

УДК 577.114

ИЗУЧЕНИЕ БИОСИНТЕЗА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ КУЛЬТУРОЙ *MEDUSOMYCES GISEVII J. LINDAU* НА СРЕДАХ С РАЗЛИЧНОЙ НАЧАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ГЛЮКОЗЫ

Гладышева Е.К.

ФГБУН «Институт проблем химико-энергетических технологий» Сибирского отделения Российской академии наук, Бийск, e-mail: evg-gladysheva@yandex.ru

Исследована зависимость синтеза бактериальной целлюлозы симбиозом *Medusomyces gisevii J. Lindau* от концентрации глюкозы в питательной среде. Экспериментально определены скорости утилизации глюкозы и выходы бактериальной целлюлозы в интервале начальной концентрации глюкозы от 5 до 55 г/л. Показано, что скорость утилизации глюкозы ингибируется её высокими концентрациями: при концентрации глюкозы выше 15 г/л скорость утилизации снижается, а при концентрации выше 45 г/л – 18% субстрата и более остаётся неутилизованным. Установлено, что повышение концентрации глюкозы выше 20 г/л приводит к снижению выхода бактериальной целлюлозы. Показано, что при начальной концентрации глюкозы 20 г/л скорость утилизации субстрата составляет 0,70 ч⁻¹, субстрат расходуется целевым образом на синтез геля-плёнки, а выход бактериальной целлюлозы максимален и составляет 8,4%.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, начальная концентрация глюкозы, *Medusomyces gisevii J. Lindau*, симбиоз, кинетика утилизации субстрата, уровень активной кислотности

STUDY INTO BIOSYNTHESIS OF BACTERIAL CELLULOSE BY *MEDUSOMYCES GISEVII J. LINDAU* ON MEDIA WITH DIFFERENT INITIAL GLUCOSE CONCENTRATION

Gladysheva E.K.

Institute for Problems of Chemical and Energetic Technologies, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Biysk, e-mail: evg-gladysheva@yandex.ru

The synthesis of bacterial cellulose via symbiosis of *Medusomyces gisevii J. Lindau* was studied as a function of glucose concentration in the nutrient medium. The glucose utilization rate and bacterial cellulose yields at an initial glucose concentration ranging from 5 to 55 g/L were experimentally determined. The glucose utilization rate was shown to be inhibited by its high concentrations: at a glucose concentration above 15 g/L, the utilization rate diminishes, while at a concentration above 45 g/L, 18% of substrate and higher remains unutilized. The yield of bacterial cellulose was found to decrease as the glucose concentration is increased over 20 g/L. At an initial glucose concentration of 20 g/L, the substrate utilization rate is 0,70 h⁻¹, the substrate is purposefully consumed for the synthesis of gel film, and the bacterial cellulose yield is maximal amounting to 8,4%.

Keywords: bacterial cellulose, initial glucose concentration, *Medusomyces gisevii J. Lindau*, symbiosis, substrate utilization kinetics, active acidity level

Известно множество продуцентов бактериальной целлюлозы (БЦ): *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Enterobacter*, *Sarcina*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes* – при этом в промышленности чаще всего используется *Gluconoacetobacter* [7]. Поиск новых продуцентов и оптимизация технологического процесса получения БЦ являются основополагающими для успешного синтеза БЦ.

Эффективность любого биотехнологического процесса может быть оценена по конверсии субстрата: необходимо выбрать оптимальную начальную концентрацию субстрата и подобрать такие условия, чтобы конверсия субстрата была полной, а выход целевого продукта максимальным. Для каждого продуцента и конкретного штамма необходимо уточнять технологические параметры, нельзя перенести оптимальные

условия, выявленные для одного штамма на другой; имеющиеся в литературе расхождения по рекомендуемым начальным концентрациям субстрата объясняются биосинтетическими особенностями продуцентов.

Например, группой авторов была изучена зависимость выхода БЦ, синтезируемой *Acetobacter xylinum IFO 13693* от различных концентраций глюкозы: 6, 12, 24 и 48 г/л. Было установлено, что выход БЦ уменьшается с увеличением начальной концентрации глюкозы в питательной среде, что объясняется увеличением концентрации глюконовой кислоты в процессе культивирования. Таким образом, при высоких концентрациях глюкозы не используется для синтеза целлюлозы, а метаболизируется в глюконовую кислоту. Авторы приходят к выводу, что высокая концентрация глюкозы в среде снижает выход БЦ, низкая

концентрация глюкозы предпочтительнее для культивирования [8].

