

Малашенко, Ю. Р. Образование экзополисахаридов иммобилизованными клетками *Micrococcus* sp., растущими на этаноле / Ю. Р. Малашенко, Т.А. Гринберг, Т.П. Пирог, В. И. Карпенко // Биотехнология. — 1987. — 3, № 3. — С. 386—390.

УДК 577. 124.5:579.861.1.04.083.134:547.261

## Образование экзополисахаридов иммобилизованными клетками *Micrococcus* sp., растущими на этаноле

Ю. Р. МАЛАШЕНКО, Т. А. ГРИНБЕРГ, Т. П. ПИРОГ, В. И. КАРПЕНКО  
Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного АН УССР, г. Киев

Показано, что иммобилизация клеток *Micrococcus* sp. методом адсорбции на крупнопористых носителях позволяет интенсифицировать процесс синтеза экзополисахаридов (ЭПС). Установлено, что отсутствие клеток в КЖ, содержащей ЭПС, наблюдается при введении в реактор с иммобилизованными клетками питательной среды, не содержащей источника азотного питания. Образование ЭПС на этих средах на 10—16% меньше, чем их накопление на полноценных средах.

Увеличение синтетической активности биокатализаторов (клетки, ферментные системы, ферменты и т. п.) может быть достигнуто путем иммобилизации микробных клеток продуцентов первичных и вторичных метаболитов на специфических носителях.

Использование иммобилизованных клеток позволяет получать бесклеточную КЖ, что исключает сложные процедуры отделения образуемого продукта от клеток [1].

В настоящее время получение с помощью иммобилизованных на пористых носителях клеток высокомолекулярных соединений, в частности ЭПС не достаточно изучено [2, 3].

Целью работы явилось изучение способности образования ЭПС иммобилизованными бактериальными клетками *Micrococcus* sp., закрепленными на различных пористых носителях.

### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали культуру *Micrococcus* sp., выделенную из активного ила станции биологической очистки сточных вод нефтеперерабатывающего завода. В качестве носителей применяли песок, активированный уголь, немодифицированный силохром с величиной пор в частях 3, 4 и 2 мкм, соответственно, и размером частиц 300—500 мкм.

Для иммобилизации использовали микробные клетки в логарифмической фазе роста, выращенные на мясо-пептонном агаре (18 ч роста). Иммобилизацию осуществляли следующим образом: в колонку с носителем (реактор) добавляли клеточную суспензию, содержащую  $(2,0—3,0) \cdot 10^8$  кл./мл и выдерживали в течение 4—6 ч. Степень иммобилизации определяли по величине оптической плотности клеточной суспензии (с последующим пересчетом на АСВ) на входе и выходе из колонки, заполненной носителем. Количество иммобилизованных клеток в каждом реакторе составляло  $0,50 \pm 0,05$  г АСВ. В контрольных опытах в реактор вносили такое же количество свободных клеток.

Для изучения влияния состава сред на биосинтетическую активность культуры (образование ЭПС и биомассы) применяли среду I, содержащую, г/л:  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — 0,6;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,4;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,01;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,01;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  — 7,24;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 3,54, и среду II, отличающуюся от среды I тем, что вместо фосфорных солей использовали фосфорную кислоту в эквимолярной концентрации по фосфору. В качестве источника углеродного питания использовали этанол (2 об. %). Культивирование осуществляли в течение 4 сут на качалке ( $220 \text{ мин}^{-1}$ ) при  $30^\circ$  и pH 6,8—7,0. В процессе культивирования на среде II нужное значение pH достигали добавлением 1 М NaOH или KOH. По окончании культивирования КЖ, содержащую ЭПС, сливали, к иммобилизованным

клеткам добавляли свежую среду (эту операцию проводили пятикратно). В КЖ определяли уровень накопления биомассы клеток и ЭПС. Выращивание свободных клеток осуществляли в тех же условиях, что и иммобилизованных.

Количество иммобилизованной биомассы определяли после смыва клеток с носителей буфером высокой ионной силы (Na-фосфатный буфер, pH 7,6, содержащий 1 M NaCl). Процедуру смыва иммобилизованных клеток проводили трижды; количество иммобилизованных и свободных клеток определяли по величине оптической плотности клеточной суспензии.

