обробки даних. Для більш точного вивчення локалізованих змін у структурі біоплівки перспективним є поєднання FTIR з іншими методами, такими як конфокальна мікроскопія або атомно-силова мікроскопія, що підвищує просторову роздільну здатність і деталізує мікроструктуру біоплівок.

2.8 Статистичний аналіз

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Office Excel 2016.

Висновки до розділу 2.

У цьому розділі проведено детальне дослідження методів і матеріалів, що використовуються для культивування та аналізу мікробної асоціації SCOBY, отриманої з чайного гриба (комбуча). Встановлено основні мікроорганізми, які входять до її складу, зокрема оцтовокислі та молочнокислі бактерії, а також дріжджі, що можуть мати пробіотичні властивості. Розглянуто різноманітні

живильні середовища, що містять необхідні макро- та мікроелементи, а також фактори росту, оптимальні для розвитку мікроорганізмів у складі SCOBY.

Описано методику створення посівного матеріалу за допомогою середовища HS, яке сприяє активному росту мікробної асоціації. Проаналізовано умови, необхідні для формування біоплівки, включаючи оптимальний температурний режим, рівень кислотності середовища та забезпечення доступу кисню. Це дозволило досягти ефективного формування біоплівки з контрольованими показниками товщини та маси.

Досліджено можливості інфрачервоної Фур'є-спектроскопії для вивчення хімічної структури біоплівки, що надає важливу інформацію про склад і властивості полімерної матриці, зокрема полісахаридів і білків, які сприяють стабільності біоплівки. Для аналізу експериментальних даних було використано статистичний підхід, що підвищує надійність отриманих результатів і створює основу для подальших досліджень та застосувань SCOBY в біотехнології та харчовій промисловості.

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Дослідження впливу вуглецевого субстрату на утворення біоплівок

Досліджували використання різних субстратів та їх суміші для отримання бактеріальних біоплівок. На початку отримували біоплівки на субстраті з 5 г/л, чорного чаю з додаванням різних джерел карбону (див. розділ 2.2.2). Контролювали вагу мокрої очищеної плівки на 7-му та 18-ту добу. Цей термін був обраний за допомогою літературних даних.

Чай слугує джерелом антиоксидантів, поліфенолів і мікроелементів, які є важливими для росту бактерій і дріжджів, а також впливають на смакові якості кінцевого продукту. Мікроорганізми використовують цукри як джерело вуглецю для внутрішньоклітинної переробки енергії. Основними цукрами в цьому середовищі є сахароза та глюкоза. Сахароза є найпоширенішим джерелом енергії, що сприяє швидкому росту та розмноженню клітин, тоді як глюкоза є простішим цукром, тому вона легше ферментується і швидше утилізується мікроорганізмами. У деяких випадках використовуються змішані субстрати сахарози та глюкози, щоб збалансувати швидкість ферментації та забезпечити стабільне надходження поживних речовин для обох типів мікроорганізмів, які присутні в SCOBY. Враховуючи літературні дані ми перевірили як впливатимуть і інші субстрати (лактоза, крохмаль, етанол) на утворення біоплівки.

Із табл. 3.1 видно, що найкращим субстратом для отримання біоплівки є глюкоза та змішаний субстрат глюкоза-сахарозою. На цих субстратах спостерігався максимальний вихід БЦ. Слід зазначити, що на 18 добу майже в усіх у колбах утворювалося по 2 плівки, одна із них була на дні колби. Також слід зазначити, що колби в яких як джерело вуглецю була лактоза були інфіковані мікробіотами, які активно розвивалися на плівках. Це може бути спричинено тим, що культивування проводили в напівстерильних умовах, а у процесі утворення біоплівки саме на середовищі з лактозою рН був на рівні 5.

Таблиця 3.1

Утворення біоплівки на вуглецевих субстратах

№	Джерело карбону, г/л			Вага плівок (г) на добу		Вага відмитих плівок на 7 добу
	Сахароза	Глюкоза	Лактоза	7	18	
1	20	—	—	71,2	131,1	41,9
2	—	40	—	109,7	214,3	89,3
3	—	—	20	38,8	60,6	29,3
4	10	—	20	48,7	76,9	32,5
5	10	20	—	87,5	192,9	63,1
6	—	20	10	49,4	0	34,2
7	90			113,2	н.д	91,2
8		180		111,9	н.д	90,8
9			90	0	н.д	0

н.д. – не досліджували

У літературі зустрічається інформація, що при використанні сахарози та глюкози у високих концентраціях (90 та 180 г/л) призводить до збільшення синтезу БЦ. Однак наші дослідження показали, що збільшення БЦ спостерігається в 1,6 рази, тоді як витрати на кількість джерела вуглецю у 4,5 рази. Враховуючи, що цукристі речовини у великих концентраціях можуть бути консервантами, то слід вивчити це питання провівши оптимізацію внесення цукристих речовин у середовище для оптимального отримання бактеріальної целюлози.

Також необхідно зазначити, що при дослідженні використання таких змішаних субстратів як крохмаль та етанол (табл. 3.2) спостерігали утворення біоплівки на рівні 18-27 г/л, що може свідчити про незасвоєння субстрату. У варіантах середовища 7-9 з лактозою взагалі не спостерігали плівкоутворення.

Також це питання треба досліджувати окремо, оскільки крохмаль можна вносити не як основний субстрат для накопичення біомаси, а на 3-4 добу для плівкоутворення. Про етанол інші дослідники в літературі пишуть, що він зупиняє бродіння дріжджами, тому можливо його теж слід вносити не на початку культивування, а в середині, коли рН середовища знизиться до рівня 3-

4. У кислому середовищі оцтовокислі бактерії, що входять до складу SCOBY, мають найкращі умови для свого росту. Ці бактерії перетворюють етанол, який виробляють дріжджі, на оцтову кислоту. Дріжджі, в свою чергу, виробляють етанол та інші продукти бродіння, які також сприяють розвитку оцтовокислих бактерій.