Другие авторы [6] также исследовали проблему зависимости выхода БЦ от концентрации глюкозы. Использовался продуцент *Acetobacter sp. V6*. По их данным, максимальный выход БЦ достигается при концентрации глюкозы 1%, минимальный выход – при концентрациях 2 и 3%. Использование в данной работе многовидовой культуры бактерий рода *Acetobacter*; а не отдельного штамма, объясняется стремлением использовать в производстве устойчивой к фаговым инфекциям и изменениям состава среды культуры. Естественные симбиотические культуры ещё более устойчивы к неблагоприятным условиям и контаминации фагами и посторонней микрофлорой.

В институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН (г. Пушкино, 1999–2003 гг.) были проведены фундаментальные исследования физиологии и метаболизма *Medusomyces gisevii J. Lindau* [5], показаны его уникальная способность к адаптации в неблагоприятных условиях (тяжелая вода [3], холодовой стресс [5]). Авторы подробно рассматривают микробиологический состав симбиоза, взаимовлияние партнёров на метаболические пути трансформации субстратов, идентифицируют метаболиты. Решающим условием для нормального роста и накопления активных веществ *Medusomyces gisevii J. Lindau* авторы считают интенсивность образования гель-плёнки БЦ. Однако авторы не ставили целью поиск оптимальных условий для биосинтеза БЦ, а рассматривали всю совокупность биохимической трансформации глюкозы в этанол, уксусную кислоту, глюконовую кислоту и глицерин [5].

Целью работы являлось выявление зависимости биосинтеза БЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii J. Lindau* от концентрации исходного субстрата – глюкозы. Результаты, полученные на модельных синтетических средах, будут использованы для биосинтеза БЦ на средах ферментативных гидролизатов целлюлозосодержащего сырья, технология получения которых достаточно детально изучена в ИПХЭТ СО РАН [4].

Материалы и методы исследования

Medusomyces gisevii J. Lindau, в быту известен как «чайный гриб», – это симбиотическая культура, в состав которой входят 8–10 родов уксусно-кислых, таких как *Acetobacter sp.*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter aceti* subspecies *xylinum*, *Acetobacter xylinodiest* и др., 15–30 родов дрожжей *Zygosaccharomyces sp.*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida tropicalis* и др. Медузомицет представляет собой толстую, слизистую, желтовато-коричневого цвета пленку, плавающую на

поверхности культуральной жидкости. Часть клеток микроорганизмов иммобилизованы на поверхности гель-плёнки целлюлозы, часть находится в культуральной жидкости [5].

В экспериментах использовались синтетические питательные среды, приготовленные растворением глюкозы в экстракте черного чая (12 г чая на 1 л воды), с разными начальными концентрациями глюкозы 5, 10, 15, 25, 35, 45, 55 г/л. В качестве инокулята использовалась семидневная симбиотическая культура, выращенная на глюкозной среде, доза внесения составляла 10%. Культивирование проводилось в статических условиях при $(32 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 21 суток. Убыль глюкозы контролировалась спектрофотометрически (спектрофотометр «UNICOUV-2804», США) с использованием динитросалицилового реактива, прирост пленки БЦ оценивался гравиметрически (весы лабораторные аналитические Explorer EX-224), уровень активной кислотности контролировался с помощью иономера (иономер И-160 МИ).

Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 представлена зависимость доли утилизируемой глюкозы от продолжительности культивирования при различных начальных концентрациях.

При начальной концентрации 5, 10, 15 и 20 г/л доля неутилизованного субстрата на 7 сутки культивирования составила менее 10%; при исходной концентрации 25 г/л – на 9 сутки; при исходной концентрации 35 г/л – на 13 сутки. При 45 и 55 г/л скорость утилизации глюкозы становится ещё меньше и остаются неутилизованными 18 и 23% субстрата соответственно.

Для обоснования выбора начальной концентрации глюкозы была рассчитана скорость её утилизации, согласно уравнению [1]:

$$K_{\text{ут.гл}} = \ln \frac{s_0}{s} / \tau_{\text{культивирования}}$$

где $K_{\text{ут.гл}}$ – константа скорости утилизации субстрата, сутки⁻¹; $\tau_{\text{культивирования}}$ – фиксируемый период времени от начала культивирования, сутки; s_0 и s – концентрации РВ в начале культивирования и во время $\tau_{\text{культивирования}}$.