Удельную скорость роста клеток ( $\mu$ ) и образования ЭПС (Q) рассчитывали по методике [4], количество синтезированных ЭПС — как в работе [5]. Состав моносахаридов ЭПС определяли с помощью бумажной и газожидкостной хроматографии (ГЖХ) [6]; концентрацию этанола — методом ГЖХ на хроматографе «Цвет-4» с пламенно-ионизационным детектором (колонка 2 м, твердый носитель — целит-545, неподвижная жидкая фаза — ПЭГ-400 (20%), газ-носитель — гелий, температура 150°).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что *Micrococcus sp.* при периодическом культивировании на жидкой минеральной среде с этанолом в качестве единственного источника углерода синтезирует ЭПС. Определено, что в состав ЭПС входят следующие моносахара: глюкоза, манноза, галактоза, ксилоза, арабиноза, рамноза в соотношении 3,00:3,64:1,00:0,30:2,40:0,42. Известно, что эффективное удержание клеток — продуцентов ЭПС на пористом носителе возможно, когда величина пор носителя больше 0,5 мкм, а частиц — от 100 до 600 мкм [2]. Показано, что применяемые носители (песок, активированный уголь, немодифицированный силохром) удовлетворяют этим требованиям. Степень иммобилизации клеток на них составляла 90%.

Проведенные исследования показали, что после первой генерации иммобилизованных клеток *Micrococcus sp.*, культивируемых на среде I, уровень образования ЭПС ими ниже, чем у свободных клеток, выращенных в идентичных условиях. Однако при последующих добавлениях свежей среды наблюдается стабилизация процесса синтеза ЭПС и уровень его выше, чем в случае культивирования свободных клеток (табл. 1).

Установлено, что хранение иммобилизованных клеток *Micrococcus sp.* в течение 72 дней на указанных носителях при +4° позволяет сохранить жизнеспособность культуры (табл. 2).

Таблица 1

Образование ЭПС иммобилизованными и свободными клетками *Micrococcus sp.*

Носитель	Образование ЭПС, г/л при последовательных процедурах замены среды на свежую, раз				
	1	2	3	4	5
	Песок	2,70	3,45	3,75	3,80
Уголь активированный	2,40	3,30	3,20	3,30	3,30
Силохром немодифицированный	2,65	3,50	3,75	3,75	3,80
Без носителя (свободные клетки)	3,15	3,20	3,25	3,20	3,20

Таблица 2

Интенсивность образования ЭПС иммобилизованными клетками *Micrococcus sp.* в зависимости от срока их хранения

Носитель	ЭПС, г/л	
	1-й день хранения	72-й день хранения
Песок	3,75	3,80
Уголь активированный	3,30	3,35
Силохром немодифицированный	3,80	3,75
Без носителя (свободные клетки)	3,20	3,05

Таблица 3

Синтез ЭПС и накопление клеточной биомассы при культивировании свободных и иммобилизованных клеток *Micrococcus sp.* через 4 сут

Носитель	Среда	Биомасса клеток, г/л	ЭПС, г/л
Песок	I	3,90	3,75
	II	4,20	4,06
Уголь активированный	I	3,84	3,30
	II	3,60	2,86
Немодифицированный силихром	I	4,20	3,80
	II	4,35	4,10
Без носителя (свободные клетки)	I	3,80	3,20
	II	3,95	3,40

Природа носителя и среды влияет не только на уровень синтеза ЭПС, но и на накопление продуцентом биомассы (табл. 3).

Показано, что иммобилизованные клетки размножаются в питательной среде, о чем свидетельствует значительное содержание их биомассы в КЖ (см. табл. 3).

При использовании иммобилизованных клеток *Micrococcus sp.* интенсифицируется процесс потребления субстрата (рис. 1).

Максимальная скорость потребления этанола клетками, закрепленными на носителях, составляет 0,5 мл/ч, свободными — 0,4 мл/ч.

