

УДК 661.728.7

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СТИМУЛИРУЮЩИХ ДОБАВОК НА БИОСИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ПРОДУЦЕНТОМ *MEDUSOMYCES GISEVII SA-12*

Гладышева Е.К.

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

Исследовано влияние стимулирующих добавок на выход бактериальной целлюлозы на синтетической питательной среде. В качестве продуцента в работе использовалась симбиотическая культура *Medusomyces gisevii Sa-12*. Показано, что симбиотическая культура не нуждается в добавлении в питательную среду таких стимулирующих компонентов, как дрожжевой экстракт и этанол, что связано с особым вариантом обмена веществ, при котором все необходимые для нормального функционирования симбиоза питательные вещества самосинтезируются. Установлено, что содержание экстрактивных веществ черного чая в питательной среде, обеспечивающее наибольший выход бактериальной целлюлозы, составляет от 1,6 до 4,8 г/л. Повышенное содержание экстрактивных веществ черного чая угнетает целлюлозосинтезирующую способность. При повышенном содержании происходит замедление процессов жизнедеятельности в клетках уксуснокислых бактерий.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, *Medusomyces gisevii*, биосинтез, этанол, дрожжевой экстракт

EFFECT OF DIFFERENT STIMULATING ADDITIVES ON BACTERIAL CELLULOSE BIOSYNTHESIS BY *MEDUSOMYCES GISEVII SA-12*

Gladysheva E.K.

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

The paper investigates how stimulating additives influence the yield of bacterial cellulose (BC) on a synthetic nutrient broth. Symbiotic *Medusomyces gisevii Sa-12* was used as the BC-producing culture. It is shown that this symbiotic culture does not require stimulating components such as yeast extract or ethanol to be added to the nutrient broth, which is due to a special metabolism pathway in which all the nutrients needed for normal symbiosis functioning are self-synthesized. The content of black tea extractives in the nutrient broth providing the highest BC yield was found to be 1.6 to 4.8 g/L. The increased content of black tea extractives oppresses the cellulose-synthesizing capability. The increased content decelerates the vital activity processes of acetic bacteria cells.

Keywords: bacterial cellulose, *Medusomyces gisevii*, biosynthesis, ethanol, yeast extract

В связи с высокой востребованностью бактериальной целлюлозы (БЦ) в различных отраслях промышленности, особенно в медицине: в качестве основы для раневых покрытий, при протезировании кровеносных сосудов и восстановлении суставных хрящей [1], в настоящее время актуальным вопросом является исследование процесса биосинтеза БЦ [2, 3]. Выход БЦ ограничен в связи тем, что для ее продуцентов БЦ не является целевым метаболитом и питательные вещества тратятся не только на биосинтез БЦ, но и на другие биохимические процессы, протекающие в клетке [4]. Для увеличения выхода БЦ предложено добавлять стимулирующие вещества в питательную среду.

Описано, что этанол при добавлении его в питательную среду оказывает положительное влияние на биосинтез БЦ [5–6]. Этанол подавляет спонтанные мутации целлюлозосинтезирующих бактерий, снижающие их продуктивность. Такие мутации могут появляться при динамических

условиях культивирования. Кроме того, этанол может использоваться как дополнительный источник углерода. Так, для *Gluconacetobacter hansenii* выход БЦ увеличивается от 1,30 до 2,31 г/л при добавлении 1% этанола [6]. Для *Acetobacter sp. A 9 strain*. добавление 1,4% этанола в питательную среду увеличивает выход БЦ на 400% (до 15,2 г/л), что примерно в 4 раза больше, чем на питательной среде, не содержащей этанол [5]. По другим сведениям, добавление 1% этанола к стандартной питательной среде увеличивает выход БЦ в 2–10 раз [6].

Также выход БЦ повышает добавление в питательную среду дрожжевого экстракта. В работе [7] установлено, что концентрация дрожжевого экстракта, обеспечивающего наибольший выход БЦ, составляет 7 г/л. При этом выход БЦ составляет 11,65 г/л. Дрожжевой экстракт в питательных средах является источником азота и аминокислот. Однако использование дрожжевого экстракта повышает стоимость питательной среды. В работе [4] предложено использо-

вать гидролизат рыбного порошка в качестве источника азота и аминокислот. Опыты показали, что 15 г/л гидролизата рыбного порошка в питательной среде увеличивает объемный выход до 3,0 г/л.