Зависимость скорости утилизации от начальной концентрации глюкозы представлена на рис. 2. Данная зависимость отражает ингибирование скорости утилизации субстрата его высокими начальными концентрациями. Максимальная скорость утилизации субстрата наблюдается при начальной концентрации глюкозы 15 г/л и составляет 0,784 ч⁻¹, а концентрация 25 г/л и выше приводит к снижению скорости утилизации глюкозы в 2,6 раза по сравнению с максимальной. Дальнейшее повышение концентрации субстрата приводит к ещё большему снижению скорости его утилизации.

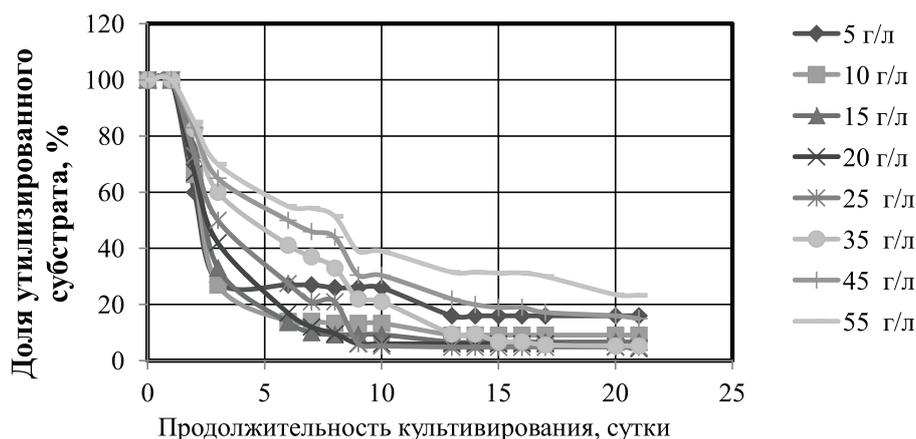


Рис. 1. Зависимость доли утилизируемого субстрата от продолжительности культивирования



Рис. 2. Зависимость скорости утилизации глюкозы от начальной концентрации (скорость определена на 7 сутки культивирования)

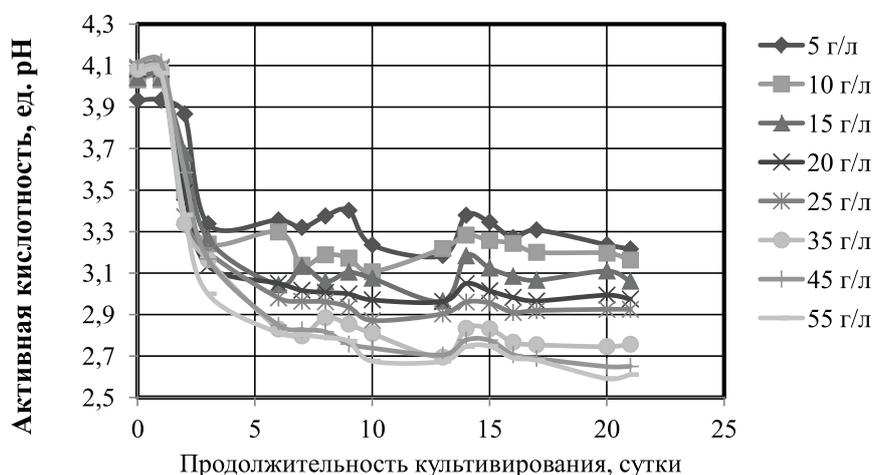


Рис. 3. Изменения активной кислотности сред при культивировании *Medusomyces gisevii* J.Lindau

Можно предположить, что высокие концентрации глюкозы ингибируют биосинтез гелевой плёнки симбиотической культурой *Medusomyces gisevii* J. Lindau. Известно, что высокие концентрации глюкозы приводят к активации синтеза побочного продукта – глюконовой кислоты (через 2, 5 – кетоглюконат) для *Gluconoacetobacter xylinum* [9]. Для симбиотической культуры *Medusomyces*

gisevii J. Lindau побочным продуктом может быть не только глюконовая кислота, но и этанол, уксусная кислота, глицерин и ряд других соединений (янтарная, молочная, яблочная кислоты), поскольку это многовидовая многоштаммовая культура. Изменения активной кислотности, представленные на рис. 3, косвенно свидетельствуют о накоплении вторичных метаболитов.