Таблиця 3.2

Вплив змішаних вуглеводневих субстратів на утворення біоплівки

№	Сахароза, г/л	Глюкоза, г/л	Лактоза, г/л	Крохмаль, г/л	Етанол, мл/л	Вага плівок (г) на 7добу
1	10	—	—	5	—	26,5
2	10	—	—	10	—	18,1
3	10	—	—	—	5	26,8
4	—	20	—	5	—	24,2
5	—	20	—	10	—	18,4
6	—	20	—	—	5	27,2
7	—	—	10	5	—	—
8	—	—	10	10	—	—
9	—	—	10	—	5	—

Підсумовуючи дані результати робимо висновок, що утворення біоплівок краще всього спостерігається на субстратах в якості джерела карбону сахарозі (71,2 г/л), глюкозі (109,7 г/л) та їх поєднанні (89,5 г/л) на 7 добу вирощування.

3.2. Дослідження впливу співвідношення C/N на утворення біоплівок

Оскільки із попередніх досліджень видно, що найкращі результати були отримані при внесенні у середовище сахарози та глюкози, тому на даному етапі використовували їх у якості джерела карбону, а як додаткове внесення нітрогену – кукурудзяне борошно, дріжджовий екстракт та пептон. Варіанти складу поживного середовища наведені в табл. 3.3. Досліди № 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 кукурудзяне борошно,

дріжджовий екстракт та пептон відповідно у рівних концентраціях. Початковий рівень рН середовища становив 5.

Таблиця 3.3

**Варіанти компонентів поживних середовищ
для біосинтезу мікробної целюлози**

№	Джерело карбону, г/л		Джерело нітрогену, г/л			Вага плівок, г/л		Товщина відмитих плівок, мм
	Сахароза	Глюкоза	КБ	ДЕ	ПТ	мокрих	відмитих	
1	20	—	—	—	—	53,3	31,4	0,5
2	—	40	—	—	—	82,3	67,1	0,7
3	10	20	—	—	—	65,7	47,3	0,6
4	20	—	5	—	—	95,1	67,4	0,8
5	—	40	5	—	—	191,9	163,6	1,5
6	10	20	5	—	—	186,6	159,8	1,7
7	20	—	—	5	—	147,2	124,5	0,7
8	—	40	—	5	—	198,5	141,8	0,7
9	10	20	—	5	—	201,3	167,6	0,7
10	20	—	—	—	5	156,9	107,9	0,4
11	—	40	—	—	5	202,2	166,7	0,6
12	10	20	—	—	5	246,2	198,3	0,5

КБ – кукурудзяне борошно, ДЕ – дріжджовий екстракт, ПТ – пептон.

Для мікробної асоціації сахароза є основним джерелом енергії, а глюкоза – субстратом, що швидко ферментується. Використання змішаного субстрату позитивно впливає на різні групи мікроорганізмів SCOBY. Пептон, будучи білковим гідролізатом, постачає мікроорганізмам необхідні амінокислоти та пептиди, що сприяє їхньому росту та розвитку. Кукурудзяне борошно виступає джерелом складних вуглеводів та амінокислот і забезпечує додаткові поживні речовини, які підтримують баланс середовища. Дріжджовий екстракт містить вітаміни, амінокислоти та мікроелементи, які активізують ріст мікроорганізмів.

Кислотність середовища є важливим чинником у процесі вирощування мікроорганізмів, оскільки рН безпосередньо впливає на їх метаболізм, ріст і здатність до розмноження. Більшість мікроорганізмів можуть виживати та активно розвиватися лише в певному діапазоні рН. Це пов'язано з тим, що ферменти, які регулюють життєво важливі процеси в клітинах, функціонують

ефективно лише при конкретному значенні рН. Якщо рН середовища виходить за межі цього оптимального діапазону, ферменти можуть втратити свою активність, що призводить до пригнічення росту або навіть загибелі мікроорганізмів. Під час культивування SCOBY, що є симбіотичною асоціацією бактерій і дріжджів, важливо підтримувати кислотність на оптимальному рівні. Ідеальний діапазон рН для розвитку мікроорганізмів у SCOBY на початку розвитку становить 4-5. Такий рівень кислотності виконує кілька важливих функцій, а саме запобігання розвитку небажаних мікроорганізмів враховуючи, що процес утворення БЦ є напівстерильним. Кисле середовище стримує ріст багатьох патогенних і сторонніх бактерій, які можуть конкурувати з бактеріями та дріжджами SCOBY та конкурувати за субстрат. Багато шкідливих мікроорганізмів не здатні розмножуватися при такому низькому рівні рН, що робить процес ферментації більш безпечним і стабільним.

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

Найбільша маса відмитих БЦ (166,5-198 г/л) спостерігалась (рис. 3.1) при внесенні пептону, але його вартість набагато вища за кукурудзяне борошно, тому можна сказати, що вигідніше використовувати все ж таки кукурудзяне борошно (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. 3.2) був найбільший у варіантах з кукурудзяним борошном (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.

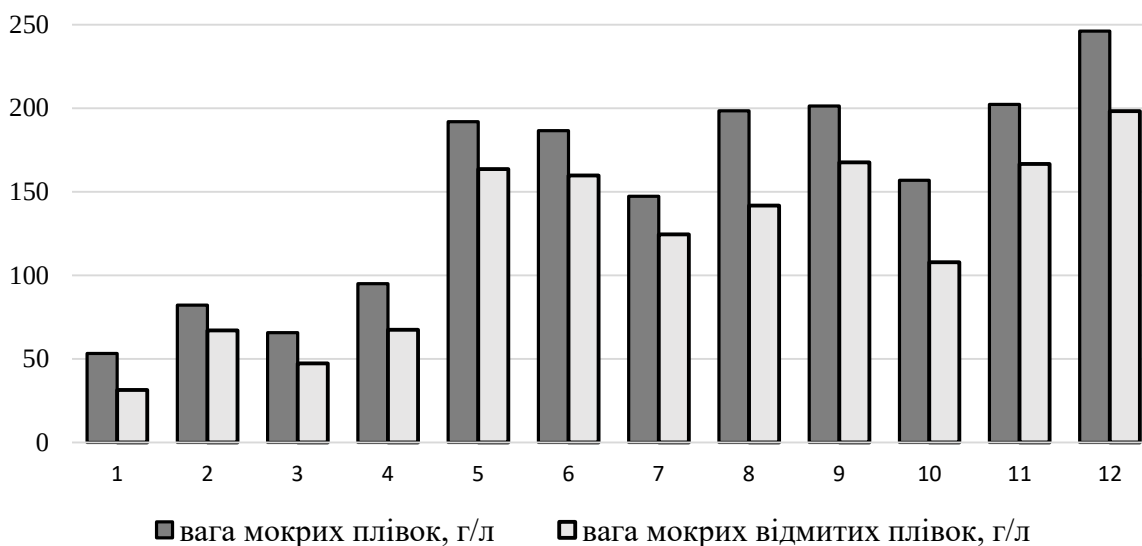


Рис. 3.1. Вага мокрих плівок вирощених на 12 різних субстратах.

