

УДК 582.288.677

М. Х. ШИГАЕВА, В. Л. ЦЗЮ, Л. В. ИГНАТОВА

## ВКЛАД КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ В ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОГЛИКАНОВ КАЗАХСТАНСКИМИ ИЗОЛЯТАМИ *AUREOBASIDIUM PULLULANS*

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

С целью создания высокоактивных, конкурентоспособных казахстанских культур диморфных грибов – продуцентов биологически активных веществ, дана оценка параметров роста и биохимической активности штаммов *Aureobasidium pullulans*, синтезирующих внеклеточные полисахариды, в зависимости от основных источников питания, их соотношения, присутствия в среде факторов роста. Определена эффективность роста по выходу биомассы и целевого продукта наиболее активного штамма.

Выделение из природных источников новых культур диморфных организмов, изучение их свойств, определение таксономического положения представляет большой научный интерес. Не менее актуален и прикладной аспект в исследовании этих организмов - выявление у них способности к синтезу биологически активных веществ, используемых в решении современных проблем биотехнологии.

На кафедре микробиологии биологического факультета КазНУ им. аль-Фараби в течение ряда лет ведется работа по изысканию в природе культур диморфных грибов рода *Aureobasidium* – продуцентов важных вторичных метаболитов. Впервые в Республике Казахстан создана коллекция этих диморфных грибов, служащих моделями для изучения фундаментальных проблем морфогенеза, а также являющихся перспективным материалом для биотехнологии.

Ярким представителем этих организмов является вид *Aureobasidium pullulans*, широко известный в мировой науке и практике как продуцент внеклеточных полисахаридов и меланина, обладающих уникальными свойствами, позволяющими использовать их в целом ряде технологий прикладного характера [1, 2].

Полисахариды защищают клетку от высушивания и способствуют адгезии ее на поверхности субстрата. В зависимости от условий культивирования, различные штаммы гриба *A. pullulans*, продуцируют пуллулан, аубазидан и кислый гетерополисахарид, которые нашли широкое применение в легкой, пищевой, фармацевтической промышленности и медицине. Они легко синтезируются на углеводистых средах, об-

ладают уникальными физико-химическими свойствами, легко подвергаются химической модификации и биодеградации [3].

В настоящее время в нашей республике нет технологий, основанных на производстве и использовании таких важных продуктов микробосинтеза, каковыми являются полисахариды, тогда как в мировой науке и практике уже в течение 60 лет они широко изучаются и применяются в целом ряде отраслей промышленности и в медицине. Речь идет, прежде всего, об экзогликанах, синтезируемых *Aureobasidium pullulans*. Способность к синтезу подобных вторичных метаболитов была доказана предыдущими исследованиями авторов настоящей статьи. Получены штаммы, способные синтезировать экзогликаны, и по продуктивности не уступающие известным мировым продуцентам [4]. С этих позиций актуальным является дальнейшее изучение и оптимизация их биосинтеза и создание на этой основе высокопродуктивных казахстанских штаммов микроскопических грибов – продуцентов биологически активных веществ для медицины и фармацевтической промышленности, а также продуцентов биоразлагаемых полимеров для пищевой промышленности.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами для работы служили 5 новых культур дрожжеподобных грибов - ассоциатов насекомых-опылителей, идентифицированных как штаммы *Aureobasidium pullulans*, типовой штамм *A. pullulans var. melanigenum* F-179 (ВКМ, Россия), штамм П5д из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета КазНУ им. аль-Фараби.

