

Гринберг, Т.А. Микробные ассоциации — продуценты экзополисахаридов на этаноле / Т. А. Гринберг, Т.П. Пирог, В.Н. Супрун, В.Н. Буклова, Л.А. Загордонец, Ю.Р. Малащенко // Микробиол. журнал. — 1990. — 52, № 6. — С. 30—34.

Т. А. Гринберг, Т. П. Пирог, С. М. Супрун, В. Н. Буклова,
Л. А. Загордонец, Ю. Р. Малащенко

Ин-т микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев

МИКРОБНЫЕ АССОЦИИИ — ПРОДУЦЕНТЫ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ НА ЭТАНОЛЕ

С целью получения высоковязкого экзополисахаридов на простой минеральной среде без внесения дополнительных факторов роста составлены двухкомпонентные экспериментальные ассоциации продуцента экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. и *A. calcoaceticus*, а также *Acinetobacter* sp. и микромицета *Fusarium* sp. Соотношение количества клеток продуцента экзополисахаридов и ассоцианта составляет 3 : 1—4 : 1. Путем вариации компонентов среды подобраны условия, позволившие достичь поставленной цели при культивировании обеих смешанных культур в ассоциациях. Полученный эффект объясняется трофическим взаимодействием и обменными процессами исследованных монокультур. Тип взаимодействия определен как комменсализм — конкуренция. Предполагается новая двухступенчатая безотходная технология получения белково-витаминного концентрата на основе биомассы микромицета фузария и высоковязкой культуральной жидкости, содержащей продуцируемый *Acinetobacter* sp. экзополисахарид.

Использование смешанных культур микроорганизмов для получения высоковязких экзополисахаридов (ЭПС) известно [1, 9, 10]. Подбор микроорганизмов для формирования устойчивых смешанных культур проводят на основе глубокого изучения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов-ассоциантов. Основная задача при составлении микробных ассоциаций заключается в повышении их устойчивости, продуктивности и улучшении качества конечного продукта.

Цель настоящей работы заключалась в подборе ассоциантов, продуцирующих пантотеновую кислоту, для совместного культивирования их с аукоотрофным штаммом *Acinetobacter* sp.— продуцентом ЭПС на этаноле.

Материал и методы. Объектами исследований были штамм *Acinetobacter* sp.— продуцент ЭПС [2], штамм бактерий *Acinetobacter calcoaceticus* [5] и штамм микромицетов *Fusarium* sp. [3]. Культивирование указанных штаммов и экспериментальных ассоциаций осуществляли на среде Кодама [6] в колбах на качалке при температуре 30 °С в течение 72 ч. В качестве источника углерода использовали этанол в концентрации 1 % об., в качестве источника азота — NH_4NO_3 или NH_4Cl .

Синтезированный *Acinetobacter* sp. ЭПС представляет собой ацилированный кислый гетерополисахарид, состоящий из остатков нейтральных сахаров — глюкозы, галактозы, маннозы и рамнозы (10 : 4 : 8 : 2), замещенных остатками пировиноградной кислоты в виде кетала и этерифицированных жирными кислотами [2].

При составлении экспериментальных ассоциаций *Acinetobacter* sp.— *A. calcoaceticus* и *Acinetobacter* sp.— *Fusarium* sp. использовали односуточные культуры, выращенные на жидкой среде Кодама. Соотношение культур составляло 3 : 1 по объему клеточной суспензии. Контроль количества клеток в составленных ассоциациях проводили методом подсчета в камере Горяева и при расसेве на сусло-агар и МПА — методом предельных разведений.

Культивирование *Acinetobacter* sp. осуществляли также на супернатанте культуральной жидкости после 24-часового выращивания *Fusarium* sp. Для получения супернатанта проводили отделение клеток путем центрифугирования при 6000 об/мин в течение 30 мин. Полученный супернатант стерилизовали кипячением на водяной бане в течение 20 мин. Супернатант вносили в среду культивирования *Acinetobacter* sp. в количестве 1, 20 и 50 % по объему. При выращивании *Acinetobacter* sp. на 100 %-м супернатанте к нему добавляли 1 % объема этанола.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточных суспензий с последующим пересчетом на абсолютно сухой вес по калибровочному графику, удельную скорость роста культур рассчитывали по формуле:

$$\mu = \frac{2,3 (\lg x_2 - \lg x_1)}{t_2 - t_1},$$

где x_1 и x_2 — биомасса в моменты времени t_1 и t_2 [4].

Таблица 1. Некоторые биосинтетические характеристики исследуемых культур микроорганизмов при росте на этаноле без внесения дополнительных факторов роста

Исследуемые монокультуры	Биомасса, г/л	ЭПС, г/л	V_3 , мкг/мл	Вязкость культуральной жидкости, сП	μ , ч ⁻¹
<i>Acinetobacter</i> sp.	0,5	0,3	0	5—8	—
<i>Acinetobacter</i> sp.*	2,85	2,45	0	502,4	0,19
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	4,3	0,6	0,5—0,7	1,0	0,30
<i>Fusarium</i> sp.	2,3	0	0,5—1,0	1,0	0,18

Примечание. «—» — не определяли. * Среда Кодама с добавлением витамина V_3 (0,0003 %) и дрожжевого автолизата (0,2 %).