Кинетика утилизации глюкозы и выход БЦ
для продуцента *Medusomyces gisevii* J. Lindau

Начальная концентрация глюкозы, г/л	5	10	15	20	25	35	45	55
Конечная концентрация глюкозы через 21 сутки, г/л	0,80	0,91	1,00	0,90	1,20	1,83	6,73	12,82
Скорость утилизации субстрата через 7 суток культивирования, сутки ⁻¹	0,43	0,66	0,78	0,70	0,29	0,25	0,19	0,17
Выход БЦ на 7 сутки культивирования, %	4,84	4,90	7,04	8,40	8,25	6,52	4,32	4,44
Выход БЦ на 21 сутки культивирования, %	6,50	5,30	7,00	8,40	8,00	8,20	6,20	5,50

Если для начальной концентрации 5 и 10 г/л к концу культивирования рН составляет 3,2, то для 45 и 55 г/л эта величина снижается до 2,65 рН. Предположительно, что при высоких концентрациях глюкозы в среде для синтеза БЦ расходуется не весь субстрат, поэтому излишек глюкозы идет на синтез побочного продукта такого, как глюконовая кислота. Глюконовая кислота снижает уровень рН питательной среды.

Иногда выведение из системы продуктов метаболизма или их связывание приводят к повышению скоростей утилизации субстрата и накопления продукта [1]. Решением представляется поддержание рН на заданном оптимальном уровне. Однако для *Medusomyces gisevii* J. Lindau в отношении синтеза БЦ этот приём проводить нецелесообразно. Ранее нами была исследована зависимость скорости утилизации глюкозы от активной кислотности среды в диапазоне от 3 до 6 и показано, что в условиях искусственного поддержания рН выше 3,0 (с помощью раствора гидроксида аммония) скорость утилизации глюкозы значительно снижалась. Симбиотическая культура саморегулировала уровень рН среды и образование гель-пленки БЦ при отсутствии внешних вмешательств, в этом случае рН естественным образом снижалась в процессе культивирования от 4 до 3 [2].

В таблице и на рис. 2 приведены выходы очищенной БЦ, зарегистрированные через 7 сут культивирования (расчёт на сухое вещество). Наиболее высокий выход зафиксирован при начальной концентрации глюкозы 20 и 25 г/л – 8,4 и 8,3% соответственно. Сопоставляя данные по скорости утилизации субстрата и выходу БЦ, можно сделать вывод, что целесообразной является начальная концентрация глюкозы 20 г/л, при этом наблюдается максимальная скорость утилизации субстрата и максимальный выход БЦ – 8,4% уже через 7 суток культивирования. Повышение концентрации глюкозы в среде приводит к снижению выхода БЦ.

Сравнивая выход БЦ через 7 суток и через 21 сутки культивирования, можно сделать вывод, что увеличение продолжитель-

ности культивирования *Medusomyces gisevii* J. Lindau на питательных средах не приводит к существенному повышению выхода БЦ.

Визуальная оценка гель-пленок БЦ на 7 и 21 сутки показывает, что длительное культивирование оказывает негативное влияние на качество пленок: структура гель-пленок становится неоднородной, на поверхности наблюдаются дефекты (бугристость, слоистость), снижается эластичность.

Выводы

Выявлена зависимость биосинтеза БЦ с помощью симбиотической культуры *Medusomyces gisevii* J. Lindau от концентрации исходного субстрата – глюкозы. Экспериментально определены скорости утилизации глюкозы и выходы бактериальной целлюлозы в интервале начальной концентрации глюкозы от 5 до 55 г/л. Показано, что скорость утилизации глюкозы ингибируется её высокими концентрациями: при концентрации глюкозы выше 15 г/л скорость утилизации снижается, а при концентрации выше 45 г/л – 18% субстрата и более остаётся неутилизованным. Установлено, что повышение концентрации глюкозы выше 20 г/л приводит к снижению выхода бактериальной целлюлозы. Показано, что при начальной концентрации глюкозы 20 г/л скорость утилизации субстрата составляет 0,70 ч⁻¹, субстрат расходуется целевым образом на синтез гель-пленки, а выход бактериальной целлюлозы максимален и составляет 8,4%.

