

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА АЛКАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *PAENIBACILLUS MANNANOLYTICUS* – ПРОДУЦЕНТА ВЯЗКОГО ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА

Аптикаева А.А., Четвериков С.П., Сафарова В.Г.

ФГБУН «Уфимский институт биологии РАН», Уфа, Россия (450054, г. Уфа, просп. Октября, 69), e-mail: chekov@mail.ru

С помощью метода полного факторного эксперимента изучена зависимость кинематической вязкости экзополисахарида и титра клеток штамма алкалофильных бактерий *Paenibacillus mannanolyticus* IB-OR17B от параметров культивирования, получены адекватные математические модели, описывающие эту зависимость. Установлено влияние источника углерода и его содержания в среде, перемешивания (аэрации), pH, температуры и продолжительности культивирования на уровень микробиологического синтеза экзополисахарида. Показано, что максимальная вязкость достигается на средах с крахмалом, при его содержании в среде от 15 г/л, температуре культивирования 36 °С, кислотности среды pH 9, принудительной аэрации и перемешивании. Вязкость получаемой культуральной жидкости выше 8000 сСт. Таким образом, впервые показана способность к синтезу экзополисахарида алкалофильными бактериями *Paenibacillus mannanolyticus* при культивировании в щелочных условиях.

Ключевые слова: экзополисахарид (ЭПС), *Paenibacillus*, вязкость.

## OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS OF THE ALCALIPHILIC BACTERIA STRAIN *PAENIBACILLUS MANNANOLYTICUS* – VISCOUS EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCENT

Aptikaeva A.A., Chetverikov S.P., Safarova V.G.

Ufa Institute of Biology, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia (450054, Ufa, pr. October 69), e-mail: chekov@mail.ru

The dependence of kinematic viscosity of exopolysaccharides and cell titer of the alkaliphilic bacteria strain *Paenibacillus mannanolyticus* IB-OR17B from the cultivation parameters were studied using the method of full factorial experiment. We obtained adequate mathematical models describing this dependence. Influence of carbon source and its concentration in the medium, shaking (aeration), pH, temperature and duration of culturing was found on the level of microbiological synthesis of exopolysaccharides. These results showed that the maximum viscosity attained on media with starch at 15 g / l, temperature 36°C, pH 9, forced aeration and shaking. The viscosity of the resulting culture liquid was higher than 8000 cSt. Thus, for the first time shown the ability to synthesis of exopolysaccharide by alkaliphilic bacteria *Paenibacillus mannanolyticus* when cultured in alkaline conditions.

Keywords: exopolysaccharide (EPS), *Paenibacillus*, viscosity.

В настоящее время исследование микробных полисахаридов приобрело особое значение в связи с открывшейся возможностью широкого применения их в медицине и ряде областей народного хозяйства [1].

В России производство микробных ЭПС не отвечает постоянно возрастающей потребности различных отраслей промышленности, медицины и сельского хозяйства в этих биополимерах. Крайне актуальным является создание крупнотоннажного производства таких биополимеров. Для промышленного получения коммерчески ценных микробных ЭПС следует создать банк микроорганизмов-продуцентов, усовершенствовать технологию их получения и методы выделения полимера, разработать методы управления условиями ферментации с целью получения продукта стабильного качества [2]. Вязкость растворов

ЭПС является важнейшей реологической характеристикой. Показатель вязкости – лабильный признак, зависящий от природы продуцента, химического состава, структуры молекулы и внешних факторов (концентрации вещества, pH, температуры, давления и др.). Полисахариды, водные растворы которых отличаются высокой вязкостью и особой стабильностью при резких изменениях температуры и в условиях агрессивной среды, используются в нефтяной и газодобывающей промышленности. В то же время в литературе не описаны ЭПС, синтезируемые микроорганизмами при щелочных условиях среды.

**Целью данной работы** являлся поиск оптимальных условий культивирования алкалофильных бактерий *Paenibacillus mannanolyticus* – продуцента вязкого ЭПС.

### **Материалы и методы исследования**

Объектом исследований являлся штамм бактерии *Paenibacillus mannanolyticus* IB-OR17B1 из Коллекции микроорганизмов Уфимского института биологии РАН.

Влияния источника углерода на вязкость культуральной жидкости (КЖ) оценивали в среде Хорикоши [5], имеющей состав (г/л): пептон – 5; дрожжевой экстракт – 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 10. В качестве субстратов (10 г/л) использовали: глюкозу, сахарозу, мальтозу, крахмал, мелассу. Культивирование проводили в колбах емкостью 250 мл, содержащих 100 мл среды на установке для выращивания микроорганизмов термостатируемой (УВМТ) в периодических условиях при температуре 36 °С, перемешивании (аэрации) 180 мин<sup>-1</sup> в течение 168 часов.

Для поддержания культуры, подготовки посевного материала и определения титра использовали питательную среду того же состава с крахмалом и добавлением 20 г/л агар-агара.

Оптимизацию условий культивирования проводили с применением математического планирования эксперимента в два этапа: 1 - построение адекватной математической модели процесса; 2 - нахождение оптимального состава среды методом крутого восхождения [4].

