

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.69:577.33

doi: 10.17223/19988591/53/2

**О.И. Киселева¹, С.В. Луценко², Н.Б. Фельдман², И.А. Гаврюшина³,
В.С. Садыкова³, М.А. Пигалева¹, М.С. Рубина⁴, Т.И. Громоных²**

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

²Первый московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова, г. Москва, Россия

³Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе, г. Москва, Россия

⁴Институт элементоорганических соединений
им. А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва, Россия

Структура популяции *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в статической культуре на различных источниках углерода

Работа выполнена при поддержке РФФИ в рамках
научных проектов No. 19-34-90088 и No. 18-29-06049 мк
и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Проведена оценка способности штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 к образованию мутантов, не синтезирующих пленки целлюлозы. Установлено, что при культивировании на средах с различными источниками углерода глюкозе, фруктозе, галактозе, сахарозе, лактозе и мальтозе штамм образует колонии двух морфологических фенотипов. Обнаружено, что популяции клеток, образующие гладкий блестящий фенотип колоний, способны к биосинтезу целлюлозы, тогда как клоны, образующие колонии мукоидного фенотипа, являются мутантами, неспособными к синтезу целлюлозы. Показано, что источник углеродного питания играет селективную роль в соотношении численности популяции целлюлозонегативных и целлюлозоположительных клеток. Показаны значительные различия в структуре пленок, синтезируемых штаммом *G. hansenii* GH 1/2008. Наиболее плотную ячеистую структуру, состоящую из слоев, расположенных параллельно поверхности, имеют пленки, синтезируемые на средах, содержащих фруктозу, глюкозу и сахарозу. Расстояние между слоями составляет около 5 мкм для глюкозы. Микроструктура гидрогелей представляет собой тончайшие полупрозрачные для электронного микроскопа листки, толщина которых соответствует 1–2 волокнам, разделенные областями с изотропным распределением волокон. Исследования гелей и пленок методом ИК Фурье-спектроскопии показали, что гели состоят также из волокон бактериальной целлюлозы.

Ключевые слова: *Gluconacetobacter hansenii*; бактериальная целлюлоза; целлюлозоположительные; целлюлозонегативные; микроструктура; гель-пленки.

Для цитирования: Киселева О.И., Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Гаврюшина И.А., Садыкова В.С., Пигалева М.А., Рубина М.С., Громовых Т.И. Структура популяции *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в статической культуре на различных источниках углерода // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2021. № 53. С. 22–46. doi: 10.17223/19988591/53/2

Введение

Бактериальная целлюлоза – природный полимер, обладающий рядом уникальных свойств, в первую очередь высокой степенью чистоты и отсутствием лигниновых, пектиновых и гемицеллюлозных примесей в отличие от растительной целлюлозы. Обладая механической прочностью, эластичностью и особой сетчатой укладкой волокон, бактериальная целлюлоза (БЦ) находит применение в широчайшем спектре отраслей, в том числе и в медицине [1–4]. Растущий интерес к данному полимеру обуславливает необходимость синтезировать его в больших количествах и ставит основной задачей поиск способов повышения продуктивности штаммов и оптимизации питательных сред. Среди выделенных продуцентов бактериальной целлюлозы большая часть относится к семейству Acetobacteraceae, в котором следует особо отметить представителей рода *Gluconacetobacter* [5–7], в том числе выделенных в России [8–11]. Известно, что выбор продуцента для биосинтеза целлюлозы влияет на ее конечные свойства. На данный момент существует огромное множество публикаций, связанных с разработкой питательных сред, оптимизацией их состава и условий культивирования целлюлозосинтезирующих бактерий с целью повышения их продуктивности [12–14]. Штаммы, относящиеся к разным видам, имеют различную продуктивность в зависимости от составов питательных сред и условий культивирования [2, 5].

В условиях стационарного жидкофазного культивирования все известные целлюлозосинтезирующие бактерии образуют однородную пленку на поверхности среды, которая выполняет важную роль носителя для иммобилизации клеток, таким образом обеспечивая им доступ к границам фаз воздух/жидкость, где поступление кислорода не лимитировано [15–17]. Однако при культивировании в условиях перемешиваемой культуры, несмотря на лучший доступ кислорода, большинство штаммов *G. xylinus* синтезирует целлюлозу в меньшем количестве и в форме глобул разных размеров [18–21]. Более низкий выход целлюлозы при культивировании продуцентов в условиях перемешивания авторы связывают с образованием в их популяции спонтанных мутантов, которые не синтезируют целлюлозу [22, 23]. В 1982 г. S. Valla с соавторами высказали предположение, что отсутствие лимита кислорода, создаваемое достаточной и равномерной аэрацией перемешиваемых культур, является решающим фактором, приводящим к появлению не синтезирующих целлюлозу клеток мутантов у штаммов *G. xylinus* [24]. Позднее установлено, что не синтезирующие целлюлозу мутанты (Cel⁻) штаммов

G. xylinus при росте на агаровых средах формируют мукоидную (неблестящую и плоскую) морфологию колоний, которая отличается от немучкоидных (выпуклых и глянцевого) колоний штаммов дикого типа, синтезирующих целлюлозу [25].

Однако авторы [25] связывают появление мутаций не с отсутствием лимита кислорода, а с источником углерода, на котором культивировали продуцент. В ряде исследований [21, 22] показано, что биосинтез целлюлозы у таких мутантов невозможен ввиду отсутствия у них двух ферментов – фосфоглюкомутазы и уридинфосфо-глюкопирофосфорилазы. Эти ферменты необходимы для синтеза UDP-глюкозы, которая является основным мономером для синтеза целлюлозы. Однако известно также, что спонтанные мутации в популяции целлюлозосинтезирующих бактерий возникают как в перемешиваемых, так и в статических культурах. В частности, спонтанные мутанты были изолированы из культуры *G. xylinus* ATCC 23769 в условиях стационарного культивирования [26, 27]. Впоследствии обнаружено, что при добавлении в питательную среду этанола можно сохранить продукцию целлюлозы и сдерживать появление таких мутантов у *G. xylinus* [5, 7, 28]. Исследований о влиянии условий культивирования и состава питательной среды на возникновение спонтанных фенотипических мутаций в популяции представителей *G. hansenii* неизвестно. Представители вида *G. hansenii*, так же, как и другие целлюлозосинтезирующие микроорганизмы, способны расти и в перемешиваемой культуре, образуя вместо пленки глобулы [29, 30]. Известно, что штаммы этого вида способны к синтезу значимого количества олигомеров глюкуроновой кислоты [31], что, вероятно, может снижать общую продукцию бактериальной целлюлозы. Использование продуцентов вида *G. hansenii* для получения бактериальной целлюлозы влечёт необходимость изучения структуры популяции и условий возникновения мутантов при культивировании на различных субстратах.

Цель данного исследования – оценить влияние источника углерода на продуктивность штамма бактерий *G. hansenii* GH 1/2008 и возникновение целлюлозонегативных мутантов в условиях стационарного культивирования.

Материалы и методики исследования

Получение инокулята. В качестве продуцента использовали штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008, выделенный в 2008 г. и депонированный в ВКПМ (В-10547) [8]. Штамм хранили на агаровой питательной среде Хестрина–Шрамма (HS) [18], имеющей следующий состав (г/л): глюкоза – 20, пептон – 5, дрожжевой экстракт – 5, Na_2HPO_4 – 2,7, лимонная кислота $\times \times \text{H}_2\text{O}$ – 1,15, агар – 15. Инокулят получали путем переноса колонии из рабочей агаровой культуры на жидкую питательную среду Хестрина–Шрамма в колбы объемом 500 мл, содержащие 100 мл жидкой среды, и затем инкубировали без перемешивания при температуре 30 °С в течение 48 ч. После

инкубации полученную культуру энергично встряхивали до высвобождения иммобилизованных клеток *G. hansenii* из синтезируемой целлюлозной пленки с последующей фильтрацией суспензии культуры через стерильные сетки и затем полученную биомассу клеток осаждали путем центрифугирования (MiniSpin Plus, «Eppendorf», Германия) со скоростью 10 000 об./мин. Полученную суспензию клеток использовали в качестве инокулята культуры клеток для последующих экспериментов. Титр клеток в инокуляте доводили до плотности клеток $4,5-5 \times 10^8$ КОЕ/мл с использованием спектрофотометра UV-1601 PC («Shimadzu», Япония).

Жидкофазное стационарное культивирование продуцента бактериальной целлюлозы *G. hansenii* GH 1/2008. Культивирование штамма *G. hansenii* GH 1/2008 проводили на модифицированной среде Хестрина–Шрамма (HS), содержащей в качестве источников углерода моносахариды (глюкозу, фруктозу и галактозу) и дисахариды (сахарозу, лактозу и мальтозу). Концентрация углеводов в каждом случае составляла 4%. Жидкие питательные среды (100 мл) разливали в плоскодонные колбы объемом 250 мл, стерилизовали автоклавированием при температуре 100 °С и давлении 101,32 кПа в течение 10 мин. После охлаждения в питательную среду вносили 1 мл инокулята с титром $4,5-5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Культивирование проводили при температуре 27 °С в течение 10 суток в термостате («Binder», Германия) до образования полимера в виде пленки или геля. Полученный экзополимер бактериальной целлюлозы отделяли фильтрованием от культуральной жидкости.