Таблица 1. Образование нативного полисахарида (г/л) штаммами *A. pullulans*

Штаммы	Среды для ферментации	
	Чапека-Докса	Оптимизированная
П5д	22,55±1,13	16,58±0,83
П6	9,71±0,48	10,61±0,53
П7	11,68±0,58	21,00±1,05
Т1	7,58±0,38	15,04±0,75
Т2	13,05±0,65	14,75±0,74
Т3	8,04±0,40	11,95±0,60

Способность культур к биосинтезу внеклеточных полисахаридов изучали в полупогруженных условиях. Ферментацию проводили в течение 5-6 суток на естественных, искусственных и модифицированных питательных средах, используемых для культивирования грибов [5, 6]. Условия ферментации: температура 20±2°C; перемешивание на качалке (180 об/мин); исходное pH среды 6,5; количество инокулята – 1,0% от объема среды с густотой 10<sup>10</sup> кл/мл. Объем ферментационной среды 25-100 мл. По окончании ферментации культуральную жидкость в соответствии с методикой [1], нейтрализовали раствором гидроксида натрия для предотвращения кислотного гидролиза полисахарида. Полисахарид осаждали двойным объемом 96° этилового спирта, отфильтровывали, высушивали спиртом, ацетоном при комнатной температуре, а затем в сушильном шкафу при 55°C. Гравиметрически определяли сухой вес нативного полисахарида (полисахарид + биомасса), либо чистого полисахарида и биомассы. Эффективность роста гриба в культуре на двух средах сравнивали по двум показателям – выходу биомассы (X/S) и выходу продукта (P/S) на единицу утилизированного субстрата.

#### ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Образование нативного полисахарида (полисахарид+биомасса) исследуемыми штаммами изучено на двух средах, различающихся компонентным составом. Для сравнения взят коллекционный штамм П5д, изученный ранее и являющийся активным продуцентом экзогликана. [5]. Как видно из данных, приведенных в таблице 1, на среде, согласно данным литературы [6], оптимизированной для накопления экзогликана, про-

дуктивность новых штаммов была выше, чем на среде Чапека-Докса. Наибольшее количество нативного полисахарида накапливал штамм П7 (21,0 г/л). Музейный штамм П5д более продуктивен на среде Чапека-Докса, что подтверждает уже известные данные [5].

Взятые для ферментации питательные среды различаются, прежде всего, содержанием сахарозы как источника углерода, а также химической природой источника азота и его концентрацией. Исходя из этого, низкие показатели продуктивности новых культур на среде Чапека-Докса можно объяснить как лимитацией углеродного субстрата, так и различием в источнике азота (нитратная форма в среде Чапека-Докса, аммонийная – в оптимизированной среде).

По мнению исследователей [7] основным управляющим фактором в регуляции синтеза экзополисахарида является соотношение углерода к азоту. В питательных средах соотношение С:N значительно сдвинуто в сторону источника углерода, что объясняется использованием его одновременно для синтеза клеточной массы и экзогликана. Такие условия приводят к увеличению активности метаболических процессов и, как следствие, повышению выхода целевого продукта.

Наиболее активные штаммы П5д и П7, были использованы для ферментации модифицированной среды Чапека-Докса, в которой соотношение основных источников питания сдвинуто вдвое от исходного в пользу источника углерода (табл. 2). В ответ на это изменение штаммы увеличили глубину утилизации субстрата, что не замедлило отразиться на выходе целевого продукта и величине конверсии углеродного субстрата в продукт.

Количество образованного полисахарида во многом может зависеть, от степени и легкости

Таблица 2. Продуктивность штаммов гриба на исходной и модифицированной среде Чапека-Докса

Вариант	Показатели			
	Биомасса, г/л	ЭПС, г/л	Утилиз.С, г/л	Выход Р/С, %
П5, глю., 3%	1,88	11,32	29,2	38,8
П5, глю., 6%	1,92	15,96	39,2	40,7
П7, глю., 3%	1,40	9,09	27,8	32,7
П7, глю., 6%	1,72	11,56	30,5	37,9

Таблица 3. Продуктивность штаммов (НП, г/л) в зависимости от состава среды

Штаммы	Среды для ферментации		
	Чапека-Докса	Оптимизированная	Уеда
П6	7,68±0,34	11,36±0,55	12,56±0,63
П7	11,80±0,47	21,14±0,84	24,36±1,09
Т1	13,33±0,67	14,38±0,65	15,78±0,79
Т2	5,78±0,23	13,30±0,68	16,44±0,74
Т3	7,40±0,29	12,18±0,56	22,47±1,01
П5д	22,88±1,11	13,20±0,67	16,12±0,80
F-179	7,30±0,35	10,38±0,41	11,94±0,59

усвоения источников азота, от их специфического свойства изменять физико-химические условия среды в процессе роста организма.