Этанол и дрожжевой экстракт – вещества, наиболее часто входящие в состав питательных сред. Кроме них для повышения выхода БЦ используют гептагидрат сульфата магния [8], альгинат натрия [9], лактат [10] и т.д.

Изучение процесса биосинтеза БЦ продуцентом *Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans* на синтетических питательных средах с добавлением различных стимулирующих компонентов показало, что присутствие в питательной среде лактата в динамических условиях культивирования позволяет повысить выход БЦ приблизительно в 4–5 раз [10].

В данной работе в качестве продуцента для биосинтеза БЦ используется симбиотическая культура *Medusomyces gisevii*. Данный продуцент обладает высоким адаптивным потенциалом, способностью утилизировать различные сахара, устойчивостью к фаговым инфекциям [11]. Из литературы известно, что симбиоз *Medusomyces gisevii* очень чувствителен к содержанию экстрактивных веществ чая в питательной среде [11]. К экстрактивным веществам черного чая можно отнести, кофеин, теофиллин, теобромин, и т.д., которые являются активаторами роста БЦ. Следует отметить, отсутствие этих компонентов очень критично. Для биосинтеза БЦ наиболее благоприятное содержание чая в питательной среде от 0,5 до 1,5%. Однако в литературе не описано влияние других стимулирующих добавок, таких как этанол, дрожжевой экстракт, на выход БЦ.

Целью данной работы является исследование влияния стимулирующих добавок на выход БЦ, синтезируемой продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовалась синтетическая питательная среда, приготовленная растворением глюкозы в экстракте черного чая. В качестве инокулята применялась семидневная симбиотическая культура *Medusomyces gisevii*, выращенная на глюкозной среде, доза внесения составляла 10%. Начальная концентрация глюкозы составила 20 г/л, уровень активной кислотности саморегулировался симбиозом [12]. Культивирование проводилось в статических условиях при 27 °С [13].

Концентрация этанола в опыте варьировала и составляла 0,1; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0 и 8,0% (об.). Концентрация дрожжевого экстракта: 0,01; 0,05; 0,1; 0,15 и 0,30%. В качестве контроля использовалась питательная среда без добавления этанола и дрожжевого экстракта.

При изучении влияния экстрактивных веществ черного чая на биосинтез БЦ готовили разные варианты питательных сред, а именно: 1 л дистиллированной воды доводили до кипения, добавляли от 1 до 30 г сухого черного байхового чая, проводили экстракцию в течение 15 минут, охлаждали и отфильтровывали. Согласно ГОСТ [14] минимальное массовое содержание водорастворимых экстрактивных веществ в сухом черном чае составляет 32% (мас.). Таким образом, в 1 г сухого черного чая содержится 0,32 г экстрактивных веществ; в 5 г – 1,6 г; в 10 г – 3,2 г; в 15 г – 4,8 г; в 20 г – 6,4 г; в 25 г – 8 г; в 30 г – 9,6 г.

Изменение концентрации глюкозы контролировалось спектрофотометрическим методом (спектрофотометр «UNICOUV-2804», США) с использованием динитросалицилового реактива, уровень активной кислотности контролировался с помощью иономера (иономер И-160 МИ), прирост пленки БЦ оценивался гравиметрическим методом (весы лабораторные аналитические Explorer EX-224).

Удаление с поверхности БЦ остатков питательной среды и клеток осуществлялось поэтапной обработкой раствором 2%-ного гидроксида натрия и раствором разбавленной соляной кислоты (pH 3) с последующей промывкой дистиллированной водой.

Результаты исследования и их обсуждение

Снижение концентрации глюкозы в процессе биосинтеза БЦ продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12 на питательных средах с различными концентрациями этанола представлено в табл. 1.

Таблица 1

Изменение концентрации глюкозы

Концентрация этанола, об. %	Продолжительность культивирования, сутки											
	0	1	2	5	6	7	8	9	12	14	16	17
контроль	25,0	23,0	21,1	9,1	9,0	6,8	6,1	5,9	5,8	3,1	2,6	2,0
0,1	25,0	25,0	17,5	6,8	6,1	4,6	3,6	2,8	2,0	1,0	0,5	0,5
1,0	25,0	25,0	22,2	11,7	10,4	9,2	8,4	8,1	5,0	3,0	2,5	1,8
1,5	25,0	25,0	22,5	10,9	9,4	7,3	6,8	5,8	5,0	4,3	4,0	3,0
2,0	25,0	25,0	22,6	9,4	7,0	5,6	4,0	2,5	1,9	1,2	0,5	0,5
4,0	25,0	25,0	21,5	11,8	9,0	6,4	5,7	4,1	3,4	2,1	0,7	0,7
6,0	25,0	25,0	22,1	15,3	12,4	9,9	9,3	7,7	6,4	5,0	4,0	3,5
8,0	25,0	25,0	21,7	16,0	13,4	10,4	8,7	8,3	7,4	6,1	5,0	3,0