Изучение морфологии колоний и численности популяции. Для оценки различий в морфологии колоний по фенотипам диких и возникающих в результате спонтанных мутаций клеток проводили посеvy клеток, взятых из культуральной жидкости и из смывов с пленок, полученных в конце культивирования, на модифицированную агаризованную среду Хестрина–Шрамма, содержащую тот же источник углерода в той же концентрации, что и при культивировании. Из 1 мл каждой культуральной жидкости готовили серию разведений стерильной водой и высевали на агаризованную среду с тем источником углерода, на котором продуцент до этого выращивали в жидкой питательной среде. Смывы клеток из пленок получали в стерильной водопроводной воде путем интенсивного встряхивания в течение 6 ч с дальнейшим посевом методом серийных разведений. Посевы инкубировали при температуре 30 °С в течение 4 суток, после чего оценивали визуально морфологию колоний.

Для определения способности пленки бактериальной целлюлозы к биосинтезу выросшую колонию каждого морфотипа вырезали и перемещали в пробирки со стерильными жидкими питательными средами, содержащими моносахариды (глюкозу, фруктозу и галактозу) и дисахариды (сахарозу, лактозу и мальтозу) в концентрации 4% и инкубировали при температуре 30 °С в течение 72 ч. Затем 100 мкл культуральной жидкости из каждой среды снова переносили в 10 мл свежей питательной среды в пробирках и инкубировали таким же образом. Последнюю процедуру повторяли четыре последующих

пассажа. Если при пересевах отобранный клон колонии не синтезировал пленки, морфотип считали мутантным и стабильным. При образовании пленок в течение 4 пассажей морфотип считали диким и стабильным. Численность клеток для каждого эксперимента определяли как общий показатель по количеству выросших жизнеспособных колоний каждого морфотипа на агаровой среде в соответствующем разведении. Колонии подсчитывали после 4 суток инкубирования при температуре 30 °С, а количество клеток выражали как число колониеобразующих единиц на мл (КОЕ/мл).

Для оценки стабильности морфотипов мукоидные и блестящие колонии вырезали и затем суспензировали в 10 мл стерильной воды. Полученные суспензии сеяли на плотные агаровые среды, содержащие моносахариды (глюкозу, фруктозу и галактозу), и дисахариды (сахарозу, лактозу и мальтозу), и инкубировали при температуре 30 °С в течение 4 суток. Затем проводили оценку морфологии выросших колоний.

Определение выхода целлюлозы. Выход целлюлозы выражали в виде абсолютно сухой массы (а.с.м.) на единицу объема культуральной среды [19]. Полученный экзополимер целлюлозы очищали от клеток отмыванием в растворе буфера RIPA («Thermo Scientific», США) следующего состава: 25 мМ Трис-НСl, рН 7–8, 150 мМ NaCl, 0,5% дезоксихолат натрия, 1% Тритон X-100, 0,1% SDS. Образцы бактериальной целлюлозы промывали в буфере в течение 3 суток, используя вращающийся шейкер при 150 об./мин. Моющие растворы меняли каждые 24 ч. Затем образцы промывали дистиллированной водой в течение 3 суток, меняя воду каждые 24 ч [32]. Очищенные пленки целлюлозы сушили до постоянного веса при 105 °С. Продуктивность штамма на средах рассчитывали по формуле

$$P = m/V \times 1000,$$

где m – средняя масса полученных абсолютно сухих пленок, г; V – объем среды в одной повторности, мл.

Атомно-силовая микроскопия. Для изучения морфологии и локальных свойств поверхности пленок бактериальной целлюлозы и морфологии клеток продуцента была использована атомно-силовая микроскопия (АСМ). Клетки из колоний, выращенных на агаризованных средах, снимали стерильной петлей и помещали в физраствор. Затем суспензию наносили на поверхность свежесколотой слюды и высушивали на воздухе, как описано в работе М. Пигалевой с соавторами (Pigaleva et al.) [33]. Изображения получали с помощью сканирующего зондового микроскопа MultiMode IIIa («Bruker», США), позволяющего оценить наноструктуру объекта с высоким пространственным разрешением. Исследование проводили на воздухе, в контактном режиме с использованием кантилеверов из нитрида кремния серии NP с константой жесткости 0,06 Н/м и радиусом кривизны 8 нм («Bruker», США). Обработку изображений выполняли с помощью программы FemtoScan 001 («Центр перспективных технологий», Россия).

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Пространственную организацию синтезируемого полимера исследовали на сканирующем элек-

тронном микроскопе SU8000 («Hitachi», Япония). Образцы замораживали при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, после чего подвергали глубокой заморозке в жидком азоте и лиофильно сушили в течение 2 суток при температуре $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ и давлении 0,07 мбар в камере Alpha 1-2 LD («Christ», Германия). Образцы фиксировали в алюминиевый держатель для сколов с помощью проводящего адгезива и запыляли платино-палладиевым сплавом (80/20) методом магнетронного распыления, как описано в работе А.С. Кашина и др. [34]. Изображения получали в режиме вторичных электронов при ускоряющем напряжении 10 кВ и рабочем расстоянии 7–15 мм.

Инфракрасная (ИК) Фурье-спектроскопия. ИК Фурье-спектры пленок и гелей БЦ получали на спектрометре Nexus FT-IR («Thermo Nicolet», США) в режиме пропускания 128 сканов с разрешением 2 см^{-1} . Перед съемкой образцы высушивали до постоянной массы на воздухе при относительной влажности около 50%.

Статистическая обработка данных. Полученные данные обработаны с использованием параметрических критериев, данные представлены в виде средней арифметической (M) из пяти повторностей (n), стандартной ошибке среднего (m_M); статистическую значимость различий оценивали по t -критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты исследования и обсуждение

Интерес к бактериальной целлюлозе обуславливает необходимость синтезировать её в больших количествах в промышленных масштабах. Задачу повышения продуктивности исследуемого штамма *G. hansenii* GH 1/2008 решали путем подбора оптимального источника углерода в питательной среде при стационарных условиях культивирования. Получаемый экзополимер бактериальной целлюлозы оценивали как с позиций учета его абсолютно сухой массы, так и исследования формирующейся при культивировании его структуры. Продукцию целлюлозы и общую численность клеток в культуральной жидкости сравнивали на 10-е сутки культивирования штамма *G. hansenii* GH 1/2008 (табл. 1), так как в этот период уже четко формировались различия в форме образующегося экзополимера. В результате анализа установлено, что на средах с фруктозой, глюкозой и сахарозой продуцент *G. hansenii* GH 1/2008 синтезирует плотную пленку, тогда как на средах с мальтозой, лактозой и галактозой образуется гель (рис. 1). Максимальное количество абсолютно сухого веса полимера, синтезированного штаммом *G. hansenii*, получено на средах с фруктозой и сахарозой (табл. 1).

Анализ с помощью сканирующей электронной микроскопии показал значительные различия в структуре пленок и гелей, синтезируемых штаммом *G. hansenii* GH 1/2008 при росте на различных источниках углерода. Наиболее плотную структуру имела пленка, выращенная на среде, содержащей фруктозу. Она имеет слоистую структуру, расстояние между слоями около 2 мкм, пространство между слоями заполнено неупорядоченными волокнами БЦ.

Таблица 1 [Table 1]

Продуктивность полимера бактериальной целлюлозы (г/л) у штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на средах с различными углеводами
 [Productivity of the bacterial cellulose polymer in the strain *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 on media with different carbohydrates], $M \pm m$

Продукция полимера (абсолютный сухой вес, г/л) на средах с различными источниками углерода [Polymer production (absolute dry weight, g/L) on media with various carbon sources]					
Фруктоза [Fructose]	Сахароза [Sucrose]	Глюкоза [Glucose]	Мальтоза [Maltose]	Лактоза [Lactose]	Галактоза [Galactose]
13,2±0,50	12,7±0,70	11,8±0,60	1,4±0,10	1,2±0,14	0,9±0,02

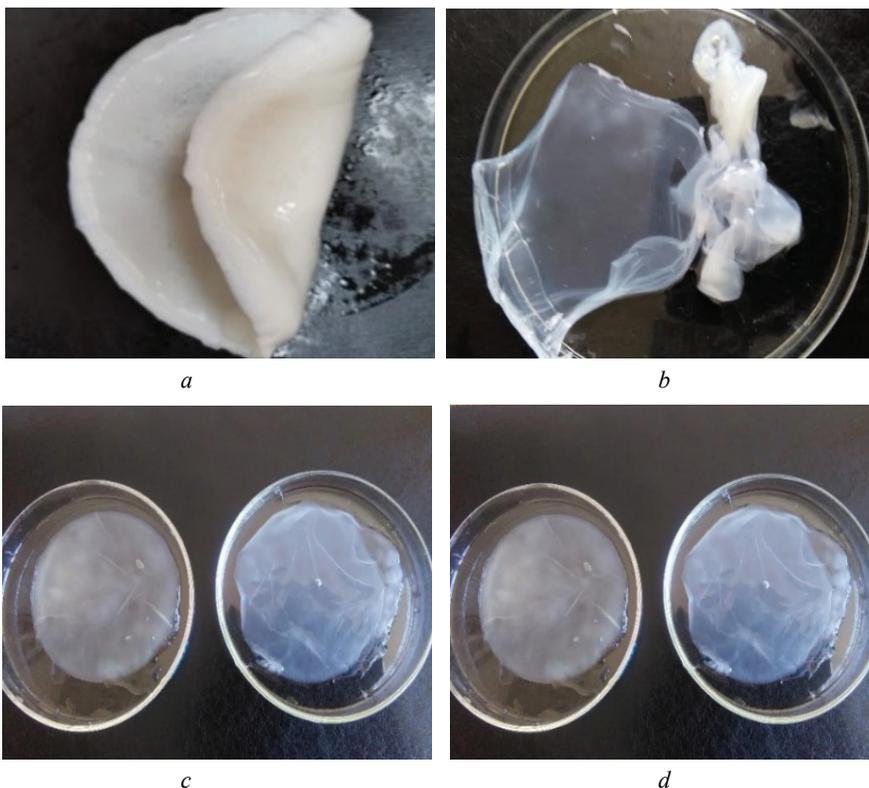


Рис. 1. Внешний вид образуемого полимера бактериальной целлюлозы, синтезируемого штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на средах с фруктозой, глюкозой или сахарозой (а), мальтозой (b), лактозой (c) и галактозой (d) (фото И.А. Гаврюшиной)
 [Fig. 1. The overall look of the bacterial cellulose polymer, synthesized by *G. hansenii* GH 1/2008 on media containing Fructose, Glucose or Sucrose (a), Lactose (b), Maltose (c) and Galactose (d). Photo by Irina Gavryushina]