Таблица 2. Некоторые параметры культивирования экспериментально составленных ассоциаций и монокультуры *Acinetobacter* sp. на среде Кодама с NH_4NO_3 и этанолом

Исследуемые культуры	Биомасса, г/л	ЭПС, г/л	Вязкость культуральной жидкости, сП	Соотношение количества клеток
<i>Acinetobacter</i> sp. + <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	2,9	3,0	575	3 : 1
<i>Acinetobacter</i> sp. + <i>Fusarium</i> sp.*	2,8	2,9	670	4 : 1
<i>Acinetobacter</i> sp.**	2,85	2,65	542,4	—

* Среда Кодама с 0,2 % дрожжевого автолизата. ** Среда Кодама с 0,0003 % пантотената и 0,5 % дрожжевого автолизата.

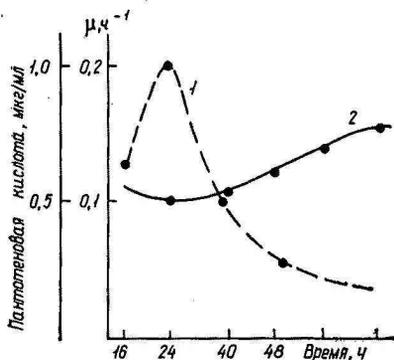
Содержание углеводов в культуральной жидкости определяли по реакции с фенолом и серной кислотой [8], количество экзогенной пантотеновой кислоты (витамин V_3) в супернатантах культур *A. calcoaceticus* и *Fusarium* sp. — микробиологическим методом с применением индикаторной культуры *Saccharomyces ludwigii* [7]. Вязкость культуральной жидкости измеряли с помощью вискозиметра ВПЖ.

Авторы выражают благодарность М. Н. Гавриленко за предоставление культуры бактерий *A. calcoaceticus*.

Результаты и их обсуждение. Продуцент высоковязкого ЭПС — штамм *Acinetobacter* sp. — аукоктроф и требует для роста и синтеза полисахаридов внесения в ростовую среду дополнительных факторов роста — пантотеновой кислоты и дрожжевого автолизата в концентрациях 0,0003 и 0,5 % соответственно. После проведения скрининга музейных культур, продуцирующих экзогенную пантотеновую кислоту и растущих на этаноле, были отобраны две культуры — штамм бактерий *A. calcoaceticus* и микромицет *Fusarium* sp. Отобранные культуры не требуют дополнительных факторов роста, ассимилируют этанол, *A. calcoaceticus* продуцирует до 0,6 г/л внеклеточных углеводов, обе культуры синтезируют от 0,5 до 1,0 мкг/мл экзогенной пантотеновой кислоты (табл. 1).

Антагонизма между отобранными культурами и продуцентом ЭПС *Acinetobacter* sp. не выявлено. Ни бактериальная культура, ни микромицеты не ассимилируют синтезируемый *Acinetobacter* sp. ЭПС в качестве источника углеродного питания.

Максимальная удельная скорость роста *A. calcoaceticus* на среде Кодама с 1,0 % этанола составляет $0,3 \text{ ч}^{-1}$, а максимальная удельная скорость роста *Acinetobacter* sp. — $0,19 \text{ ч}^{-1}$. Это предполагает конкуренцию (при совместном выращивании) между культурами за субстрат. Экспериментально подтверждено, что при культивировании смешанной культуры *Acinetobacter* sp. и *A. calcoaceticus* при начальном соотношении клеток 3 : 1 в течение двух последовательных пересевов наблюдается вымывание *Acinetobacter* sp. При замене источника азотного питания в среде Кодама — аммонийной формы на аммонийно-нитратную (нитратную форму азота *A. calcoaceticus* не ассимилирует) — нам удалось добиться ограничения роста *A. calcoaceticus* и создания устойчивой ассоциации двух



Изменение удельной скорости роста *Fusarium* sp. (1) и концентрации пантотеновой кислоты (2) при культивировании гриба на среде Кодама с этанолом в периодическом процессе.

культур в соотношении 3 : 1—4 : 1, синтезирующей высоковязкий ЭПС (табл. 2). Тип взаимоотношений между ассоциантами может быть определен как конкуренция — комменсализм. Совместное культивирование культур позволяет вести процесс получения ЭПС без внесения дополнительных факторов роста.

Изучение физиологических особенностей роста *Fusarium* sp. на среде Кодама с этанолом позволило установить, что максимальная скорость роста культуры на 24—26-й час роста равна $0,18 \text{ ч}^{-1}$; концентрация экзогенной пантотеновой кислоты на 26—30-й ч роста составляет 0,5 мкг/мл, к 72-му часу роста она достигает 0,75 мкг/мл (рисунок).