При концентрациях этанола 0,1; 2,0 и 4,0% (об.) в питательной среде происходит более быстрая утилизация глюкозы по сравнению с контролем. При концентрациях этанола 1,0; 1,5; 6,0 и 8,0% (об.) в питательной среде происходит более медленная утилизация глюкозы по сравнению с контролем.

Зависимость выхода БЦ от концентрации этанола в питательных средах приведена на рис. 1.

Наибольший выход БЦ получен в контрольном опыте и составил 6,0% на 7 сутки и 8,2 на 17 сутки. Далее выход БЦ снижался при добавлении этанола в среду более 0,1% (об.). Несмотря на то, что выход БЦ через 21 сутки выше, чем через 7 суток, качество БЦ при длительном культивировании снижается – гель-плёнки становятся неоднородными, с рваным краем, очистка усложняется, а после высушивания пленки теряют эластичность, становятся хрупкими и ломкими.

Можно сделать вывод, что внесение этанола в питательную среду снижает целлюлозосинтезирующую активность бактерий. Это связано с тем, что *Medusomyces gisevii* – симбиотическая культура и синтез этанола в достаточном количестве обеспечивают дрожжи, входящие в состав культуры [11]. Дополнительная концентрация этанола ока-

зывается избыточной и отрицательно влияет на биосинтез БЦ.

Снижение концентрации глюкозы в процессе биосинтеза БЦ продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12 на питательных средах с различным содержанием дрожжевого экстракта представлено в табл. 2.

При концентрациях дрожжевого экстракта в питательной среде: от 0,05 до 0,3 наблюдается более быстрое потребление глюкозы в питательной среде по сравнению с контролем (табл. 2), но при этом источник углерода не тратится на синтез целевого продукта, так как выход БЦ снижается по сравнению с контролем: при концентрации дрожжевого экстракта 0,1% и выше выход БЦ снижается в 2 раза (рис. 2). Предположительно, добавление дрожжевого экстракта нарушает симбиотические отношения продуцента *Medusomyces gisevii* Sa-12, и глюкоза в основном тратится на поддержание жизнедеятельности микроорганизмов.

Кроме того, добавление дрожжевого экстракта ухудшает качество пленок, пленки приобретают коричневый цвет в результате оседания дрожжевого экстракта на поверхности. Пленки становятся более хрупкими и непрозрачными. Поэтому добавление дрожжевого экстракта при культивировании *Medusomyces gisevii* Sa-12 нецелесообразно [15].

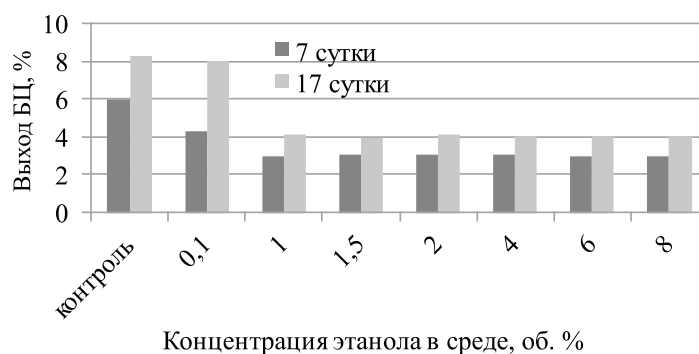


Рис. 1. Зависимость выхода БЦ

Таблица 2

Изменение концентрации глюкозы

Концентрация дрожжевого экстракта, %	Продолжительность культивирования, сутки									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
контроль	25,0	25,0	17,1	7,9	7,2	6,7	6,2	4,6	3,8	3,2
0,01	25,0	25,0	16,1	8,2	6,2	5,0	4,3	3,1	2,2	1,7
0,05	25,0	24,8	11,4	5,3	3,5	2,5	1,3	1,3	1,3	1,2
0,10	25,0	25,0	7,6	2,4	2,0	1,7	1,3	1,2	1,2	1,2
0,15	25,0	25,0	7,8	2,4	2,0	1,7	1,3	1,2	1,2	1,2
0,30	25,0	23,0	7,1	2,1	2,0	1,7	1,6	1,5	1,5	1,5