Известно, что окисленная и восстановленная формы азота по разному влияют на интенсивность продукции экзогликана представителями разных генотипических групп *A. pullulans*. Сульфат аммония является оптимальным для штаммов генотипической группы I. Штаммы генотипической группы II предпочитают среды с нитратной формой азота. Более распространенной является 1 генотипическая группа [8].

Продуктивность новых культур изучали в сравнении с типовым штаммом *A. pullulans* var. *melanigenum* F179, принадлежащим к I генотипической линии, и музейным штаммом П5д, принадлежность которого ко II генотипической линии установлена ранее [5]. Культуры выращивали на трех синтетических средах: Чапека-Докса, оптимизированной и Уеда, последняя отличалась источником углерода (глюкоза) и наличием ростовых факторов (тиамин, дрожжевой экстракт) [9]. Полученные результаты (табл. 3) выявили оптимальность среды Уеда для активного наращивания биомассы и накопления внеклеточного полисахарида опытными культурами, что, очевидно, обусловлено наличием глюкозы, легко утилизируемого субстрата, и факторами роста. Несколько ниже показатели продуктивности новых

штаммов на оптимизированной среде. Наименее благоприятной оказалась среда с нитратной формой азота (Чапека-Докса) и низким соотношением основных элементов питания.

Таким образом, 5 новых штаммов *A. pullulans* способны синтезировать внеклеточный полисахарид на сахаросодержащих средах, предпочтая восстановленную форму азота в виде сульфата аммония, а также факторы роста. Наиболее продуктивным из изученных культур оказался штамм П7 - выход нативного полисахарида на оптимизированной среде у него составил 21,14 г/л, на среде Уеда – 24,36 г/л ферментационной среды.

Суммарные показатели биосинтетической активности гриба не дают представления о ходе самого процесса, поэтому в дальнейшем изучены рост и продуктивность перспективного штамма в динамике через каждые 24 часа на средах с глюкозой и сахарозой.

Анализ данных обнаружил ряд общих черт, характерных для культуры на каждом из вариантов среды. В ходе ферментации происходит закономерное снижение уровня экзогенного субстрата, нарастание численности клеток, накопление внеклеточного полисахарида и изменение pH среды. Судя по уровню остаточного сахара в среде, наиболее активно утилизация субстрата клетками осуществляется в течение первых 3-4