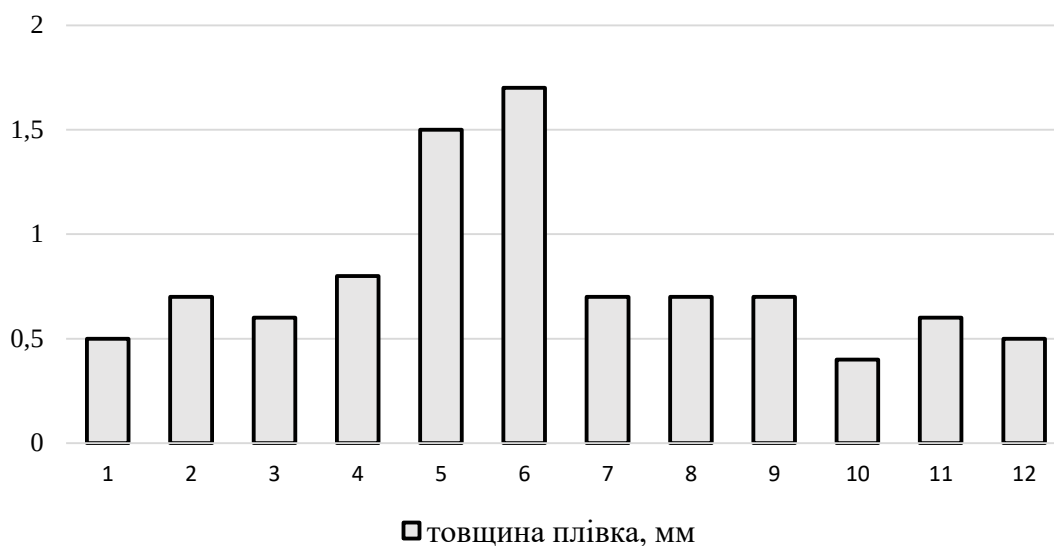


Рис. 3.2. Товщина мокрих відмитих плівок вирощених на 12 різних субстратах.

Біоплівки, які були вирощені на субстратах представлених на рис. 3.3. Ці плівки у подальшому були висушені та проаналізовані за допомогою FTIR-спектрофотометра. Дані цього аналізу представлені на рис. 3.4. Конформаційні характеристики БЦ, отриманих із середовищ № 5, № 6, № 8, № 9, № 11, № 12, аналізували за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії (рис. 3.4). 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 $\text{C}=\text{O}$. Смути в областях 1016, 1042 і 1051, 1070 см^{-1} відповідають подовженню кільця С-С, С-ОН, С-Н. При цьому розтяг С-О-С з глікозидного зв'язку β (1-4) у целюлозі та протифазний вигин О-Н при хвильових числах 633, 671 см^{-1} . Отримані результати порівнювалися з існуючими звітами [15, 21].

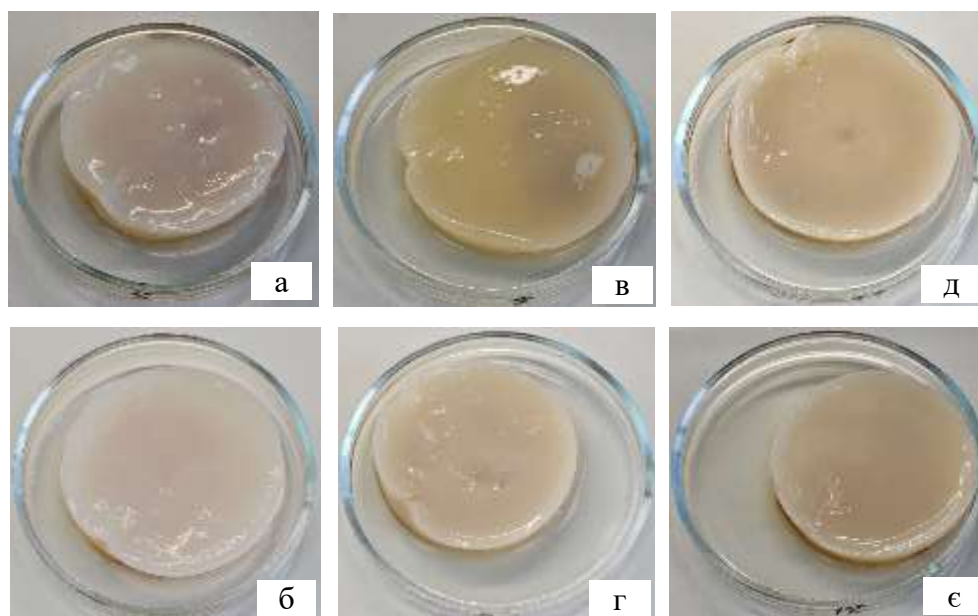


Рис. 3.3. Фотографії біоплівки вирощених на різних варіантах поживного середовищах (табл. 3.3): а – середовище № 5 (глюкоза, кукурудзяне борошно), б – середовище № 6 (сахароза-глюкоза, кукурудзяне борошно), в – середовище № 8 (глюкоза, дріжджовий екстракт), г – середовище № 9 (сахароза-глюкоза, дріжджовий екстракт), в – середовище № 11 (глюкоза, пептон), г – середовище № 12 (сахароза-глюкоза, пептон).