Для получения простейшей адекватной модели потребовалось связать выходные параметры системы с входными — условиями культивирования ( $X_i$ ). В качестве выходных параметров были взяты: кинематическая вязкость ( $Y_1$ ) и титр клеток ( $Y_2$ ).

В эксперименте одновременно проверяли серию вариантов условий культивирования, в которых все компоненты (факторы) варьировались на двух количественных уровнях (верхнем «+» и нижнем «-»). Число вариантов полного факторного эксперимента (ПФЭ) соответствовало числу всех возможных сочетаний варьируемых компонентов среды. Таким образом, для  $n$  факторов, каждый из которых был взят на двух уровнях концентрации, число вариантов состава сред равняется  $2^n$ . Такой факторный эксперимент обозначается как ПФЭ- $2^n$ .

Для оценки влияния факторов варьирования, таких как содержание крахмала ( $X_1$ ), перемешивание ( $X_2$ ) и продолжительность ферментации ( $X_3$ ), на образование вязкого ЭПС и титра микроорганизмов проводили культивирование в течение 72-120 ч при  $n=160, 180$  и  $200 \text{ мин}^{-1}$  на УВМТ в жидкой питательной среде, вышеприведенного состава с содержанием крахмала 5, 10 и 15 г/л.

После соответствующей математической обработки экспериментальных данных, зависимость вязкости (титра клеток) штамма от варьируемых компонентов представляется в виде многофакторного уравнения регрессии, являющегося искомой математической моделью процесса [4].

$$Y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+\dots+b_nx_n,$$

где  $x_n$  – содержание соответствующего компонента в среде в условных единицах («+1» - верхний уровень, «-1» - нижний уровень);

$Y$  – вязкость (сСт), титр клеток (КОЕ/мл среды);

$b_n$  – коэффициенты регрессии, отражающие степень влияния концентрации в среде  $n$ -го фактора на вязкость (титр клеток)  $Y$ .

Для расчета  $b_n$  использовалась формула Йейтса:

$$b_n = \frac{(\sum X_n Y_n)}{N}$$

где  $X_n = 1$  – значение фактора в соответствующем варианте факторного эксперимента;

$Y_n$  – величина вязкости (титра клеток) в соответствующем варианте;

$N$  – общее число вариантов в ПФЭ.

Следующий этап — определение оптимальных условий культивирования по схеме «крутого восхождения»: в серии вариантов одновременно увеличивают или уменьшают дозы тех факторов, коэффициенты регрессии при которых имели, соответственно, знаки «+» или «-».

Измерение кинематической вязкости КЖ проводили с помощью стеклянного капиллярного вискозиметра Оствальда при температуре  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Выделение ЭПС из КЖ осуществляли добавлением двух объемов ацетона. Осадок промывали чистым растворителем и сушили до постоянной массы [3].

### **Результаты и их обсуждение**

Одной из особенностей производства известных бактериальных экзополисахаридов является высокая требовательность микроорганизмов к питательной среде. В связи с этим проводился подбор оптимального источника углерода, обеспечивающего максимальное продуцирование ЭПС штаммом *Paenibacillus mannanolyticus* IB-OR17B1.

Микробиологическое получение ЭПС осуществляют культивированием микроорганизмов на жидких минеральных средах с источником углерода, в качестве которого обычно используют глюкозу, сахарозу, мальтозу, крахмал, а также отход производства сахарной промышленности – мелассу.

Из представленных в таблице 1 результатов видно, что использование крахмала и глюкозы в качестве источника углерода позволяло получать КЖ *Paenibacillus mannanolyticus* IB-OR17B1 с наиболее высокой вязкостью, а максимальный титр микроорганизмов мы наблюдали при культивировании на крахмале.

Кроме того, из полученных данных следует, что большое влияние на биосинтез полисахаридов оказывает рН среды. Наибольшая вязкость раствора наблюдалась при значении рН среды после стерилизации 9, а увеличение данного параметра приводило к понижению вязкости КЖ.

Поэтому все последующие исследования проводили с использованием в качестве источника углерода крахмала, а уровень рН среды после стерилизации закрепили на значении 9.

Результаты, представленные в таблице 2, показывают, что для синтеза ЭПС с максимальной вязкостью рекомендуется культивирование *Paenibacillus mannanolyticus* IB-OR17B1 в течение 120 часов, в то время как наибольший титр клеток наблюдается через 144 часа роста культуры. Такая короткая продолжительность является положительным фактором с экономической точки зрения.