Таким образом, исследуемые культуры существенно не отличаются друг от друга по скорости роста, причем *Fusarium* sp. ассимилирует как аммонийную, так и нитратную форму азота. При культивировании в ассоциации у *Fusarium* sp. есть преимущество — он не нуждается в дополнительных факторах роста и, следовательно, вытесняет *Acinetobacter* sp. Добавление в среду культивирования такой смешанной культуры 0,2 % дрожжевого автолизата позволяет добиться получения устойчивой ассоциации, продуцирующей вязкий экзополисахарид (см. табл. 2).

В связи с тем, что изучаемые культуры конкурируют за источники углеродного и азотного питания, исследовали возможность получения ЭПС на супернатанте культуральной жидкости *Fusarium* sp. *Fusarium* sp. на 20—24-м часу роста синтезирует достаточное для роста *Acinetobacter* sp. количество пантотеновой кислоты (см. рисунок). Поэтому в работе использовали 24-часовой супернатант культуральной жидкости *Fusarium* sp. Как видно из приведенных данных (табл. 3), внесение в среду культивирования *Acinetobacter* sp. 1 % супернатанта культуральной жидкости *Fusarium* sp. стимулирует рост и синтез ЭПС. Дальнейшее увеличение содержания супернатанта (20—50 %) не приводит к существенным изменениям показателей процесса, что можно объяснить снижением pH среды за счет внесения супернатанта. Однако культивирование *Acinetobacter* sp. на 100 %-м супернатанте культуральной жидкости *Fusarium* sp. с добавлением 1 % этанола при поддержании pH на уровне 6,8—7,0 позволяет получать высоковязкий ЭПС. Количество синтезированного ЭПС сопоставимо с концентрацией ЭПС, по-

лучаемого при культивировании продуцента на среде Кодама с добавлением пантотената и дрожжевого автолизата. Таким образом, показана возможность культивирования продуцента ЭПС на супернатанте культуральной жидкости после суточного выращивания микромицета без внесения в среду дополнительных факторов роста.

Биомасса, синтезируемая *Fusarium* sp., может быть использована для получения кормового и пищевого белка, так как она содержит 30—53 % белка, комплекс витаминов и незаменимые аминокислоты — лизин, треонин, лейцин [3]. Полученные нами результаты исследований

Таблица 3. Показатели роста *Acinetobacter* sp. и образования им экзополисахаридов на среде Кодама с добавлением супернатанта культуральной жидкости *Fusarium* sp.

Содержание супернатанта, %	Биомасса, г/л	ЭПС, г/л	Вязкость культуральной жидкости, сП	pH конечный
0	0,3	0,32	3,3	4,9
1	0,9	0,96	85,0	4,85
20	1,1	1,1	73,0	4,3
50	0,94	1,1	83,0	4,05
100*	2,20	2,12	532,0	6,8

Примечание. При культивировании *Acinetobacter* sp. на среде Кодама, содержащей пантотенат и дрожжевой автолизат (контроль), концентрация биомассы — 2,3 г/л, ЭПС — 2,4 г/л, вязкость культуральной жидкости — 502 сП, pH конечный — 6,8; * При культивировании на 100 %-м супернатанте pH поддерживали на уровне 6,0—7,0 путем добавления 10 %-го NaOH.

позволяют рекомендовать двухступенчатый технологический процесс получения белково-витаминного концентрата на основе биомассы *Fusarium* sp. на первой ступени ферментации и высоковязкого ЭПС с помощью культуры *Acinetobacter* sp. — на второй. При этом может быть предложена дешевая безотходная технология получения промышленно ценных продуктов, так как супернатант культуральной жидкости после выращивания *Fusarium* sp. полностью используется для получения ЭПС, а синтезированный ЭПС может быть рекомендован в виде вязкой культуральной жидкости (после плазмолиза) для применения в нефтедобывающей промышленности.

Т. О. Гринберг, Т. П. Пирог, С. М. Супрун, В. М. Буклова,
Л. А. Закардонцев, Ю. Р. Малашенко

Ин-т мікробіології та вірусології АН УРСР, Київ

МИКРОБНИ АСОЦІАЦІЇ — ПРОДУЦЕНТИ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ НА ЕТАНОЛІ

Резюме

З метою одержання високов'язкого екзополісахариду на простому мінеральному середовищі без внесення додаткових факторів росту складені двокомпонентні експериментальні асоціації продуцента екзополісахаридів *Acinetobacter* sp. і *A. calcoaceticus*, а також *Acinetobacter* sp. та мікромицета *Fusarium* sp. Співвідношення кількості клітин продуцента екзополісахариду та асоціанта становить 3:1—4:1. Шляхом варіації компонентів середовища підбрані умови, що дають змогу досягти поставленої мети при культивуванні обох змішаних культур у асоціаціях. Одержаний ефект пояснюється трофічною взаємодією та обмінними процесами досліджуваних монокультур. Тип взаємодії визначений як коменсалізм — конкуренція. Припускається нова двоступінчата безвідходна технологія одержання білково-вітамінного концентрату на основі біомаси мікромицета фузарію та високов'язкої культуральної рідини, що містить екзополісахарид, який продукується *Acinetobacter* sp.