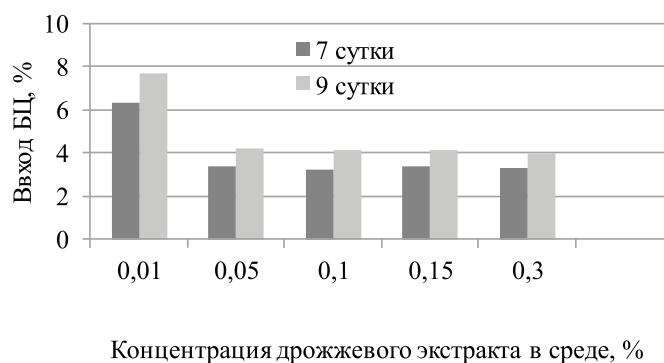


Рис. 2. Зависимость выхода БС



Рис. 3. Изменение концентрации РВ

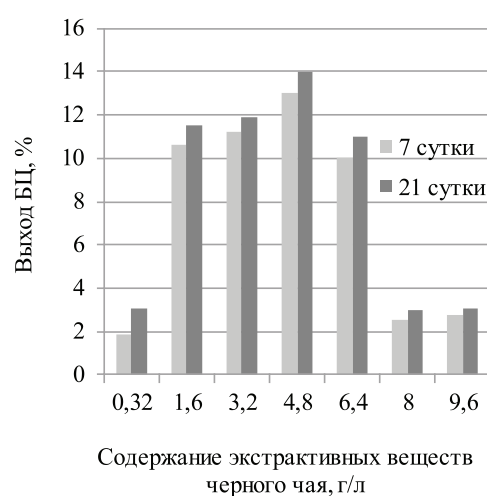


Рис. 4. Выход БС

Таким образом, симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 не нуждается в добавлении в питательную среду таких стимулирующих компонентов, как дрожжевой экстракт и этанол. Это может быть связано с тем, что в ходе своего развития у симбиоза сложился особый вариант обмена веществ, при котором все необходимые для нормального функционирования симбиоза питательные вещества самосинтезируются [11]. Так как для большинства продуцентов БС необходимым является присутствие в питательной среде дополнительных стимулирующих компонентов, с экономической точки зрения использование продуцента *Medusomyces gisevii* благоприятно для производственного процесса, так как не требуется дополнительных затрат на стимулирующие добавки.

На рис. 3 представлено изменение концентрации глюкозы в процессе культивирования *Medusomyces gisevii* Sa-12 на пи-

тательных средах с разным содержанием экстрактивных веществ черного чая.

Изменение концентрации редуцирующих веществ в питательной среде показало, что глюкоза была утилизирована на 7 сутки и составляла менее 2 г/л при содержании экстрактивных веществ черного чая в питательной среде от 3,2 до 9,6 г; при содержании экстрактивных веществ 1,6 г – глюкоза утилизировалась на 9 сутки. При содержании 0,32 г экстрактивных веществ потребление субстрата протекало медленно – глюкоза через 21 сутки не была полностью утилизирована, что свидетельствует о замедлении процессов жизнедеятельности клеток, в связи с недостаточным количеством экстрактивных веществ чая [11].

Наибольший выход БС был получен при содержании экстрактивных веществ черного чая в питательной среде от 1,6 до 4,8 г. На 21 сутки выход БС культивирования составил от 10 до 13%. Наименьший выход получен

при 0,32 г – 1,84%, что подтверждает необходимость присутствия в питательной среде экстрактивных веществ черного чая. Снижение выхода БЦ при содержании экстрактивных веществ черного чая более 6,4 г свидетельствует об их угнетающем воздействии на рост уксуснокислых бактерий (рис. 4). Таким образом, от 1,6 до 4,8 г экстрактивных веществ черного чая в питательной среде обеспечивают максимальный выход БЦ. Антибактериальные свойства чая [11] препятствуют заражению питательной среды, что снижает риск контаминации посторонней микрофлорой и повышает устойчивость.