Структура плёнок на основе сахарозы и глюкозы весьма сходна. В целом ее можно описать как ячеистую, но при ближайшем рассмотрении видно,

что она состоит из слоев, расположенных параллельно поверхности пленки (на рис. 1 соответствует вертикальному направлению) на расстоянии около 5 мкм для глюкозы. Пространство между слоями в свою очередь поделено на ячейки более тонкими перпендикулярными перегородками с характерным масштабом 5 мкм. Для мальтозы слоистая структура наблюдается только вблизи поверхности, остальная масса представляет собой изотропный гель из хаотически переплетенных волокон. Полимер, синтезируемый штаммом на среде, содержащей галактозу, образовал гель-пленку толщиной около 25 мкм. На рис. 2 видны как поперечный скол, так и поверхность пленки. Микроструктура представляет собой тончайшие полупрозрачные для электронного микроскопа листки, толщина которых соответствует 1–2 волокнам.

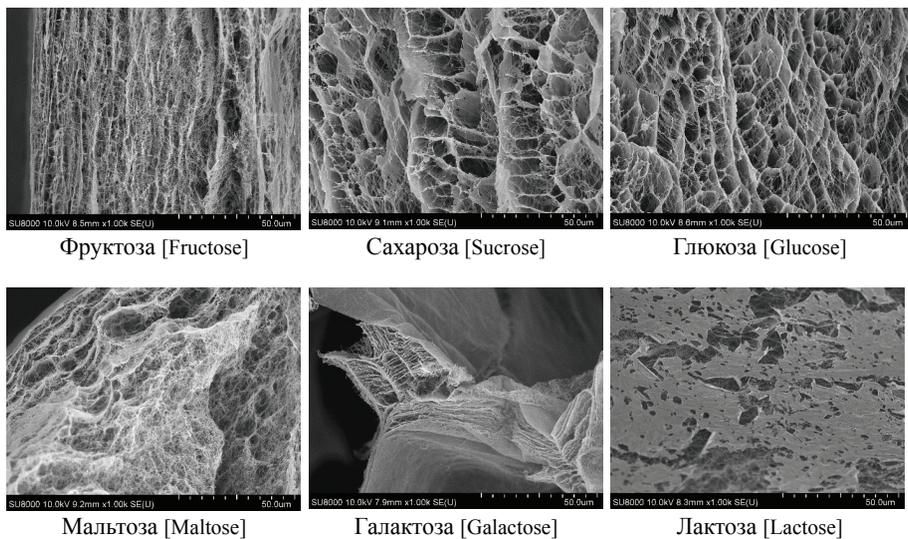


Рис. 2. Микроструктура гель-пленок, синтезируемых штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на средах с различными источниками углерода: сканирующая электронная микроскопия. Показаны поперечные сколы пленок.

Для фруктозы, сахарозы и глюкозы поверхность пленок параллельна вертикальной оси на фотографиях. Для лактозы показан вид в плоскости пленки [Fig. 2. The microstructure of gel-films, synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 on media containing various carbon sources: scanning electron microscopy. Cross-sections of films are shown. For fructose, sucrose and glucose the film surface is parallel to the vertical axis of the images. For lactose, the film surface is shown]

Пленка, синтезируемая на среде с лактозой, образуется настолько тонкой (менее 5 мкм), что получить поперечный скол при закреплении в держатель не удалось. На рис. 2 показана плоскость пленки. Слоистые структуры в данном случае не сформировались, на поверхности наблюдается начальный этап формирования такого слоя.

На электронных микрофотографиях пленок и гелей, синтезируемых на средах с различными источниками углерода, обнаруживается боль-

шое количество иммобилизованных клеток продуцента (рис. 3). Пленки (рис. 3, *a*) имеют периодическую слоистую структуру. В гелевых образцах все структуры типа листов, состоящих из переплетенных волокон, если и встречаются, то расположены на больших расстояниях, порядка 50–100 мкм. Такие листы имеют толщину порядка диаметра волокна: на электронных фотографиях видно, что они полупрозрачные и изгибаются, образуя складки.

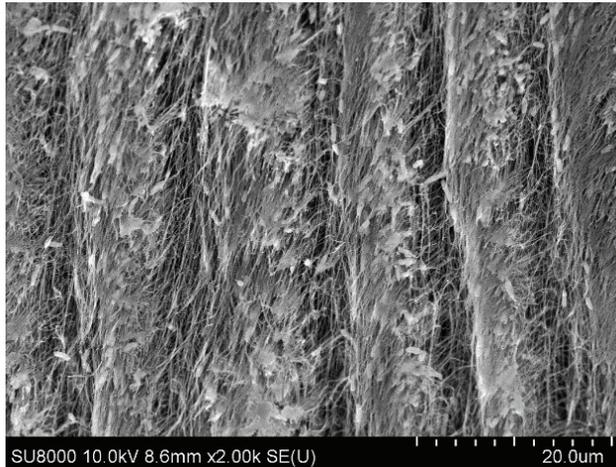
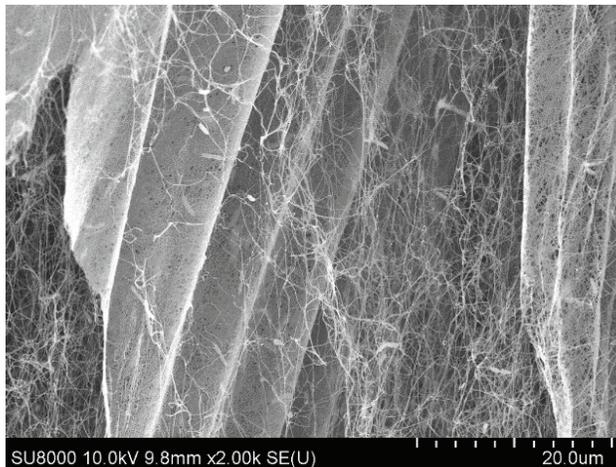
*a**b*

Рис. 3. Иммобилизованные клетки продуцента *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на пленке (*a*) и на геле (*b*), синтезируемом на среде с мальтозой: сканирующая электронная микроскопия
[**Fig. 3.** Cells of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 immobilized on the film (*a*) and the gel synthesized on a maltose-containing medium (*b*): scanning electron microscopy]

Исследования гелей и пленок методом ИК Фурье-спектроскопии показали, что гели состоят также из волокон БЦ. ИК Фурье-спектры пленок и гелей приведены на рис. 4. Спектры нормированы по пику 2897 см^{-1} , соответствующему валентным колебаниям $-\text{CH}$. Спектры пленок и гелей содержат пики, характерные для бактериальной целлюлозы, ранее многократно описанные в литературе [35–37]: 1427 см^{-1} ($-\text{CH}_2$ у C6), 1161 см^{-1} (C–O–C в пиранозном кольце), 1111 см^{-1} (C–H валентные асимметричные в пиранозном кольце), 1058 см^{-1} (деформационные C–O–C в пиранозном кольце), 1020 см^{-1} (C–O), 895 см^{-1} (β -гликозидные связи между сахарами). Спектры пленок и гелей практически не отличаются друг от друга. Единственное различие по интенсивности отмечено для пика $1\ 638\text{ см}^{-1}$, обусловленного присутствием связанной воды [36]. Как и следует ожидать, ее содержание выше в образцах гелей, так как контактов между волокнами меньше, и на поверхности волокон больше групп, доступных для гидратации. Известно, что штаммы этого вида в неблагоприятных условиях синтезируют олигомеры глюкуроновой кислоты [31]. Пиков, соответствующих карбоксильным и карбонильным группам, присутствующим в глюкуроновой кислоте, на спектрах не выявлено, что свидетельствует о том, что синтеза заметного количества глюкуроновой кислоты в данных условиях не происходит. Различия в консистенции гелей объясняются данными СЭМ, показывающими, что плотность укладки волокон для геля значительно ниже, чем у пленок.