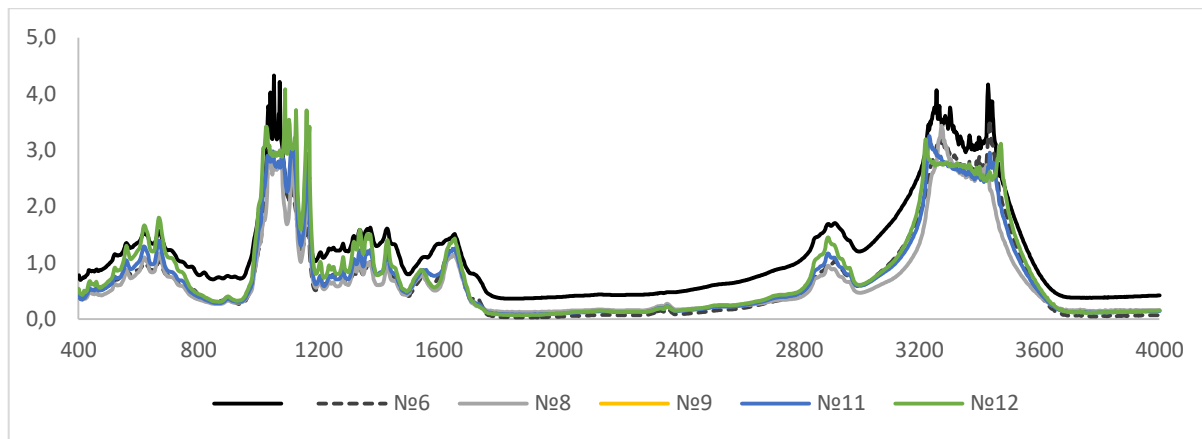


Рис. 3.4. Аналіз БЦ вирощених на середовищах № 5, № 6, № 8, № 9, № 11, № 12 за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії.

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) [9]. 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 БЦ більше, ніж на середовищі чорний чай-сахароза. Джерело вуглецю необхідне для мікробного метаболізму та зростання. У цьому дослідженні сахароза, глюкоза та їх змішане внесення є основним джерелом вуглецю в середовищі, який можна використовувати як субстрат для виробництва БЦ.

Висновки до розділу 3.

У цьому розділі було проаналізовано вплив різних вуглецевих і азотних субстратів на формування бактеріальних біоплівочок за допомогою мікробної асоціації SCOB_Y. Виявлено, що основними джерелами вуглецю, які сприяють активному росту біоплівочок, є глюкоза, сахароза та їх комбінація. Найбільша маса біоплівочок спостерігалася на 7-й день експерименту при використанні глюкози та змішаного субстрату глюкоза-сахароза, що підтверджує значущість цих компонентів у живильному середовищі.

Дослідження також показали, що додавання азотних компонентів, таких як кукурудзяне борошно, дріжджовий екстракт і пептон, позитивно впливає на утворення біоплівочок, особливо в поєднанні з глюкозою та сахарозою. Найвищий вихід біоплівочок та їхня товщина були зафіксовані в середовищах з пептоном і кукурудзяним борошном, що підкреслює їхню ефективність як доступних джерел азоту.

Використання інфрачервоної Фур'є-спектроскопії дало змогу детально вивчити хімічний склад отриманих біоплівочок, зокрема виявити функціональні групи, які формують полімерну матрицю целюлози. Це дослідження підтверджує потенціал застосування альтернативних компонентів у середовищі для вирощування бактеріальної целюлози та відкриває нові можливості для оптимізації процесів її комерційного виробництва.

ВИСНОВКИ

На основі проведених досліджень були розроблені оптимальні стратегії для підвищення виробництва бактеріальної целюлози (БЦ) з мінімальними витратами ресурсів. У процесі роботи було вивчено вплив різних джерел вуглецю, таких як сахароза, глюкоза та їх комбінації, а також додаткових джерел азоту на формування бактеріальних біоплівочок. Результати показали, що найвищий вихід БЦ спостерігався при використанні субстратів, збагачених глюкозою та сумішшю глюкози з сахарозою, за умови додавання таких джерел азоту, як кукурудзяне борошно (159,5-163,5 г/л), дріжджовий екстракт (141,5-167,5 г/л) та пептон (166,5-198 г/л).

Отримані знання про вплив комбінацій джерел вуглецю та азоту дозволяють вдосконалити процеси культивування мікробної асоціації SCOBY для досягнення високих виходів БЦ. Оптимізація співвідношення C/N та інших параметрів культивування є критично важливою для ефективного виробництва цього біополімеру.

Аналіз, проведений за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії, підтвердив формування біоплівочок мікроцелюлози, що є важливим кроком для подальшої стандартизації процесу.

Отримані результати свідчать про значний потенціал використання доступних джерел поживних речовин для біосинтезу бактеріальної целюлози, що може сприяти розвитку економічно вигідних методів її промислового виробництва. Подальші дослідження в цій сфері є необхідними для детальної оптимізації умов культивування, зокрема параметрів рН, температури та складу середовища, що дозволить максимально реалізувати біотехнологічний потенціал БЦ.

СПИСОК ВИКОРИСТОНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Azad, M., Avin, A. Scanning electron microscopy (SEM): A review. – 2018. – 9 с.
2. Beekmann, U., Zahel, P., Karl, B., Schmölz, L., Börner, F., Gerstmeier, J., Werz, O., Lorkowski, S., Wiegand, C., Fischer, D. Modified Bacterial Cellulose Dressings to Treat Inflammatory Wounds // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10, No. 12. – P. 2508. – DOI: <https://doi.org/10.3390/nano10122508>.
3. Buldum, G., Mantalaris, A. Systematic understanding of recent developments in bacterial cellulose biosynthesis at genetic, bioprocess and product levels // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – P. 7192. – DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22137192>.
4. Cavka, A., Guo, X., Tang, S.J., Winstrand, S., Jönsson, L.J., Hong, F. Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge // *Biotechnology for Biofuels*. – 2013. – Vol. 6, No. 1. – P. 25. – DOI: 10.1186/1754-6834-6-25.
5. Choi S.M., Rao K.M., Zo S.M., Shin E.J., Han S.S. Bacterial Cellulose and Its Applications // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14, №6. – P. 1080. – DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14061080>.
6. Crisp, A.R., Short, B., Rowan, L., Ramage, G., Rehman, I.U.R., Short, R.D., Williams, C. Investigating the chemical pathway to the formation of a single biofilm using infrared spectroscopy // *Biofilm*. – 2023. – Vol. 6. – P. 100141. – DOI: 10.1016/j.biofilm.2023.100141.
7. de Amorim J.D.P., da Silva Junior C.J.G., de Medeiros A.D.M., do Nascimento H.A., Sarubbo M., de Medeiros T.P.M., Costa A.F.d.S., Sarubbo L.A. Bacterial Cellulose as a Versatile Biomaterial for Wound Dressing Application // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, №17. – P. 5580. – DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27175580>.
8. Fernandes, I. de A. A., Pedro, A. C., Ribeiro, V. R., Bortolini, D. G., Ozaki, M. S. C., Maciel, G. M., Haminiuk, C. W. I. Bacterial cellulose: From production optimization to new applications // *International Journal of Biological*

Macromolecules. – 2020. – Vol. 164. – P. 2598-2611. – DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.255>.