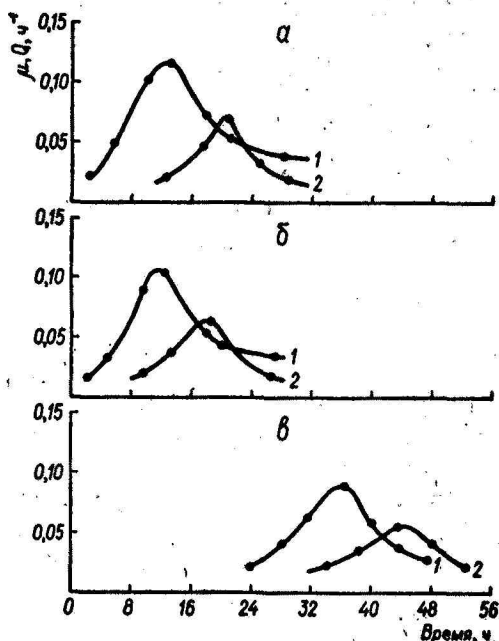
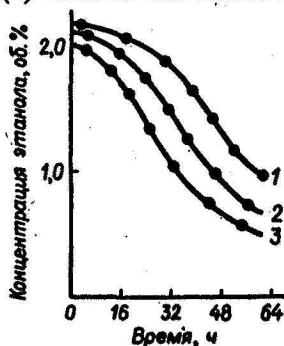
Изучение динамики роста и образования ЭПС как свободными, так и иммобилизованными клетками *Micrococcus sp.* показало, что максимальные удельные скорости роста популяции и синтеза ЭПС во времени не совпадают, что характерно для синтеза микроорганизмами вторичных метаболитов (рис. 2).

Культивирование свободных клеток *Micrococcus sp.* характеризуется длительной лаг-фазой и сравнительно короткой логарифмической фазой

Рис. 1. Динамика потребления этанола иммобилизованными и свободными клетками *Micrococcus sp.*:

1 — свободные клетки; 2 — клетки, иммобилизованные на песке; 3 — клетки, иммобилизованные на немодифицированном силихроме

Рис. 2. Удельная скорость роста  $\mu$  (1) и образования ЭПС  $Q$  (2) иммобилизованными на песке (а), немодифицированном силихроме (б) и свободными (в) клетками *Micrococcus sp.*



роста. При культивировании иммобилизованных клеток практически отсутствует лаг-фаза и продолжительность логарифмической фазы роста увеличена. Максимальная удельная скорость роста и синтеза ЭПС у иммобилизованных клеток *Micrococcus sp.* выше, чем у свободных. При культивировании свободных клеток значение  $\mu$  на 34-м часу роста составляло  $0,08 \text{ ч}^{-1}$ , а максимальная удельная скорость синтеза ЭПС на 44-м часу роста —  $0,055 \text{ ч}^{-1}$ ; при культивировании иммобилизованных клеток на песке значение  $\mu$  равно  $0,13 \text{ ч}^{-1}$ , а на силохроме —  $0,11 \text{ ч}^{-1}$ , зарегистрировано на 12-ом и 10-ом часу роста культуры, соответственно. Значения максимальной удельной скорости синтеза ЭПС иммобилизованными клетками составили на песке  $0,07 \text{ ч}^{-1}$ , на силохроме  $0,065 \text{ ч}^{-1}$  на 20-м и на 18-м часу роста культуры, соответственно.

В литературе имеются сведения о возможности смещения синтеза вторичных метаболитов из стационарной в логарифмическую фазу роста, что определяется влиянием ряда внешних факторов на процесс культивирования продуцентов биологически активных веществ [7]. Выбранные условия культивирования иммобилизованных клеток *Micrococcus sp.* позволили сместить синтез ЭПС (вторичного метаболита) к более ранней ростовой фазе культуры. Можно предположить, что смещение удельной скорости синтеза ЭПС у иммобилизованных клеток *Micrococcus sp.* обусловлено их большей скоростью роста и, следовательно, физиологической активностью клеточной популяции по сравнению со свободными клетками. Видимо, при иммобилизации клеток происходит селекция культуры, обладающей повышенным и сбалансированным с ростом синтезом ЭПС.

Иммобилизованные клетки различных видов микроорганизмов, помещенные в полноценную среду, образуют ЭПС в течение всего процесса роста (например, *Xanthomonas*) или только в стационарной фазе (например, *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*). В случае использования последних возможно получение ЭПС, не содержащего клеток [2]. На безазотистой среде иммобилизованные клетки, находящиеся в фазе активного образования ЭПС, продолжали синтезировать ЭПС без накопления клеточной биомассы, т. е. представляли собой полиферментные системы, функционирующие с образованием ЭПС (рис. 3).