Список литературы

1. Бейли Дж., Оллис О. Основы биохимической инженерии: пер с англ: в 2-х частях. – М.: Мир, 1989. – Ч. 1. – 692 с.
2. Гладышева Е.К., Судакова О.А. Культивирование *Medusomyces gisevii* J.Lindau при различных значениях активной кислотности // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы VII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием, 21–23 мая 2014 г., г. Бийск. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2014. – С. 284–286.
3. Кутышенко В.П., Юркевич Д.И. Влияние тяжелой воды на метаболизм симбиотического организма // Биофизика. – 2002. – № 4. – С. 690–700.

4. Скиба Е.А., Байбакова О.В. Изучение устойчивости штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1693 к ферментативным гидролизным средам // Ползуновский вестник. – 2013. – № 3. – С. 214–219.

5. Юркевич Д.И., Кутышенко В.П. Медузомицет (Чайный гриб): научная история, состав, особенности физиологии и метаболизма // Биофизика. – 2002. – № 6. – С. 1116–1129.

6. Keshk S., Sameshima K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production // African Journal of Biotechnology. – 2005. – № 4 (6). – P. 478–482.

7. Koon-Yang Lee, Gizem Buldum, Anthanasios Mantalaris, Alexander Bismarck. More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Boissynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites // Macromolecular Bioscience. – 2014. – № 6. – P. 10–32.

8. Masaoka S., Ohe T., Sakota N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum* // Journal of Fermentation and Bioengineering. – 1993. – № 75 (1). – P. 18–22.

9. Ross P., Mayer R., Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria // Microbiological reviews. – 1991. – № 55 (1). – P. 35–58.

References

1. Bejli Dzh., Ollis O. Osnovy biokhimicheskoj inzhenerii. Per s angl. V 2-h chastjah. M.: Mir, 1989. Ch.1. 692 p.

2. Gladysheva E.K., Sudakova O.A. Kul'tivirovanie *Medusomyces gisevii* J.Lindau pri razlichnyh znachenijah aktivnoj kislotnosti / Tehnologii i oborudovanie himicheskoj, biotekhnologicheskoj i pishhevoj promyshlennosti: materialy VII Vserossijskoj nauchno-prakticheskoj konferencii studentov, aspirantov i molodyh uchenyh s mezhdunarodnym uchastiem (21–23 maja 2014 g., g. Bijsk). Bijsk: Izd-vo Alt. gos. tehn. un-ta, 2014. pp. 284–286.

3. Kutysenko V.P., Jurkevich D.I. Vlijanie tjazheloj vody na metabolizm simbioticheskogo organizma // Biofizika. 2002. no. 4. pp. 690–700.

4. Skiba E.A., Bajbakova O.V. Izuchenie ustojchivosti shtamma *Saccharomyces cerevisiae* VKPM Y-1693 k fermentativnym gidroliznym sredam // Polzunovskij vestnik. 2013. no. 3. pp. 214–219.

5. Jurkevich D.I., Kutysenko V.P. Meduzomicet (Chajnyj grib): nauchnaja istorija, sostav, osobennosti fiziologii i metabolizma // Biofizika. 2002. no. 6. pp. 1116–1129.

6. Keshk S., Sameshima K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production // African Journal of Biotechnology. 2005. no. 4 (6). pp. 478–482.

7. Koon-Yang Lee, Gizem Buldum, Anthanasios Mantalaris, Alexander Bismarck. More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Boissynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites // Macromolecular Bioscience. 2014. no. 6. pp. 10–32.

8. Masaoka S., Ohe T., Sakota N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum* // Journal of Fermentation and Bioengineering. 1993. no. 75 (1). pp. 18–22.

9. Ross P., Mayer R., Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria // Microbiological reviews. 1991. no. 55 (1). pp. 35–58.

Рецензенты:

Новожилов Е.В., д.т.н., профессор, заведующий кафедрой биотехнологии и биотехнических систем, Северный (Арктический) федеральный университет, г. Архангельск;

Сечин А.И., д.т.н., профессор, Томский политехнический университет, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 28.01.2015.