9. Gonçalves Bortolini, D., Haminiuk, C.W.I., Pedro, A.C., Fernandes, I. de A.A., Maciel, G.M. Insights into bacterial cellulose: From production to emerging applications // *Food Chemistry: X*. – 2021. – No. 12. – P. 100160. – DOI: 10.1016/j.fochx.2021.100160.

10. Horue M., Silva J.M., Berti I.R., Brandão L.R., Barud H.d.S., Castro G.R. Bacterial Cellulose-Based Materials as Dressings for Wound Healing // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15, №2. – P. 424. – DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020424>.

11. Hodel, K.V.S., Machado, B.A.S., Sacramento, G.d.C., Maciel, C.A.d.O., Oliveira-Junior, G.S., Matos, B.N., Gelfuso, G.M., Nunes, S.B., Barbosa, J.D.V., Godoy, A.L.P.C. Active Potential of Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing: Analysis of Its Potential for Dermal Lesion Treatment // *Pharmaceutics*. – 2022. – Vol. 14, No. 6. – P. 1222. – DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061222>.

12. Jacek, P., Dourado, F., Gama, M., Bielecki, S. Molecular aspects of bacterial nanocellulose biosynthesis // *Microbial Biotechnology*. – 2019. – Vol. 12, No. 4. – P. 633–649.

13. Kassem, A., Abbas, L., Coutinho, O., Opara, S., Najaf, H., Kasperek, D., Pokhrel, K., Li, X., Tiquia-Arashiro, S. Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: advances, challenges, and future perspectives // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – Vol. 14. – P. 1304081. – DOI: 10.3389/fmicb.2023.1304081.

14. Kadier, A., Ilyas, R.A., Huzaifah, M.R.M., Harihastuti, N., Sapuan, S.M., Harussani, M.M., Azlin, M.N.M., Yuliasni, R., Ibrahim, R., Atikah, M.S.N., Wang, J., Chandrasekhar, K., Islam, M.A., Sharma, S., Punia, S., Rajasekar, A., Asyraf, M.R.M., Ishak, M.R. Use of industrial wastes as sustainable nutrient sources for bacterial cellulose (BC) production: Mechanism, advances, and future perspectives // *Polymers (Basel)*. – 2021. – Vol. 13, No. 19. – P. 3365. – DOI: 10.3390/polym13193365.

15. Khan H., Kadam A., Dutt D. Carbohydrate Polymers [Text] // Carbohydr Polym. – 2020. – Vol. 229. – P. 115513. – doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115513.
16. Lupascu, R.E., Ghica, M.V., Dinu Pirvu, C.E., Popa, L., Velescu, B.S., Arsene, A.L. An overview regarding microbial aspects of production and applications of bacterial cellulose // *Materials*. – 2022. – Vol. 15. – P. 1–14.
17. Moniri M., Boroumand Moghaddam A., Azizi S., Abdul Rahim R., Bin Ariff A., Zuhainis Saad W., Navaderi M., Mohamad R. Production and Status of Bacterial Cellulose in Biomedical Engineering // *Nanomaterials*. – 2017. – Vol. 7, №9. – P. 257. – [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://doi.org/10.3390/nano7090257>.
18. Nicolas, W.J., Ghosal, D., Tocheva, E.I., Meyerowitz, E.M., Jensen, G.J. Structure of the bacterial cellulose ribbon and its assembly-guiding cytoskeleton by electron cryotomography // *Journal of Bacteriology*. – 2021. – Vol. 203. – DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00371-20>.
19. Pasaribu K.M., Gea S., Ilyas S., Tamrin T., Radecka I. Characterization of Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing in Different Order Impregnation of Chitosan and Collagen // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, №11. – P. 1511. – DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10111511>.
20. Portela, R., Leal, C.R., Almeida, P.L., Sobral, R.G. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications // *Microbial Biotechnology*. – 2019. – Vol. 12, No. 4. – P. 586-610. – DOI: 10.1111/1751-7915.13392.
21. Rahman, S.S.A., Vaishnavi, T., Vidyasri, G.S., Sathya, K., Priyanka, P., Venkatachalam, P., Karuppiyah, S. Production of bacterial cellulose using *Gluconacetobacter kombuchae* immobilized on *Luffa aegyptiaca* support // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, No. 1. – P. 2912. – DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82596-4>
22. Reshmy R., Philip E., Thomas D., Madhavan A., Sindhu R., Binod P., Varjani S., Awasthi M.K., Pandey A. Bacterial nanocellulose: engineering, production, and applications // *Bioengineered*. – 2021. – Vol. 12, №2. – P. 11463–11483. – DOI: 10.1080/21655979.2021.2009753.

23. Raut M.P., Asare E., Syed Mohamed S.M.D., Amadi E.N., Roy I. Bacterial Cellulose-Based Blends and Composites: Versatile Biomaterials for Tissue Engineering Applications // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, №2. – P. 986. – DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24020986>.

24. Römling, U., Galperin, M.Y. Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions // *Trends in Microbiology*. – 2015. – Vol. 23, No. 9. – P. 545-557. – DOI: [10.1016/j.tim.2015.05.005](https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.05.005).

25. Rühs, P.A., Storz, F., López Gómez, Y.A., Haug, M., Fischer, P. 3D bacterial cellulose biofilms formed by foam templating // *NPJ Biofilms and Microbiomes*. – 2018. – Vol. 4. – P. 21. – DOI: <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0064-3>.

26. Santos, S.M., Carbajo, J.M., Gómez, N., Ladero, M., Villar, J.C. Modification of bacterial cellulose biofilms with xylan polyelectrolytes // *Bioengineering*. – 2017. – Vol. 4. – P. 93. – DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering4040093>.

27. Singhanian, R.R., Patel, A.K., Tsai, M.L., Chen, C.W., Di Dong, C. Genetic modification for enhancing bacterial cellulose production and its applications // *Bioengineered*. – 2021. – Vol. 12, No. 1. – P. 6793–6807. – DOI: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1968989>.