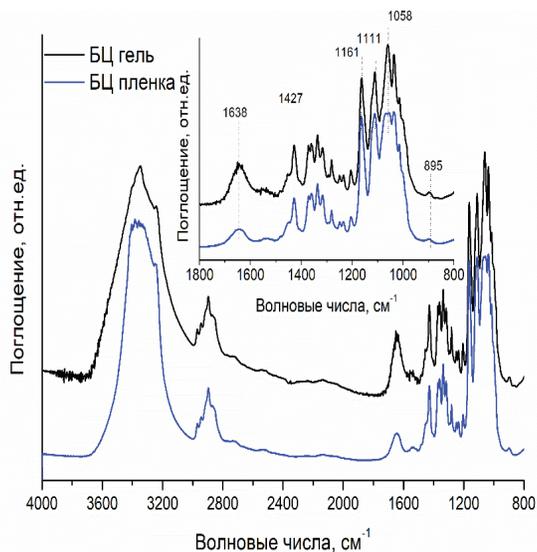


Рис. 4. ИК Фурье-спектры полимера, синтезируемого штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в виде пленки и геля
[Fig. 4. FTIR spectroscopy of the polymer synthesized by *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 in the form of film (blue color line) and gel (black color line).
On the X-axis - Wave numbers, cm^{-1} ; on the Y-axis - Absorption, a.u.]

Следует отметить, что в гелях слоистые структуры типа листов образуются редко, волокна в гелях имеют пространственную организацию, близкую к изотропной. Ранее мы показали [38], что в случае, когда получаемый полимер имеет гелеобразную консистенцию и низкие значения модуля Юнга, его микроструктура не является слоистой.

Общая численность жизнеспособных клеток значительно выше в пленках при росте продуцента на средах с глюкозой, фруктозой и сахарозой, чем на гелях, синтезируемых на галактозе, мальтозе и лактозе (табл. 2). Более высокая численность клеток продуцента отмечена и в культуральной жидкости после культивирования штамма на средах с фруктозой, глюкозой и сахарозой. При этом численность клеток продуцента на этих источниках углерода как в культуральной жидкости, так и в иммобилизованных пленках достоверно не различается. Незначительное число КОЕ/мл продуцента отмечено на средах с галактозой и мальтозой и с лактозой. Интересно отметить, что показатель продуктивности полимера на среде с сахарозой равен среднему арифметическому значению для показателей продуктивности штамма на средах с глюкозой и фруктозой. Предположительно, это отражает тот факт, что сахароза содержит глюкозу и фруктозу в равных пропорциях. Численность клеток продуцента, иммобилизованных в пленках, при росте на среде с сахарозой также близка к среднему показателю таковой при росте продуцента на средах с глюкозой и фруктозой. Это подтверждает тот факт, что количество синтезируемого полимера пропорционально численности клеток продуцента.

Влияние условий культивирования и состава питательных сред на возникновение спонтанных мутаций ранее было установлено у штаммов *G. xylinus* рядом авторов, которые показали, что в условиях перемешивания при достаточном насыщении кислородом происходит появление большого количества спонтанных мутантов, не способных продуцировать целлюлозу [22–24]. Мы исследовали возможность появления спонтанных мутаций, возникающих в популяции штамма *G. hansenii* GH 1/2008 в стационарных условиях культивирования на различных источниках углерода. Условно принимая, что одна колония образована из одной клетки, количество выросших мукоидных колоний приравнивали к количеству образовавшихся мутантных (Cel-) клеток, а количество гладких (блестящих) – к числу клеток дикого (Cel+) типа. Изначально используя инокулят из колонии немучоидного фенотипа, в стационарных условиях культивирования у штамма *G. hansenii* GH 1/2008 на различных источниках углерода мы выявляли колонии с двумя доминирующими фенотипами: немучоидные гладкие выпуклые и мукоидные плоские (рис. 5).

Исследования численности популяции в посевах показало, что в культуральной жидкости и в пленках после 10 суток культивирования количество клеток, образующих гладкие немучоидные колонии на агаровых средах, максимально в образцах, полученных на средах, содержащих фруктозу и сахарозу, т.е. именно те сахара, на которых продуктивность на 1 л культуральной жидкости выше.

Таблица 2 [Table 2]

Численность клеток *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в культуральной жидкости и пленке при культивировании на различных питательных средах
 [The number of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 cells in the cultural liquid and in the film when cultivated on different media], $M \pm m$

Источник углерода в среде [Carbon source in the medium]	Численность жизнеспособных клеток (КОЕ)/мл [Number of living cells (CFU)/ml]	
	в 1 мл культуральной жидкости [per 1 ml of cultural liquid]	в 1 г а.с.в пленки / геля [per g of a.d.w. of film/gel]
Фруктоза [Fructose]	$3,3 \pm 0,6 \times 10^6$	$5,1 \pm 0,3 \times 10^7$
Сахароза [Sucrose]	$2,9 \pm 0,3 \times 10^6$	$4,5 \pm 0,6 \times 10^7$
Глюкоза [Glucose]	$2,6 \pm 0,2 \times 10^6$	$3,8 \pm 0,1 \times 10^7^*$
Мальтоза [Maltose]	$4,3 \pm 0,05 \times 10^4^*$	$1,4 \pm 0,2 \times 10^6^*$
Галактоза [Galactose]	$3,7 \pm 0,08 \times 10^4^*$	$2,2 \pm 0,1 \times 10^5^*$
Лактоза [Lactose]	$2,6 \pm 0,04 \times 10^4^*$	$5,6 \pm 0,5 \times 10^5^*$

* – статистически значимые различия, полученные на среде с сахарозой ($p < 0,05$).

[* - statistically significant differences from the data obtained on the medium with sucrose ($p < 0.05$)].

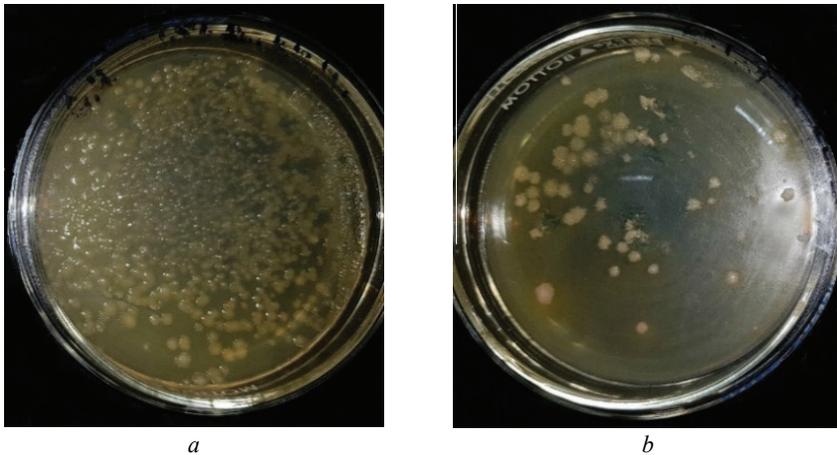


Рис. 5. Морфология гладких (a) и мукоидных (b) колоний штамма *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на питательной среде HS (фото В.С. Садыковой)
 [Fig. 5. The morphology of smooth (a) and mucoid (b) colonies of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 on HS medium (photo by Vera Sadykova)]

При этом в посевах образцов культуральной жидкости и смывов из пленок, полученных после культивирования на средах, содержащих галактозу и лактозу, количество мукоидных колоний было значительно выше. Относительное содержание мукоидных и гладких колоний в культуральной жидкости и пленках на различных питательных средах показано на рис. 6.

Полученные результаты дают основание предполагать, что источники углерода могут играть определенную роль в формировании внутривидовой структуры клонов продуцента бактериальной целлюлозы. Увеличение численности целлюлозонегативных клеток приводит к конкуренции за субстрат с популяцией целлюлозоположительных клеток.

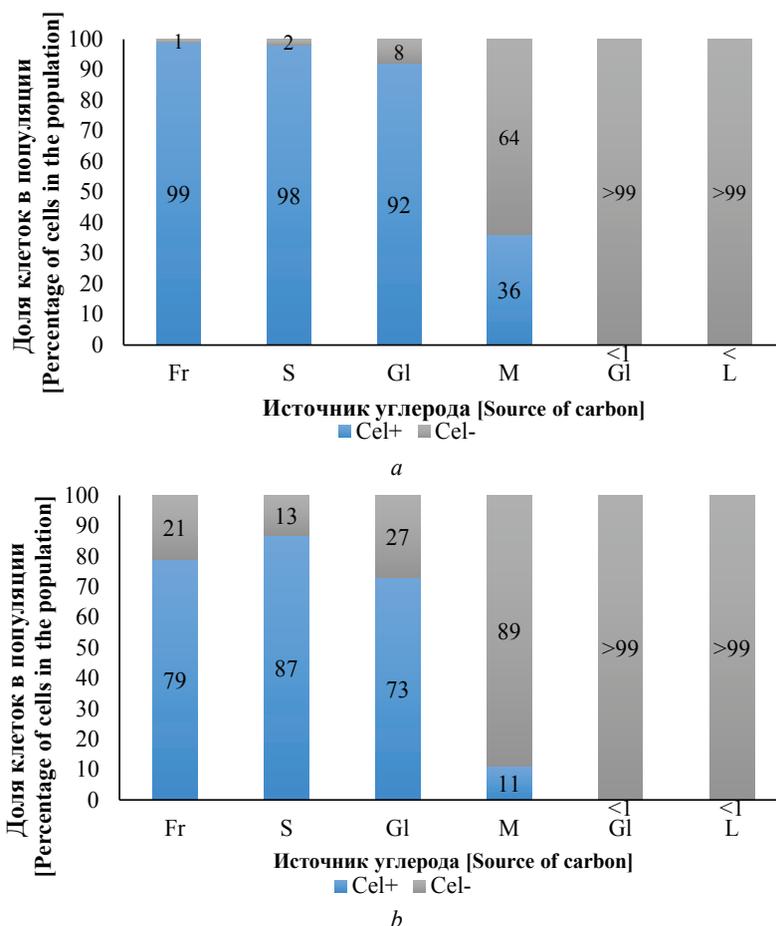


Рис. 6. Соотношение (%) численности популяции клеток, образующих мукоидные (Cel-) и немучоидные (Cel+) колонии штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 в культуральной жидкости (a) и в пленке (b) в зависимости от источника углерода.