Однако при этом наблюдается некоторое снижение конечной концентрации ЭПС. Так, количество ЭПС, синтезированных иммобилизованными клетками, уменьшается на 15—20 % при ферментации на безазотистой среде, в то время как при культивировании свободных клеток в идентичных условиях наблюдается снижение концентрации ЭПС более чем в два раза.

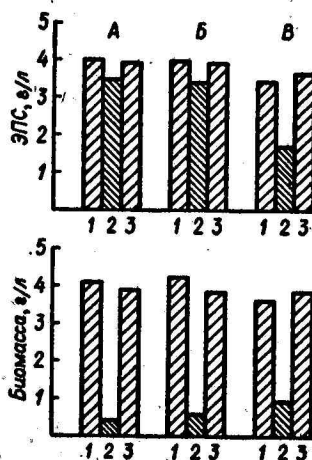


Рис. 3. Образование биомассы и ЭПС иммобилизованными на песке (А), немодифицированном силохроме (Б) и свободными (В) клетками *Micrococcus sp.* при последовательной смене сред (1, 2, 3):

1, 3 — среда 1; 2 — среда 1 без источника азотного питания

При замене безазотистой среды с накопленным в ней ЭПС на свежую порцию безазотистой среды наблюдается снижение на 50 % количества синтезируемого продукта, однако биосинтетическая активность клеток полностью восстанавливается при введении в реактор азотсодержащей среды (см. рис. 3).

Таким образом, осуществление периодической смены сред (азотсодержащих и безазотистых) позволяет сохранить жизнеспособность культуры *Micrococcus sp.* и уровень синтеза ею ЭПС. При этом возможно получение КЖ, свободной от клеток, что исключает на этапах выделения целевого продукта трудоемкую стадию отделения его от клеток. Полученные результаты показывают целесообразность применения иммобилизованных клеток *Micrococcus sp.* для получения ЭПС.

Поступила 10.07.86

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кощеев К. А. — Биотехнология, 1985, № 2, с. 117—122.
2. Патент Франции № 2488909, 1982.
3. Кощеев К. А. — В сб.: Итоги науки и техники. Микробиология. — М.: ВИНТИ, 1981, т. 11, с. 55—117.
4. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978.
5. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K. et al. — *Anal. Chem.*, 1956, v. 28, № 3, p. 350—356.
6. Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов. — Киев: Наукова думка, 1982. — 192 с.
7. Баснакян И. Я., Шафоростова Л. Д., Боровкова В. М. — В кн.: Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов. — М.: Наука, 1980, с. 20—35.

## Production of Exopolysaccharides by Immobilized Cells of *Micrococcus sp.*, Growing on Ethanol

YU. R. MALASHENKO, T. A. GRINBERG, T. P. PIROG, V. I. KARPENKO  
D. K. ZABOLOTNYI INSTITUTE OF MICROBIOLOGY AND VIRUSOLOGY,  
Ukrainian Academy of Sciences, Kiev

Adsorptive immobilization of *Micrococcus sp.* cells onto large pore matrixes was shown to keep the process of exopolysaccharide synthesis at a reasonable level. Strong adsorption of the cells ensuring their absence in the culture liquid was attained by using nutrient medium deficient in nitrogen source. Exopolysaccharide production in this case was found to be 10—16 % lower than that in the case of basal nutrient media.

ДЕПОНИРОВАНО ВО ВНИИСЭНТИ

УДК 663.1.013.5.001.2

Определение энергии активации роста дрожжей по результатам периодического культивирования. Арзамасцев А. А. — Тамбов: Тамбовский ин-т хим. машиностроения, 1986. — 10 с., ил. — Библиогр.: 10 назв. — (Рукопись деп. во ВНИИСЭНТИ 28 окт. 1986 г., № 348 мб-Деп. 86).

По результатам периодического культивирования определено значение энергии активации  $E$  для роста смешанной культуры дрожжей, используемой в промышленности. В диапазоне температур от 24,5 до 30° С  $E=68000$  Дж/моль, а значение предэкспоненциального множителя составляет  $1,47 \cdot 10^{11}$  ч<sup>-1</sup>. Определены также величины  $Q$  и  $Q_{10}$ . Их численные значения соответственно составили:  $Q=1,095$ ;  $Q_{10}=2,4$ . Определение этих параметров позволяет прогнозировать изменение максимальной удельной скорости роста дрожжей в широких диапазонах изменения температуры.