**Таблица 1**

Зависимость вязкости и титра микроорганизмов КЖ *Paenibacillus mannanolyticus* IB-OR17B1 от природы источника углерода и рН среды

Источник углерода	рН среды	Вязкость, сСт	Титр, млн КОЕ/мл КЖ
Сахароза	9	78±4	14,0±0,7
	9,5	67±3	45,8±2,3
	10	60±3	3,3±0,2
	10,5	33±2	2,0±0,1
Мальтоза	9	56±3	10,1±0,5
	9,5	45±2	28,6±1,4
	10	42±2	2,5±0,1
	10,5	28±1	1,5±0,1
Глюкоза	9	3564±178	12,8±0,6
	9,5	398±20	41,0±2,0

	10	566±28	14,6±0,7
	10,5	136±7	2,0±0,1
Крахмал	9	3733±187	38,2±1,9
	9,5	967±48	113,0±5,6
	10	678±34	10,1±0,5
	10,5	162±8	5,0±0,2
Меласса	9	196±10	14,2±0,7
	9,5	179±9	49,3±2,5
	10	153±8	4,5±0,2
	10,5	145±7	4,0±0,2

**Таблица 2**

Динамика изменения вязкости КЖ и титра клеток от продолжительности ферментации

Время культивирования, ч	Вязкость культуральной жидкости, сСт	Титр, млн КОЕ/мл КЖ
72	4387±219	20,1±1,1
96	4786±239	49,2±2,5
120	3938±196	75,1±3,7
144	3869±139	51,2±2,6

Дальнейшую оптимизацию условий культивирования проводили с применением метода математического планирования эксперимента. Были проведены эксперименты согласно существующей матрице планирования с различным варьированием исследуемых факторов (табл. 3).

**Таблица 3**

Зависимость вязкости и титра микроорганизмов КЖ *Paenibacillus mannanolyticus* IB-OR17B1 от параметров культивирования (ПФЭ-2<sup>3</sup>)

Вариант условий культивирования	Содержание крахмала, г/л	Перемешивание (аэрация), мин <sup>-1</sup>	Продолжительность культивирования, ч	Вязкость, сСт	Титр, млн КОЕ/мл КЖ
1	5	160	72	211±10	35,0±1,7
2	15	160	72	5482±274	230,1±11,5
3	5	200	72	950±47	69,5±3,5
4	15	200	72	6449±322	275,2±13,7

5	5	160	120	457±23	18,5±0,9
6	15	160	120	647±32	155,4±7,8
7	5	200	120	660±33	59,0±3,0
8	15	200	120	2665±133	237,5±11,9
Средний уровень	10	180	96	4643±232	50,0±2,5

В результате экспериментов были получены данные, позволяющие вычислить коэффициенты уравнений регрессии — математических моделей зависимости функций  $Y_1$  и  $Y_2$  (кинематическая вязкость и титр клеток) от условий культивирования  $X_i$ .

Соответственно, уравнения регрессии с учетом значимости коэффициентов в натуральных переменных выглядят следующим образом:

$$Y_1 = 324X_1 + 25X_2 - 45X_3 - 1139$$

$$Y_2 = 89X_1 - 44$$

Анализ регрессионных уравнений позволяет сделать вывод, что значительное влияние на вязкость КЖ и титр клеток *Paenibacillus mannanolyticus* IB-OR17B1 оказывает концентрация источника углерода – крахмала в среде. Также установлено, что увеличенная аэрация положительным образом сказывается на увеличении вязкости КЖ исследуемого штамма. Увеличение факторов  $X_1$  и  $X_2$  с незначительным уменьшением времени культивирования должно дать значимый положительный эффект для увеличения вязкости КЖ.

Проведенный в дальнейшем эксперимент, в котором в серии вариантов ферментационной среды одновременно, с определенным шагом, снижались концентрации «отрицательных» и увеличивались концентрации «положительных» компонентов, позволил смоделировать оптимальные условия культивирования штамма алкалофильных бактерий *Paenibacillus mannanolyticus* IB-OR17B1 – продуцента вязкого ЭПС.

### **Заключение**

Таким образом, из полученных при помощи метода математического планирования эксперимента данных следует, что для синтеза ЭПС с максимальной вязкостью при культивировании *Paenibacillus mannanolyticus* IB-OR17B на среде с крахмалом необходимы следующие условия: содержание крахмала – от 15 г/л, перемешивание (аэрация) выше 200 мин<sup>-1</sup>, температура - 36 °С при продолжительности культивирования до 72 часов. Вязкость получаемой культуральной жидкости в оптимальных условиях выше 8000 сСт при выходе экзополисахарида более 12 г/л, титр микроорганизмов в этих условиях доходит до  $(4-5) \cdot 10^8$  КОЕ/мл КЖ.

## Список литературы

1. Аркадьева З.А. Промышленная микробиология : учеб. пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология» – М. : Высш. шк., 1989. - 668 с.
2. Бухарова Е.Н. Экзополисахарид *Paenibacillus polymyxa* 88А: получение, характеристика и перспективы использования в хлебопекарной промышленности : дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2004. – 189 с.
3. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. – Киев : Наук. думка, 1982. - 192 с.
4. Максимов В.Н., Федоров В.Д. Применение методов математического планирования эксперимента при отыскании оптимальных условий культивирования микроорганизмов. - М. : Изд-во МГУ, 1969. - 126 с.
5. Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1999. - Vol. 4, № 63. – P. 735-750.

### Рецензенты:

Фархутдинов Р.Г., д.б.н., профессор кафедры биохимии и биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный университет», г. Уфа;

Баймиев А.Х., д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной биологии и нанобиотехнологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук», г. Уфа.