F – фруктоза, S – сахароза, Gl – глюкоза, M – мальтоза, G – галактоза, L – лактоза

[Fig. 6. The content (%) of cells, forming mucoid (Cel-) and non-mucoid (Cel+) colonies in the population of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008

in the cultural liquid (a) and in the film (b) for various carbon sources.

On the X-axis - Source of carbon: F - Fructose, S - Sucrose, Gl - Glucose, M - Maltose, G - Galactose, L - Lactose; on the Y-axis - Percentage of cells in the population]

Так, на средах с источниками углерода галактозой и лактозой в посевах на агаризованных средах отмечали в основном колонии мукоидного типа (99%). На этих же источниках углерода не было образования пленки бактериальной целлюлозы, а образовывался гель по всему объему питательной среды. Как показано ранее [38], основным фактором, определяющим, будут ли фибриллы бактериальной целлюлозы формировать плотную пленку или же образуют гель, является скорость накопления полимера. В условиях куль-

тивирования, обеспечивающих высокую скорость роста и синтеза целлюлозы, формируются пленки, тогда как при низкой скорости роста продуцента образуется гель. Присутствие в популяции существенной доли целлюлозо-негативных мутантов, не участвующих в синтезе целлюлозы, должно приводить к заметному снижению общего темпа накопления полимера, что в свою очередь препятствует формированию плотной пленки и приводит к образованию геля. Та же закономерность наблюдалась на среде с мальтозой, где численность колоний мукоидного типа в посевах культуральной жидкости и смывов с пленок составляла 89%.

Дальнейшие наши исследования показали, что возникающие клоны с колониями мукоидного типа при пересевах на жидкие питательные среды на всех источниках углерода не образуют пленки бактериальной целлюлозы. Клоны продуцента, имеющие колонии гладкого немучоидного типа, синтезируют пленки на жидкой среде уже на третьи сутки культивирования (рис. 7).

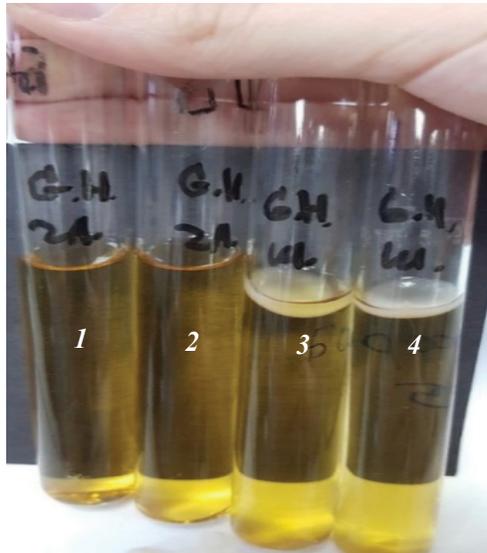


Рис. 7. Характер роста клонов *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 на среде Хестрина–Шрамма: 1, 2 – отсутствие биосинтеза пленки у клонов мукоидного типа; 3, 4 – образование пленки у клонов немучоидного типа (фото И.А. Гаврюшиной)

[Fig. 7. The growth of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 clones on Hestrin-Schramm medium: 1 and 2 - Absence of film biosynthesis for mucoid clones; 3 and 4 - Formation of a film for non-mucoid ones (photo by Irina Gavryushina)]

Чтобы подтвердить стабильность образования морфологических типов, делали пассаж колоний каждого фенотипа на агаровые среды. Протестированы все вышеперечисленные источники углерода. Как показали полученные результаты, вырастающие колонии из суспензии мукоидных плоских колоний давали рост в виде таких же колоний в течение всех четырёх пере-

сево́в вне зависимости от источника углерода, содержащегося в среде, на которую его пересеивали. Однако при посевах суспензий, полученных из блестящих колоний, некоторое число колоний мукоидного типа появляется на всех протестированных агаризованных средах. При этом количество появляющихся колоний мукоидного типа коррелирует с долей клонов дикого типа, как и в случае жидкофазного культивирования. Эти результаты позволяют утверждать, что морфологический фенотип мукоидного типа *G. hansenii* GH 1/2008 сохраняет свою стабильность. Селективными факторами появления большого числа спонтанных мутантов, не способных к синтезу пленки целлюлозы, являются источники углерода галактоза, лактоза и мальтоза.

Форма и размеры клеток обоих типов исследованы методом АСМ. Клетки, взятые из колоний обоих типов, имели цилиндрическую форму (рис. 8).

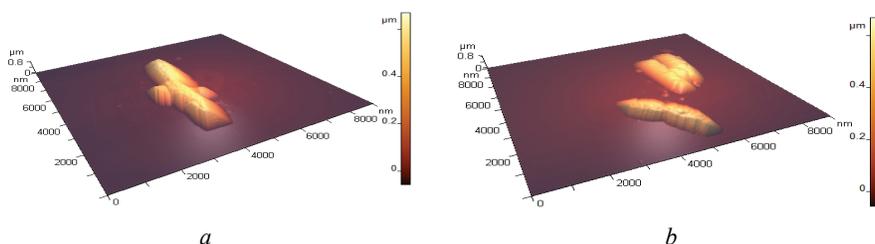


Рис. 8. Морфология клеток *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 из колоний гладкого (a) и мукоидного фенотипов (b): атомно-силовая микроскопия
 [Fig. 8. The morphology of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 cells from colonies of smooth (a) and mucoid (b) phenotypes: atomic force microscopy]

По изображениям, полученным методом АСМ, измерены длины клеток и их диаметры. Для оценки диаметра использованы данные о высоте клеток. В результате измерений размеров клеток из колоний гладкого и мукоидного типа были построены распределения размеров, не выявившие статистически значимых различий между клетками из колоний мукоидного и немучоидного типов. Клетки обоих типов, выращенные на агаризованных средах, имели среднюю длину $1\ 600 \pm 500$ нм и диаметр 700 ± 100 нм.

Заключение

В настоящем исследовании установлено, что источник углеродного питания является селективным фактором в формировании внутривидовой структуры клонов продуцента бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008. Увеличение численности целлюлозонегативными клетками обуславливает конкуренцию за субстрат с целлюлозоположительным клеткам штамма *G. hansenii* GH 1/2008, что снижает численность последних и продукцию экзополимера. В результате исследований морфологии клеток

установлено, что только целлюлозоположительные клетки, которые образуют гладкие колонии, при росте на жидкой питательной среде синтезируют целлюлозу, в то время как клетки, образующие мукоидный фенотип колоний, являются целлюлозонегативными и не способны синтезировать полимер. Однако мутанты всегда спонтанно обнаруживаются и в пленках, синтезируемых клетками, образующими гладкий фенотип колоний. Хотя механизм спонтанной мутации *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 не установлен, показано, что при многократном пересеве способность к синтезу целлюлозы у целлюлозонегативных клонов не восстанавливается. На средах, имеющих в составе в качестве источника питания фруктозу, сахарозу или глюкозу, развиваются популяции клеток, в составе которых присутствует лишь незначительная доля мутантов. При статическом жидкофазном культивировании такие популяции с большим числом целлюлозоположительных клеток синтезируют пленки на поверхности культуральной жидкости. Культивирование на средах, в которых роль источника углерода выполняют галактоза, мальтоза или лактоза, доля мутантов, не способных к синтезу целлюлозы, оказывается существенной. В таких популяциях синтез целлюлозы идет медленно, так как доля клеток, осуществляющих его, оказывается невелика. В результате вместо пленки в культуральной жидкости формируется гель, также состоящий из нанオフィбрилл целлюлозы, которые, однако, имеют пространственную организацию, иную, нежели пленки.

Авторы благодарят отдел структурных исследований Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (г. Москва, Россия) за проведение исследования методом электронной микроскопии.

Литература

1. Brown R.M.Jr., Saxena I.M. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers // Plant Physiology and Biochemistry. 2000. Vol. 38, No. 1. PP. 57–67.
2. Hassan E.A., Abdelhady H.M., Abd El-Salam S.S., Abdullah S.M. The characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* and *Komagataeibacter saccharovorans* under optimized fermentation conditions // Br. Microbiol. Res. J. 2015. Vol. 9, No. 3. PP. 1–13.
3. Болотова К.С., Чухчин Д.Г., Майер Л.В., Гурьянова А.А. Морфологические особенности фибриллярной структуры растительной и бактериальной целлюлозы // Лесной журнал. 2016. No. 6. С. 153–165.
4. Lee K.-Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites // Macromolecular Bioscience. 2014. Vol. 14, No. 1. PP. 10–32.
5. Park J.K., Jung J.Y., Park Y.H. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol // Biotechnol lett. 2003. Vol. 25. PP. 2055–2059.
6. Mikkelsen D., Flanagan B.M., Dykes G.A., Gidley M.J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524 // Journal of Applied Microbiology. 2009. Vol. 107, No. 2. PP. 576–583.
7. Jozala, A.F., Pértile R.A.N., dos Santos C.A., de Carvalho Santos-Ebinuma V., Seckler M.M., Gama F.M., Pessoa A., Jr. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by