28. Singh, O., Panesar, P.S., Chopra, H.K. Response surface optimization for cellulose production from agro industrial waste by using new bacterial isolate *Gluconacetobacter xylinus* C18 // *Food Science and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 26, No. 4. – P. 1019-1028. – DOI: [10.1007/s10068-017-0143-x](https://doi.org/10.1007/s10068-017-0143-x).

29. Subbiahdoss G., Osmen S., Reimhult E. Biofilm [Text] // *Biofilm*. – 2022. – Vol. 26. – P. 100071. – doi: [10.1016/j.bioflm.2022.100071](https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2022.100071).

30. Sun, Z., Li, X., Tang, Z., Li, X., Morrell, J.J., Beaugrand, J., Yao, Y., Zheng, Q. Antibacterial films made of bacterial cellulose // *Polymers*. – 2022. – Vol. 14. – P. 3306. – DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14163306>.

31. Swinger S., Gupta A., Gibson H., Kowalczyk M., Heaselgrave W., Radecka I. Recent Advances and Applications of Bacterial Cellulose in Biomedicine //

Polymers. – 2021. – Vol. 13, №3. – P. 412. – [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://doi.org/10.3390/polym13030412>.

32. Tran T., Billet K., Torres-Cobos B., Vichi S., Verdier F., Martin A., Alexandre H., Grandvalet C., Tourdot-Maréchal R. Use of a Minimal Microbial Consortium to Determine the Origin of Kombucha Flavor // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 836617. – DOI: 10.3389/fmicb.2022.836617.

33. Vernon-Parry, K. Scanning electron microscopy: an introduction // *III-Vs Review.* – 2000. – Vol. 13, No. 4. – P. 44.

34. Wang B., Rutherford-Markwick K., Naren N., Zhang X.X., Mutukumira A.N. Microbiological and Physico-Chemical Characteristics of Black Tea Kombucha Fermented with a New Zealand Starter Culture // *Foods.* – 2023. – Vol. 12, №12. – P. 2314. – DOI: 10.3390/foods12122314.

35. Wang B., Rutherford-Markwick K., Zhang X.-X., Mutukumira A.N. Kombucha: Production and Microbiological Research // *Foods.* – 2022. – Vol. 11, №21. – P. 3456. – DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11213456>.

36. Wood, J., van der Gast, C., Rivett, D., Verran, J., Redfern, J. Reproducibility of Bacterial Cellulose Nanofibers Over Sub-Cultured Generations for the Development of Novel Textiles // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* – 2022. – Vol. 10. – P. 876822. – DOI: 10.3389/fbioe.2022.876822.

37. Zhong C. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* – 2020. – Vol. 8. – URL: <https://www.frontiersin.org/journals/bioengineering-and-biotechnology/articles/10.3389/fbioe.2020.605374>. – DOI: 10.3389/fbioe.2020.605374.

Науково-практична міжнародна дистанційна конференція,
Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині,
22 березня 2024 року, Харків

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ**

**MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, VIROLOGY AND IMMUNOLOGY**

**МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
В СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ**

**MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL RESEARCH
IN MODERN MEDICINE**

**Матеріали
III Науково-практичної міжнародної
дистанційної конференції, 22 березня 2024 року, Харків**

**Materials of the III Scientific and Practical International
Distance Conference, Kharkiv, March 22, 2024**

**ХАРКІВ
KHARKIV**

2024



Науково-практична міжнародна дистанційна конференція,
Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині,
22 березня 2024 року, Харків

Балак О.К., Мішина М.М., Мозгова Ю.А., Марченко І.А., Балак С.О., Балак В.О., Балак Ю.О.....	87
КРИТЕРІЇ СКРИНІНГУ ПРОДУЦЕНТІВ БАКТЕРІОЦИНІВ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	
Балко О.Б., Балко О.І., Войцеховський В.Г., Авдєєва Л.В.....	88
МЕХАНІЗМИ ПРОХОДЖЕННЯ <i>Toxoplasma gondii</i> ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЕНЦЕФАЛІЧНИЙ БАР'ЄР ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ	
Белова І. О., Мещерякова І. П.	90
МІКРОБІОЛОГІЯ КАТАСТРОФ – НОВА СФЕРА ДОСЛІДЖЕНЬ	
Білик М. С., Гейдеріх О. Г.	92
МЕДИЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ: ТЕНДЕНЦІЇ ТА ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ В СУЧАСНОМУ СВІТІ	
Бріт В. М., Гейдеріх О. Г.	93
ПЕРСПЕКТИВИ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ	
Валова К.О., Федько М.М., Волошина І.М.....	95
БАКТЕРІАЛЬНІ ПІГМЕНТИ ТА ЇХ БІОЛОГІЧНА РОЛЬ	
Васильченко В. С., Гейдеріх О. Г.	96
КЛІТИННА СТІНКА MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	
Васильченко В.С.....	99
ВПЛИВ ЕКЗОІНДУКТОРІВ QUORUM SENSING НА АНТИБІОПЛІВКОВУ ДІЮ ПОХІДНОГО АРИЛАЛІФАТИЧНИХ АМІНОСПИРТІВ	
Вринчану Н. О., Бойко І. О., Ніженковська І. В., Івженко О. К., Гуменюк Н. І., Короткий Ю.В.....	100
РІВЕНЬ ФАКТОРУ НЕКРОЗУ ПУХЛИНИ АЛЬФА У ПАЦІЄНТІВ З АКСІАЛЬНИМ СПОНДИЛОАРТРИТОМ І LONG COVID	
Грішина О.І., Менкус О.В.	102
ЗМІНА ТЕМПЕРАТУРИ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОДУЦЕНТІВ ПРОТЕАЗ ЯК ОДИН З ГОЛОВНИХ ПАРАМЕТРІВ ВПЛИВУ НА ЇХ АКТИВНІСТЬ	
Гудзенко О.В.....	103
АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ НАНОЧАСТОК МІДІ	
Гусейнова К.Е., Косинська Т.В., Писаренко П.О., Волошина І.М.....	104
ЕТИОЛОГІЧНА РОЛЬ <i>CANDIDA ALBICANS</i> У ВИНИКНЕННІ ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ЛОР-ОРГАНІВ	
Звір Г. І., Понайда К. В.	105

Науково-практична міжнародна дистанційна конференція,
Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині,
 22 березня 2024 року, Харків

кілька циклів розщеплення та подвоєння молекул ДНК, зі зразка за 20–30 циклів можна отримати достатню для аналізу кількість матеріалу. Метод ДНК-гібридизації використовує ДНК-зонди – короткі фрагменти ДНК збудників захворювань, які позначено за допомогою радіоактивних міток або спеціальних ферментів. Якщо у зразках є ДНК відповідного патогену, то після переведення ДНК в одноланцюгову форму зонд з'єднується з ним за рахунок своєї комплементарності. А такий комплекс вже легко виявляється за допомогою мітки зонду.