Выводы

Исследовано влияние стимулирующих добавок на выход БЦ продуцентом *Medusomyces gisevii* Sa-12. Установлено, что симбиотическая культура не нуждается в добавлении в питательную среду таких стимулирующих компонентов, как дрожжевой экстракт и этанол. Добавление этанола и дрожжевого экстракта не только не повышает выход БЦ, но и ухудшает качество пленок. Содержание экстрактивных веществ черного чая в питательной среде, обеспечивающее наибольший выход БЦ, составляет от 1,6 до 4,8 г/л. При содержании экстрактивных веществ черного чая в питательной среде ниже представленного оптимума происходит замедление процессов жизнедеятельности в клетках уксуснокислых бактерий. При содержании экстрактивных веществ чая выше представленного оптимума констатируется угнетающее воздействие на целлюлозосинтезирующую способность микроорганизмов. Таким образом симбиотическая культура *Medusomyces gisevii* Sa-12 не нуждается в дополнительных стимулирующих добавках, таких как этанол и дрожжевой экстракт, и наибольший выход БЦ получен при содержании экстрактивных веществ черного чая от 1,6 до 4,8 г/л.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-19-01054).

Список литературы

1. Гладышева Е.К. Обоснование выбора питательной среды для синтеза бактериальной целлюлозы / Е.К. Гладышева // Вестник Алтайской науки. – 2014. – № 1. – С. 307–310.
2. Liiaskina E., Revin V., Nazarkina M., Bogatyreva A., Shchankin M. Cost-effective production of bacterial cellulose using food industry by-products // Journal of Biotechnology. – 2015. – Vol. 208. – P. 117.
3. Получение бактериальной целлюлозы на среде с мелассой / Н.Б. Сапунова и [др.] // Вестник Казанского технологического университета. – 2016. – Т. 19, № 24. – С. 154–156.
4. Lee K.-Y., Buldum G., Mantalaris A., Bismarck A. More than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Boisynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites // Macromolecular Bioscience. – 2014. – № 6. – P. 10–32.
5. Гладышева Е.К. Влияние углеродного состава питательных сред на продуктивность целлюлозосинтезирующих бактерий (обзор) / Е.К. Гладышева, Е.А. Скиба // Ползуновский вестник. – 2014. – № 3. – С. 168–173.
6. Синтез целлюлозы изолятами уксуснокислых бактерий из «Чайного гриба» / Н.И. Петухова и [др.] // Башкирский химический журнал. – 2016. – Т. 23, № 1. – С. 7–13.
7. Pourramezan G.Z., Roayaei A.M., Qezelbash Q.R. Optimization of culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2 // Biotechnology. – 2009. – vol. 8, № 1. – P. 150–154.
8. Son H.J., Kim H.G., Kim K.K., Kim H.S., Kim Y.G., Lee S.J. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions // Bioresource technology. – 2003. – vol. 86, № 3. – P. 215–219.
9. Zhou L.L., Sun D.P., Hu L.Y., Li Y.W., Yang J.Z. Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* // Journal of industrial microbiology and biotechnology. – 2007. – № 34. – P. 483–489.
10. Matsuoka M., Tsuchida T., Matsushita K., Adachi O., Yoshinaga F. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* subsp. *Sucrofermentans* // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 1996. – vol. 60, № 4. – P. 575–579.
11. Юркевич Д.И. Медузомицет (Чайный гриб): научная история, состав, особенности физиологии и метаболизма / Д.И. Юркевич, В.П. Кутышенко // Биофизика. – 2002. – № 6. – С. 1116–1129.
12. Гладышева Е.К. Биосинтез бактериальной целлюлозы культурой *Medusomyces gisevii* / Е.К. Гладышева, Е.А. Скиба // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий – 2015. – № 3. – С. 149–156.
13. Гладышева Е.К. Исследование влияния температуры на синтез бактериальной целлюлозы продуцентом *Medusomyces gisevii* / Е.К. Гладышева // Современные наукоемкие технологии. – 2016. – № 8–1. – С. 36–40.
14. ГОСТ 32573-2013. Чай черный. Технические условия. – Взамен 1938-90; введ. 01.07.2015. – М.: Изд-во стандартов, 2014. – 8 с.
15. Гладышева Е.К. Изучение влияния этанола и дрожжевого экстракта на биосинтез бактериальной целлюлозы, продуцентом *Medusomyces gisevii* // Пищевые инновации и биотехнологии: материалы Международной научной конференции, (Кемерово, 28 апреля 2015 г.) – Кемерово, 2015. – С. 48–50.