- employing alternative culture media // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 99, No. 3. PP. 1181–1190.
8. Громовых Т.И., Фан М.Х., Данильчук Т.И. Штамм бактерии *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 – продуцент бактериальной целлюлозы // Патент 2464307. Российская Федерация, МПК: C12N 1/20, C12P 19/04. Заявка No. 2011121841, приор. 31.05.2011; опубл. 10.20.2012 г. Бюл. 2011. No. 29. 12 с.
 9. Хрипунов А.К., Ткаченко А.А. Состав питательной среды культивирования *Acetobacter xylinum* для получения бактериальной целлюлозы // Патент 2141530. Российская Федерация, МПК: C12P 19/02, C12N 1/20. Заявка No. 98108987/13, приор. 05.05.1998; опубл. 11.20.1999 г. Бюл. 1999. No. 6 с.
 10. Ревин В.В., Лияськина Е.В. Штамм *Gluconacetobacter sucrofermentans* – продуцент бактериальной целлюлозы // Патент 2523606. Российская Федерация, МПК: C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/01. Заявка No. 2013111072/10, приор. 12.03.2013; опубл. 20.07.2014 г. Бюл. 2015. No. 20. 6 с.
 11. Волова Т.Г., Прудникова С.В., Шишачкая Е.И. Штамм бактерии *Komagataeibacter xylinus* – продуцент бактериальной целлюлозы // Патент 2568605. Российская Федерация, МПК: C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/00. Заявка No. 2014150288/10, приор. 12.11.2014; опубл. 20.11.2015 г. Бюл. 2015. No. 32. 11 с.
 12. Son H.J., Heo M.S., Kim Y.G., Lee S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2001. Vol. 33, No. 1. PP. 1–5.
 13. Ruka D.R., Simon G.P., Dean K.M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose // *Carbohydrate Polymers*. 2012. Vol. 89, No. 2. PP. 613–622.
 14. Tsouko E., Kourmentza C., Ladakis D., Kopsahelis N., Mandala I., Papanikolaou S., Paloukis F., Alves V., Koutinas A. Bacterial cellulose production from industrial waste and byproduct streams // *International Journal of Molecular Sciences*. 2015. Vol. 16, No. 7. PP. 14832–14849.
 15. Ross P., Mayer R., Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria // *Microbiol. Rev.* 1991. Vol. 55. PP. 35–58.
 16. Chawla P.R., Bajaj I.B., Survase S.A., Singhal R.S. Fermentative Production of Microbial Cellulose // *Food Technol. Biotechnol.* 2009. Vol. 47. PP. 107–124.
 17. Li Y., Tian C., Tian H., Zhang J., He X., Ping W., Lei H. Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012. Vol. 96. PP. 1479–1487.
 18. Schramm M., Hestrin S. Factors affecting production of cellulose at the air liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum* // *Journal of General Microbiology*. 1954. Vol. 11, PP. 123–128.
 19. Son H.J., Heo M.S., Kim Y.G., Lee S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2001. Vol. 33. PP. 1–5.
 20. Song H.-J., Li H., Seo J.-H., Kim M.-J., Kim S.-J. Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes // *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2009. Vol. 26. PP. 141–146.
 21. Li H., Kim S.-J., Lee Y.-W., Kee C., Oh I. Determination of the stoichiometry and critical oxygen tension in the production culture of bacterial cellulose using saccharified food wastes // *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2011. Vol. 28. PP. 2306–2311.
 22. Krystynowicz A., Czaja W., Wiktorowska-Jeziarska A., Goncalves-Miskiewicz M., Turkiewicz M., Bielecki S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002. Vol. 29. PP. 189–195.

23. Krystynowicz A., Koziolkiewicz M., Wiktorowska-Jezierska A., Bielecki S., Wojtera E., Masny A., Plucienniczak A. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum* // *Acta Biochimica Polonica*. 2005. Vol. 52. PP. 691–698.
24. Valla S., Kjosbakken J. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum* // *Journal of General Microbiology*. 1982. Vol. 128. PP. 1401–1408.
25. Nguyen V.T., Flanagan B., Mikkelsen D., Ramirez S., Rivas L., Gidley M.J., Dykes G.A. Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha // *Carbohydrate Polymers*. 2010. Vol. 80. PP. 337–343.
26. Kuga S., Takagi S., Brown R.M. Native folded-chain cellulose II // *Polymer*. 1993. Vol. 34. PP. 3293–3297.
27. Valla S., Coucheron D.H., Fjaervik E., Kjosbakken J., Weinhouse H., Ross P., Amikam D., Benziman M. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: complementation of cellulose-negative mutant by the UDPG pyrophosphorylase structural gene // *Molecular and General Genetics*. 1989. Vol. 217, No. 1. PP. 26–30.
28. Mohammadkazemi F., Doosthoseini K., Azin M. Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* (PTCC 1734) // *Cellulose chemistry and technology*. 2015. Vol. 49, No. 5–6. PP. 455–462.
29. Mohite B.V., Salunke B.K., Patil S.V. Enhanced production of bacterial cellulose by using *Gluconacetobacter hansenii* NCIM 2529 strain under shaking conditions // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013. Vol. 169. PP. 1497–1511.
30. Фан Ми Хань. Биотехнология бактериальной целлюлозы с использованием штамма – продуцента *Gluconacetobacter hansenii* GH - 1/2008 : дис. ... канд. биол. наук. М. : Моск. гос. ун-т им. М.В. Ломоносова, 2013. 161 с.
31. Park J.K., Khan T., Jung J.Y. Structural studies of the glucuronic acid oligomers produced by *Gluconacetobacter hansenii* strain // *Carbohydr. Polym.* 2006. Vol. 63. PP. 482–486.
32. Gromovykh T.I., Feldman N.B., Timashev P.S., Kiselyova O.I., Kraeva M.N., Grinevich A.S., Tikchonova O.A., Bardakova K.N., Churbanov S.N., Lutsenko S.V. Elaboration of bacterial cellulose matrix for the immobilization of *Escherichia coli* cells // *International Journal of Nanotechnology*. 2018. Vol. 15, No. 4/5. PP. 288–300.
33. Pigaleva M.A., Bulat M.V., Gromovykh T.I., Gavryushina I.A., Lutsenko S.V., Gallyamov M.O., Novikov I.V., Buyanovskaya A.G., Kiselyova O.I. A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: What happens to bacteria in supercritical media? // *The Journal of Supercritical Fluids*. 2019. Vol. 147. PP. 59–69.
34. Кашин А.С., Анаников В.П. Формирование наноразмерных покрытий и наночастиц металлов путем магнетронного распыления и их исследование методом сканирующей электронной микроскопии // *Известия Академии Наук Серия Химическая*. 2011. No. 12. С. 2551–2556. doi: 10.1007/s11172-011-0399-x
35. Coseri S., Biliuta G., Zemljič L.F., Srndovic J.S., Larsson P.T., Strnad S., Krežec T., Naderic A., Lindström T. One-shot carboxylation of microcrystalline cellulose in the presence of nitroxyl radicals and sodium periodate // *RSC Adv*. 2015. Vol. 5. PP. 85889–85897.
36. Zhang X., Xiao N., Wang H., Liu C., Pan X. Preparation and characterization of regenerated cellulose film from a solution in lithium bromide molten salt hydrate // *Polymers*. 2018. Vol. 10. PP. 614–626.
37. Рубина М.С., Пигалева М.А., Наумкин А.В., Громовых Т.И., Васильков А.Ю. Пленки бактериальной целлюлозы, продуцированной *Gluconacetobacter hansenii*, как источник окисленной формы нанофибриллярной целлюлозы // *Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах*. 2019. Т. 492. С. 70–75.
38. Gromovykh T.I., Pigaleva M.A., Gallyamov M.O., Ivanenko I.P., Ozerova K.E., Kharitonova E.P., Bahman M., Feldman N.B., Lutsenko S.V., Kiselyova O.I. Structural

organization of bacterial cellulose: the origin of anisotropy and layered structures // Carbohydrate Polymers. 2020. Vol. 237. PP. 116140–116152.

Поступила в редакцию 23.08.2020 г.; повторно 01.11.2020 г.; принята 21.02.2021 г.; опубликована 31.03.2021 г.

Авторский коллектив:

Киселева Ольга Игоревна, канд. физ.-мат. наук, старший преподаватель кафедры физики полимеров и кристаллов, физический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Россия, 119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7637-7758>

E-mail: ok@polly.phys.msu.ru

Луценко Сергей Викторович, профессор, д-р биол. наук, заведующий кафедрой биотехнологии, Институт трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-2017-6025>

E-mail: svlutsenko57@mail.ru

Фельдман Наталья Борисовна, д-р биол. наук, профессор кафедры биотехнологии, Институт трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-6098-2788>

E-mail: n_feldman@mail.ru

Пигалева Марина Алексеевна, канд. физ.-мат. наук, м.н.с. кафедры физики полимеров и кристаллов, физический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Россия, 119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7483-1294>

E-mail: pigaleva@polly.phys.msu.ru

Гаврюшина Ирина Александровна, аспирант Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе (Россия, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4889-4977>

E-mail: irina-alekcandrovna2013@yandex.ru

Садыкова Вера Сергеевна, д-р биол. наук, зам. директора Научно-исследовательского института по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе (Россия, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9372-5948>

E-mail: sadykova_09@mail.ru

Рубина Маргарита Сергеевна, н.с. Института элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1480-6470>

E-mail: margorubina@yandex.ru

Громовых Татьяна Ильинична, д-р биол. наук, профессор кафедры биотехнологии, Институт трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2).