Методи лабораторної діагностики в клініці інфекційних хвороб мають важливе значення для постановки етіологічного діагнозу. При позитивному результаті вони мають вирішальну роль. Мікробіологічні дослідження сьогодні займають особливе місце, що зумовлено зростанням інфекційних ризиків громадському здоров'ю та біологічній безпеці, у тому числі пов'язаних з загрозами поширення епідемій - появою «нових» (COVID-19) та поверненням «старих» (кір, туберкульоз) інфекцій, які загрожують поширенням мікроорганізмів з множинною резистентністю до антимікробних препаратів, небезпекою біотероризму, розвитком синтетичної мікробіології, що дозволяє синтезувати "нові" збудники або "реанімувати старі" з наданням їм більш вірулентних властивостей. У зв'язку з цим виникає потреба розробки сучасних методичних підходів для підготовки нових фахівців - медичних мікробіологів.

Висновки. Мікробіологічна наука в нашій країні стоїть на варті здоров'я народу. Розгорнута широка мережа бактеріологічних лабораторій та науково-дослідних інститутів, основними напрямками роботи яких є діагностика та профілактика інфекційних хвороб, що має за мету зниження рівня поширення інфекцій. Загальна мета роботи мікробіологічних лабораторій – своєчасне виявлення збудників, в тому числі тих, які мають резистентність до антимікробних препаратів для впровадження ефективних методів лікування. Рання мікробіологічна діагностика інфекційних хвороб є основою для ефективної терапії, запобігання ускладнень і несприятливим результатам хвороби, підставою для проведення своєчасних протиепідемічних профілактичних заходів. Розвиток медичної мікробіології є важливим і вкрай необхідним завданням – мікробіологія має стати науковою та практичною основою профілактики інфекційних хвороб.

ПЕРСПЕКТИВИ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЦЕЛЮЛОЗИ

Валова К.О.¹, Федько М.М.², Волошина І.М.¹

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

²ТОВ «Фармхім», м. Шостка, Україна
i_woloschina@yahoo.com

Науково-практична міжнародна дистанційна конференція,
Мікробіологічні та імунологічні дослідження в сучасній медицині,
 22 березня 2024 року, Харків

Бактеріальна целюлоза (БЦ) є чистим і кристалічним матеріалом, створеним аеробними бактеріями. Ми досліджуємо асоціацію мікроорганізмів *Комбуча* (*Medusomyces gisevii*) для отримання біоплівки та гелю БЦ за допомогою зміни компонентів поживного середовища та співвідношення джерел вуглецю/азоту. В залежності від походження чайного гриба та складу поживного середовища склад мікроорганізмів може бути різним, але найчастіше фіксуються бактерії родини *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* та *Komagataeibacter*. БЦ викликала значний інтерес завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям, які відрізняються від рослинної целюлози. Хоча бактеріальна і рослинна целюлоза мають однакову молекулярну формулу $((C_6H_{12}O_6)_n)$, БЦ відрізняється від рослинної целюлози мікрофібрилярною структурою та відсутністю інших речовин, таких як лігнін, геміцелюлоза, пектин тощо. БЦ складається з одиниць глюкози, з'єднаних β -1,4 глікозидними зв'язками. Ці молекули ковалентно з'єднані ацетальними групами між групою $-OH$ C_4 і атомом вуглецю C_1 . В результаті целюлоза є лінійно-ланцюговим полімером з великою кількістю гідроксильних груп. Полярні $-OH$ групи утворюють багато водневих зв'язків з атомами кисню в одному або сусідньому ланцюзі. Бактеріальна целюлоза має унікальну наноструктуру, високу здатність поглинати воду, високий ступінь полімеризації, високу міцність та кристалічність. БЦ можна використовувати окремо або в поєднанні з різними компонентами, такими як біополімери та наночастки, для різних цілей, включаючи медичні продукти, електричні інструменти та харчові інгредієнти. Останнім часом біомедичні пристрої отримали велику увагу, оскільки зросла потреба в медичній технології для догляду за ранами, регенерації органів, діагностики захворювань і транспортування ліків. Одним з більш поширених клінічних застосувань бактеріальної целюлози є перев'язування ран. Хоча бактеріальна целюлоза забезпечує фізичний бар'єр, який перешкоджає мікроорганізмам досягти місця рани, бактеріальна целюлоза не має жодних антимікробних властивостей. Щоб підвищити ефективність бактеріальної целюлози для лікування ран, необхідно внести певні модифікації шляхом зміни структури целюлозної матриці або додавання вторинних компонентів у структуру. Дослідження показали, що місцеве застосування пов'язок на основі БЦ покращує процес загоєння опіків і хронічних травм. Порівняно зі звичайними пов'язками для ран, вони демонструють кращу ефективність у таких аспектах: сумісність з поверхнею рани (чудове покриття всіх контурів), збереження вологого середовища в рані, значне зменшення болю, прискорення реепітелізації та утворення грануляційної тканини, а також зменшення утворення рубців.

БАКТЕРІАЛЬНІ ПІГМЕНТИ ТА ЇХ БІОЛОГІЧНА РОЛЬ

Васильченко В. С., Гейдеріх О. Г

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

№ 00278



Науково-практична
міжнародна дистанційна
конференція
«МІКРОБІОЛОГІЧНІ ТА
ІМУНОЛОГІЧНІ
ДОСЛІДЖЕННЯ В
СУЧАСНІЙ МЕДИЦИНІ»

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ПРИКЛАДНОЇ ФАРМАЦІЇ
КАФЕДРА МІКРОБІОЛОГІЇ, ВІРУСОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ

Сертифікат

Цим засвідчується, що

Валова К.О.

брав(ла) участь у роботі Науково-практичної
міжнародної дистанційної конференції
«Мікробіологічні та імунологічні дослідження
в сучасній медицині»

22 березня 2024 р. м. Харків

Тривалість – 5 годин / 0,15 кредитів ЕКТС

Проректор з науково-педагогічної роботи
(інноваційної та науково-дослідної)
Національного фармацевтичного університету,
доктор фармацевтичних наук, професор

Завідувачка кафедри мікробіології, вірусології та імунології
доктор медичних наук, професор



І.М. Владимірова

Н.І. Філімонова

Конференція зареєстрована у ДУ
«Український інститут науково-
технічної експертизи та інформації»,
посвідчення № 544 від 19 грудня 2023 року



*IV Науково-практична
дистанційна конференція
«Мікробіологічні та
імунологічні дослідження
в сучасній медицині»
22 березня 2024 року*

*Національний фармацевтичний університет
Кафедра мікробіології, вірусології та
імунології*

Сертифікат

Цим засвідчується, що

Валова К.О.

*Прийняв(ла) участь у практичному тренінгу:
«Сучасні лабораторні підходи до діагностики інфекційних захворювань, що
передаються статевим шляхом», Харків, 22 березня 2024 р*

Досягнуті результати:

1. Підвищити рівень поінформованості слухачів з проблем інфекцій, що передаються статевим шляхом та репродуктивного здоров'я.
2. Ознайомити слухачів з сучасними методами діагностики ІПСШ, надати їх основні характеристики, переваги та недоліки, а також можливість застосування при різних формах ІПСШ.

Тривалість – 5 годин/ 0.15 ECTS кредитів

*The conference is registered at the State
University "Ukrainian Institute of Scientific
and Technical Expertise and Information",
certificate No. 544, December 19, 2023*

Доктор фармацевтичних наук, професор, проректор з науково-педагогічної роботи Національного фармацевтичного університету, професор кафедри фармакогнозії:

Доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету



Інна Владимірова

Наталія Філімонова

BIOSYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE FOR OBTAINING MEDICAL MATERIALS

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

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

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

³Institute 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

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

²ТОВ «Фармхім», м. Шостка, Україна

³Інститут 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 (SCOBY) 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 біоплівки 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).

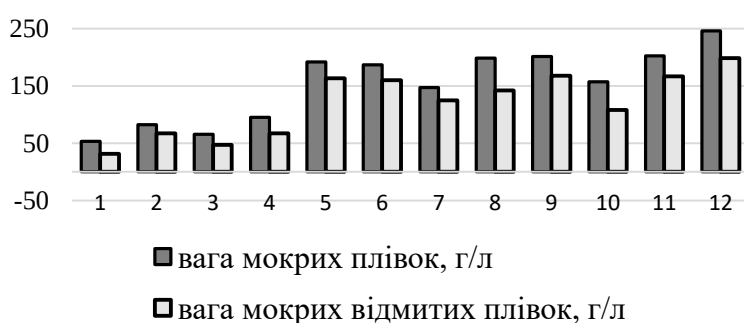


Рис. 1. Вага мокрих плівок вирощених на 12 різних субстратах.

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 води, що актуально при використанні їх у якості перев'язувальних медичних матеріалів.

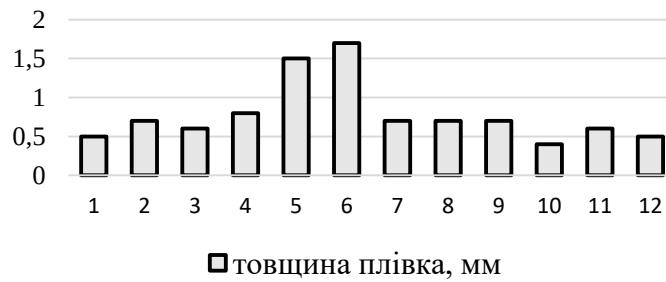


Рис. 2. Товщина мокрих відмитих плівок вирощених на 12 різних субстратах.

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

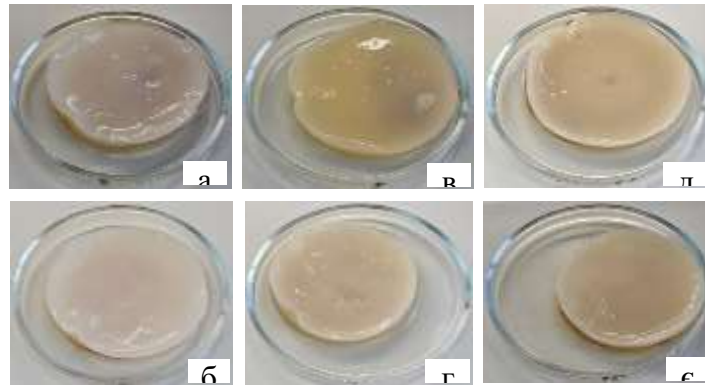


Рис. 3. Фотографії біоплівки вирощених на різних варіантах поживного середовищах (табл. 3): а – середовище № 5 (глюкоза, кукурудзяна мука), б – середовище № 6 (сахароза-глюкоза, кукурудзяна мука), в – середовище № 8 (глюкоза, дріжджовий екстракт), г – середовище № 9 (сахароза-глюкоза, дріжджовий екстракт),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

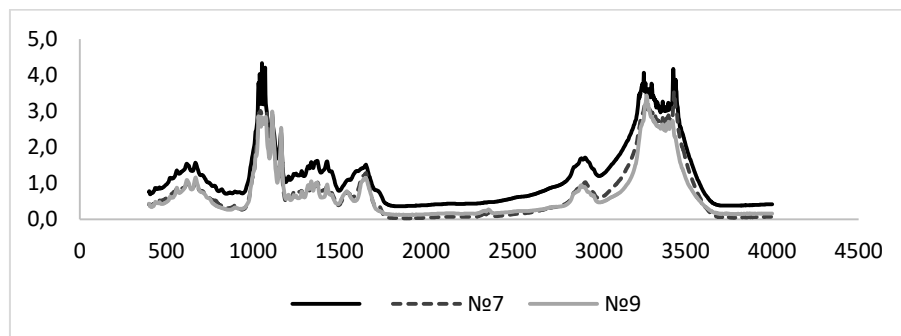


Рис. 4. Аналіз БЦ вирощених на середовищах № 5, № 7 та № 9 за допомогою інфрачервоної Фур'є-спектроскопії

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.bioflm.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.