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6943-534X>

E-mail: gromovykhtatyana@mail.ru

For citation: Kiselyova OI, Lutsenko SV, Feldman NB, Gavryushina IA, Sadykova VS, Pigaleva MA, Rubina MS, Gromovykh TI. The structure of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 population cultivated in static conditions on various sources of carbon. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2021;53:22-46. doi: 10.17223/19988591/53/2 In Russian, English Summary

Olga I. Kiselyova¹, Sergey V. Lutsenko², Natalia B. Feldman², Irina A. Gavryushina³, Vera S. Sadykova³, Marina A. Pigaleva¹, Margarita S. Rubina⁴, Tatiana I. Gromovykh²

¹M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

³G.F. Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, Russian Federation

⁴A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

The structure of *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008 population cultivated in static conditions on various sources of carbon

Bacterial cellulose (BC) is a natural polymer that has a number of unique properties that determine the need to synthesize large amounts of it and to search the ways to increase the productivity of strains and to optimize the nutritive media. It is known that the choice of the producer for BC synthesis has an impact on its final properties and on the productivity of this polymer production. Under static liquid phase cultivation conditions, all cellulose-producing bacteria form a uniform film on the medium surface that serves as a scaffold for cells immobilization, thus providing them with the access to the air/liquid interface, where the access to oxygen is not limited. Meanwhile, when cultivation goes under agitating conditions, most of *Gluconacetobacter xylinus* strains produce less cellulose in form of globules of various sizes, despite the better oxygen access. Several authors explain the lower cellulose outcome when cultivated under agitated conditions by the appearance of spontaneous mutants that do not produce cellulose in the population. It was revealed that when grown on agarized media, cellulose-non-producing mutants form colonies of a specific mucoid type, while non-mucoid phenotype cells form smooth colonies of non-mucoid type. To our knowledge, there is no published research on the impact of cultivation conditions and nutritive medium composition on the appearance of spontaneous phenotype mutations in the population of *Gluconacetobacter hansenii* representatives. The aim of the present research is to elucidate the impact of the carbon source on the productivity of *G. hansenii* strain and the appearance of cellulose-negative mutants under static cultivation conditions.

We studied the strain *G. hansenii* GH 1/2008 (VKPM B-10547) as a BC source. Liquid phase static cultivation of *G. hansenii* GH 1/2008 was carried out using the modified Hestrin-Schramm (HS) medium, containing 4% of monosaccharides (glucose, fructose and galactose) or disaccharides (sucrose, maltose, lactose) as carbon sources. The occurrence of mutants was calculated considering phenotypes of colonies obtained by seeding the samples of cultural liquid and wash-offs of cells from films produced by the cultivation of the producer on modified agarized HS media. The polymer outcome was expressed as the film absolute dry weight (a.d.w.) per cultivation medium volume unit. We studied the morphology of the producer's wild type and mutant cells by means of atomic force microscopy (AFM) (See Fig. 8). The structural organization of the produced films and gel was revealed by means of scanning electron microscopy (SEM) performed after freeze-drying. The composition of the fibers was checked acquiring FTIR Spectroscopy.

We established that *G. hansenii* GH 1/2008 produces a dense film on media containing fructose, glucose and sucrose, while the polymer has gel consistence when

grown on maltose, galactose and lactose (See Fig. 1). The maximal quantity (a.d.w.) of polymer was produced on fructose- and sucrose-containing media. The overall number of immobilized producer cells was considerably higher when grown on media with glucose, fructose and sucrose than on gels grown on those containing maltose, galactose and lactose (See Table 1). SEM imaging revealed considerable difference in the microscale organization of films and gels produced by *G. hansenii* GH 1/2008 on various carbon sources (See Fig. 2). Fructose-containing medium yields the densest structure with dense layers separated by 2 μ m thick areas filled with non-ordered BC fibrils. The microscale organization of sucrose- and glucose-based films were very similar and had a cell-like structure. In cases where the synthesized polymer had squeezable gel consistence, its microstructure was not layered but close to isotropic. The studies of gels by means of FTIR spectroscopy showed that the gels are also formed of BC molecules; the spectra were almost identical (See Fig. 4). The only difference, i.e. the intensity of the 1638 cm^{-1} peak, can be explained by the presence of a higher amount of bound water in the latter. It is known that some strains of this species may produce glucuronic acid oligomers under unfavorable conditions, but peaks corresponding to carboxyl or carbonyl groups were not revealed in the spectra. This is the evidence that no detectable amounts of glucuronic acid were produced under conditions studied. The analysis of colonies of *G. hansenii* GH 1/2008 cultivated under static conditions on media containing various carbon sources revealed colonies with two dominating phenotypes: non-mucoid smooth convex colonies and mucoid flat ones (See Fig. 5). The number of cells forming smooth non-mucoid colonies on agarized media was maximal in the inoculations of cultural liquids after the cultivation on media containing fructose and sucrose, i.e. those carbon sources that demonstrated high productivity per 1L of cultural liquid (See Fig. 6). In the inoculations of the cultural liquid and wash-offs of cells immobilized on gels obtained by the cultivation on media containing galactose and lactose, the number of mucoid colonies was considerably higher (See Table 2). The clones forming mucoid type colonies did not produce BC films when reinoculated in liquid media, while those forming colonies of mucoid (smooth) type produce films on the 3rd day of cultivation (See Fig. 7). The analysis of cells shape and sizes by means of AFM did not reveal any statistically valid difference between the mutants and the wild type.

The present research shows that the source of carbon is a selective factor in the formation of the inner composition of the population of clones of the bacterial cellulose producer *Gluconacetobacter hansenii* GH 1/2008. The proliferation of cellulose-negative cells arouses competition for the substrate with cellulose-positive cells of *G. hansenii* GH 1/2008 that reduces the number of the latter and the production of the exopolymer.

The paper contains 8 Figures, 2 Tables and 38 References.

Key words: *Gluconacetobacter hansenii*; bacterial cellulose; cellulose-negative mutants; microscale morphology.

Funding: This research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 19-34-90088) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Project No. 18-29-06049 mk).

Acknowledgments: The authors thank the Department of Structural Studies, ND Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow for carrying out SEM imaging.

The Authors declare no conflict of interest.

References

1. Brown RMJr, Saxena IM. Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2000;38(1-2):57-67. doi: [10.1016/S0981-9428\(00\)00168-6](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00168-6)

2. Hassan EA, Abdelhady HM, Abd El-Salam SS, Abdullah SM. The characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* and *Komagataeibacter saccharovorans* under optimized fermentation conditions. *Br. Microbiol. Res. J.* 2015(9):1-13. doi: [10.9734/BMRJ/2015/18223](https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/18223)
3. Bolotova KS, Chukhchin DG, Mayer LV, Gur'yanova AA. Morphological features of the fibrillar structure of plant and bacterial cellulose. *Lesnoy zhurnal = Russian Forestry Journal.* 2016;6:153-165. doi: [10.17238/issn0536-1036.2016.6.153](https://doi.org/10.17238/issn0536-1036.2016.6.153)
4. Lee K-Y, Buldum G, Mantalaris A, Bismarck A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular Bioscience.* 2014;14(1):10-32. doi: [10.1002/mabi.201300298](https://doi.org/10.1002/mabi.201300298)
5. Park JK, Jung JY, Park YH. Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnology Letters.* 2003;(25):2055-2059. doi: [10.1023/B:BILE.0000007065.63682.18](https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000007065.63682.18)
6. Mikkelsen D, Flanagan BM, Dykes GA, Gidley MJ. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *J Applied Microbiology.* 2009;107(2):576-583. doi: [10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x)
7. Jozala, AF, Pértile RAN, dos Santos CA, de Carvalho Santos-Ebinuma V, Seckler MM, Gama FM, Pessoa AJr. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2015;99(3):1181-1190. doi: [10.1007/s00253-014-6232-3](https://doi.org/10.1007/s00253-014-6232-3)
8. Gromovykh TI, Fan MK, Danil'chuk TN. *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 bacterial strain – bacterial cellulose producer. Patent No. 2464307 Russian Federation. Int. Cl. C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/01. Application No. 2011121841/10, Prior. 31.05.2011; Publ. 20.10.2012. Bul. No. 29. 12 p. In Russian
9. Khripunov AK, Tkachenko AA. Composition of nutrient medium for culturing *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose preparing (variants). Patent No. 2189394 Russian Federation. Int. Cl. C12P19/02, C12N1/20. Application No. 98108987/13, Prior. 05.05.1998; Publ. 20.11.1999. Bul. No. 6 p. In Russian
10. Revin VV, Lijas'kina EV. Strain *Gluconacetobacter sucrofermentans* – producer of bacterial cellulose. Patent No. 2523606 Russian Federation. Int. Cl. C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/01. Application No. 2013111072/10, Prior. 12.03.2013; Publ. 20.07.2014. Bul. No. 20. 6 p. In Russian
11. Volova TG, Prudnikova SV, Shishatskaja EI. Bacterial strain *Komagataeibacter xylinus* – bacterial cellulose producer. Patent No. 2568605 Russian Federation. Int. Cl. C12N 1/20, C12P 19/04, C12R 1/00. Application No. 2014150288/10, Prior. 11.12.2014; Publ. 20.11.2015. Bul. No. 32. 11 p. In Russian
12. Son HJ, Heo MS, Kim YG, Lee SJ. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2001;33(1):1-5. doi: [10.1042/ba20000065](https://doi.org/10.1042/ba20000065)
13. Ruka DR, Simon GP, Dean KM. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers.* 2012;89(2):613-622. doi: [10.1016/j.carbpol.2012.03.059](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.059)
14. Tsouko E, Kourmentza C, Ladakis D, Kopsahelis N, Mandala I, Papanikolaou S, Paloukis F, Alves V, Koutinas A. Bacterial cellulose production from industrial waste and byproduct streams. *Int J Molecular Sciences.* 2015;16(7):14832-14849. doi: [10.3390/ijms160714832](https://doi.org/10.3390/ijms160714832)
15. Ross P, Mayer R, Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* 1991;55(1):35-58. doi: [10.1128/MMBR.55.1.35-58.1991](https://doi.org/10.1128/MMBR.55.1.35-58.1991)
16. Chawla PR, Bajaj IB, Survase SA, Singhal RS. Fermentative production of microbial cellulose. *Food Technol. Biotechnol.* 2009;47(2):107-124.
17. Li Y, Tian C, Tian H, Zhang J, He X, Ping W, Lei H. Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate

- involved. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;96(6):1479-1487. doi: [10.1007/s00253-012-4242-6](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4242-6)
18. Schramm M, Hestrin S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. *J General Microbiology.* 1954;11(1):123-128. doi: [10.1099/00221287-11-1-123](https://doi.org/10.1099/00221287-11-1-123)
 19. Son HJ, Heo MS, Kim YG, Lee SJ. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 2001;33(1):1-5. doi: [10.1042/ba20000065](https://doi.org/10.1042/ba20000065)
 20. Song H-J, Li H, Seo J-H, Kim M-J, Kim S-J. Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes. *Korean J Chemical Engineering.* 2009;26(1):141-146. doi: [10.1007/s11814-009-0022-0](https://doi.org/10.1007/s11814-009-0022-0)
 21. Li H, Kim S-J, Lee Y-W, Kee C, Oh I. Determination of the stoichiometry and critical oxygen tension in the production culture of bacterial cellulose using saccharified food wastes. *Korean J Chemical Engineering.* 2011;28:2306-2311. doi: [10.1007/s11814-011-0111-8](https://doi.org/10.1007/s11814-011-0111-8)
 22. Krystynowicz A, Czaja W, Wiktorowska-Jeziarska A, Goncalves-Miskiewicz M, Turkiewicz M, Bielecki S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *J Industrial Microbiology and Biotechnology.* 2002;29:189-195. doi: [10.1038/sj.jim.7000303](https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303)
 23. Krystynowicz A, Koziolekiewicz M, Wiktorowska-Jeziarska A, Bielecki S, Wojtera E, Masny A, Płucienniczak A. Molecular basis of cellulose biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum*. *Acta Biochimica Polonica.* 2005;52(3):691-698. doi: [10.18388/abp.2005_3432](https://doi.org/10.18388/abp.2005_3432)
 24. Valla S, Kjosbakken J. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*. *J General Microbiology.* 1982;128:1401-1408. doi: [10.1099/00221287-128-7-1401](https://doi.org/10.1099/00221287-128-7-1401)
 25. Nguyen VT, Flanagan B, Mikkelsen D, Ramirez S, Rivas L, Gidley MJ, Dykes GA. Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Carbohydrate Polymers.* 2010;80:337-343. doi: [10.1016/j.carbpol.2009.11.019](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.019)
 26. Kuga S, Takagi S, Brown, RM. Native folded-chain cellulose II. *Polymer.* 1993;34:3293-3297. doi: [10.1016/0032-3861\(93\)90404-X](https://doi.org/10.1016/0032-3861(93)90404-X)
 27. Valla S, Coucheron DH, Fjaervik E, Kjosbakken J, Weinhouse H, Ross P, Amikam D, Benziman M. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Complementation of cellulose-negative mutant by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. *Molecular and General Genetics.* 1989;217(1):26-30. doi: [10.1007/BF00330938](https://doi.org/10.1007/BF00330938)
 28. Mohammadkazemi F, Doosthoseini K, Azin M. Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* (PTCC 1734). *Cellulose Chemistry and Technology.* 2015;49(5-6):455-462. doi: [10.13140/RG.2.1.3415.5685](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3415.5685)
 29. Mohite BV, Salunke BK, Patil SV. Enhanced production of bacterial cellulose by using *Gluconacetobacter hansenii* NCIM 2529 strain under shaking conditions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013;169:1497-1511. doi: [10.1007/s12010-013-0092-7](https://doi.org/10.1007/s12010-013-0092-7)
 30. Fan Mi Khan. *Biotehnologiya bakterial'noy tsellyulozy s ispol'zovaniem shtamma – produtsenta Gluconacetobacter hansenii* GH – 1/2008 [Biotechnology of bacterial cellulose using the producer strain *Gluconacetobacter hansenii* GH – 1/2008]. Cand. Sci. Diss. Biotechnology specialty. Moscow: Faculty of Biology, MV Lomonosov Moscow State University; 2013. 161 p.
 31. Park JK, Khan T, Jung JY. Structural studies of the glucuronic acid oligomers produced by *Gluconacetobacter hansenii* strain. *Carbohydrate Polymers.* 2006;63:482-486. doi: [10.1016/j.carbpol.2005.10.004](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.10.004)
 32. Gromovykh TI, Feldman NB, Timashev PS, Kiselyova OI, Kraeva MN, Grinevich AS, Tikchonova OA, Bardakova KN, Churbanov SN, Lutsenko SV. Elaboration of bacterial cellulose matrix for the immobilization of *Escherichia coli* cells. *Int J Nanotechnology.* 2018;15(4/5):288-300. doi: [10.1504/IJNT.2018.094784](https://doi.org/10.1504/IJNT.2018.094784)

33. Pigaleva MA, Bulat MV, Gromovykh TI, Gavryushina IA, Lutsenko SV, Gallyamov MO, Novikov IV, Buyanovskaya AG, Kiselyova OI. A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: What happens to bacteria in supercritical media? *The J Supercritical Fluids*. 2019;147:59-69. doi: [10.1016/j.supflu.2019.02.009](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.02.009)
34. Kashin AS, Ananikov VP. A SEM study of nanosized metal films and metal nanoparticles obtained by magnetron sputtering. *Russ Chem Bull Int Ed*. 2011;60:2602-2607. doi: [10.1007/s11172-011-0399-x](https://doi.org/10.1007/s11172-011-0399-x) In Russian
35. Coseri S, Biliuta G, Zemlji LF, Srndovic JS, Larsson PT, Strnad S, Krežze T, Naderic A, Lindström T. One-shot carboxylation of microcrystalline cellulose in the presence of nitroxyl radicals and sodium periodate. *RSC Adv*. 2015;5:85889-85897. doi: [10.1039/c5ra90100f](https://doi.org/10.1039/c5ra90100f)
36. Zhang X, Xiao N, Wang H, Liu C, Pan X. Preparation and characterization of regenerated cellulose film from a solution in lithium bromide molten salt hydrate. *Polymers*. 2018;10:614-626. doi: [10.3390/polym10060614](https://doi.org/10.3390/polym10060614)
37. Rubina MS, Pigaleva MA, Naumkin AV, Gromovykh TI, Vasil'kov AYu. Bacterial cellulose pellicles produced by *Gluconacetobacter hansenii* as a started material for oxidized nanofibrillated cellulose. *Doklady rossiysskoy akademii nauk. Khimiya, nauki o materialakh = Proceedings of the Academy of Sciences. Chemistry, Material Science*. 2019;492:70-75. In Russian
38. Gromovykh TI, Pigaleva MA, Gallyamov MO, Ivanenko IP, Ozerova KE, Kharitonova EP, Bahman M, Feldman NB, Lutsenko SV, Kiselyova OI. Structural organization of bacterial cellulose: The origin of anisotropy and layered structures. *Carbohydrate Polymers*. 2020;237:116140-116152. doi: [10.1016/j.carbpol.2020.116140](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116140)

Received 23 August, 2020; Revised 01 November, 2020;

Accepted 21 February, 2021; Published 31 March, 2021.

Author info:

Kiselyova Olga I, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Senior Lecturer, Chair of Polymer and Crystal Physics, Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye Gory, Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-7637-7758>

E-mail: ok@polly.phys.msu.ru

Lutsenko Sergei V, Professor, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Department of Biotechnology, Institute for Translational Medicine and Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8 Trubetskaya Str., Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-2017-6025>

E-mail: svlutsenko57@mail.ru

Feldman Natalia B, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Biotechnology, Institute for Translational Medicine and Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8 Trubetskaya Str., Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-6098-2788>

E-mail: n_feldman@mail.ru

Pigaleva Marina A, Cand. Sci. (Phys.-Math.), Junior Researcher, Chair of Polymer and Crystal Physics, Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye Gory, Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-7483-1294>

E-mail: pigaleva@polly.phys.msu.ru

Gavryushina Irina A, Graduate Student, G.F. Gause Institute of New Antibiotics, 11 Bolshaya Pirogovskaya Str., Bld. 1, Moscow 119021, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-4889-4977>

E-mail: irina-alekcandrovna2013@yandex.ru

Sadykova Vera S, Dr. Sci. (Biol.), Vice Director of G.F. Gause Institute of New Antibiotics, 11 Bolshaya Pirogovskaya Str., Bld. 1, Moscow 119021, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-9372-5948>

E-mail: sadykova_09@mail.ru

Rubina Margarita S, Research Fellow, A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, 28 Vavilova Str., Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-1480-6470>

E-mail: margorubina@yandex.ru

Gromovykh Tatiana I, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Biotechnology, Institute for Translational Medicine and Biotechnology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8 Trubetskaya Str., Bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-6943-534X>

E-mail: gromovykhtatyana@mail.ru