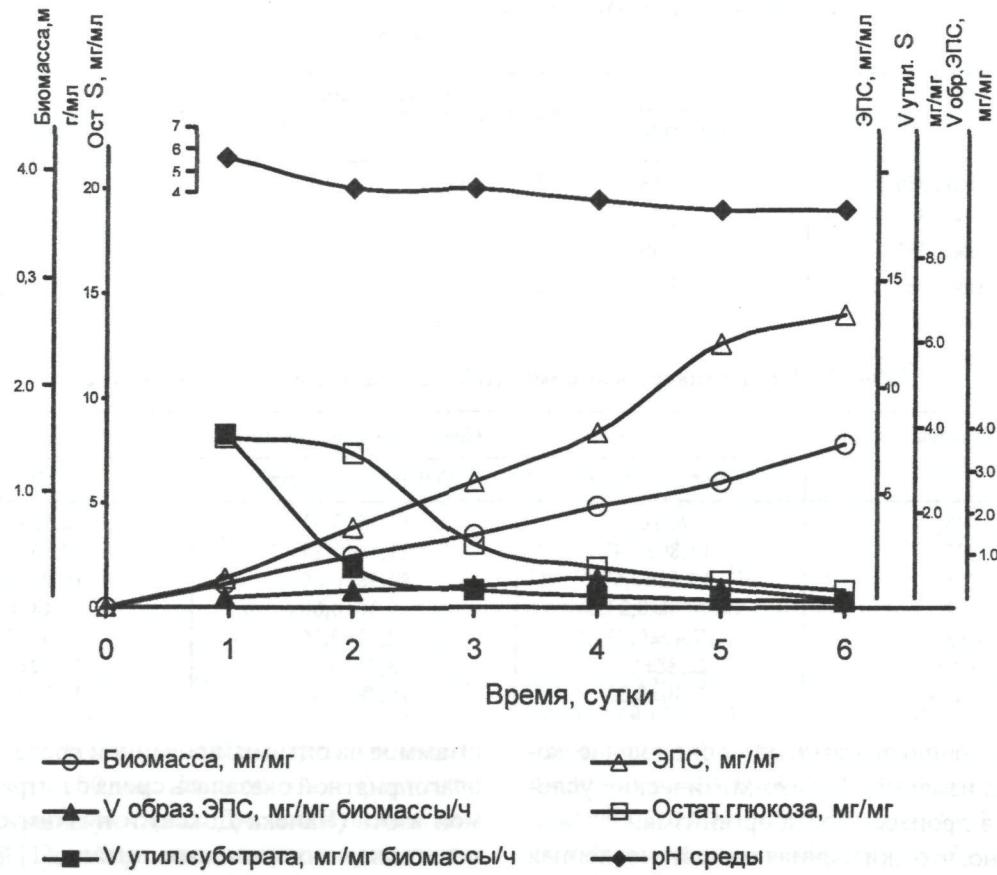


Рис. 1. Показатели роста *Aureobasidium pullulans* P7 на среде с сахарозой

суток ферментации, характеризующихся почти линейным приростом биомассы клеток, т.е. в фазу быстрого размножения. Затем процесс замедляется и к 6 суткам наблюдения количество остаточной глюкозы в обоих вариантах находится в пределах 0,8 мг/мл, что составляет 2,7% от заданного в среду источника углерода. На рисунке 1 приведены кривые, отражающие динамику основных показателей на среде с сахарозой. Кривая роста имеет экспоненциальный характер в течение всего срока наблюдения. Подобную закономерность для диморфного гриба *A. pullulans*, не свойственную мономорфным организмам, исследователи объясняют [2] конверсией дрожжевой формы в мицелиальную по мере роста культуры. Выработка вторичного метаболита начинается активно с первых суток и продолжается в течение всего срока ферментации. Накопление его происходит почти линейно на обеих средах, и подобная зависимость сохраняется до конца ферментации.

В каждом из вариантов опыта в динамике рассчитывали интенсивность синтеза полисахарида, выражая ее в мг на мг сухой биомассы клеток в час. Этот показатель отражает общие закономерности роста культуры и имеет максимальные величины независимо от природы субстрата на 3 – 4 сутки ферментации. К концу ферментации интенсивность биосинтеза снижается до минимального уровня. В количественном отношении продукция экзогликана на среде с сахарозой выше на 19 %, чем на среде с глюкозой. Следовательно, фруктоза, как составная часть сахарозы, также используется на синтез экзогликана. Эта способность связана с активностью экстрацеллюлярной инвертазы, которая была обнаружена у *A. pullulans* и ферментативная активность которой по данным литературы находится в прямой пропорциональной зависимости от концентрации сахарозы [10].

Эффективность роста гриба в культуре на двух средах сравнивали по двум показателям –

выходу биомассы и выходу продукта на единицу утилизированного субстрата. Учет расходования субстрата на рост, образование целевых и других продуктов метаболизма, а также на поддержание жизнедеятельности важен для оптимизации биотехнологического производства, оценки его эффективности. Показано, что большая часть углеводов идет на синтез экзогликана, меньшая – на создание клеточной массы. Эффективность конверсии субстрата в целевой продукт штаммом гриба П7 достаточно высока и составляет для глюкозы 38,8%, для сахарозы – 47,9%. По данным литературы [11], максимальная величина конверсии для выпускаемых в промышленности полисахаридов, накапливающихся в условиях погруженной культуры *A. pullulans*, достигала 50%.

Проведенные исследования выявили способность новых казахстанских изолятов *A. pullulans* синтезировать внеклеточные полисахариды на углеводсодержащих средах. Для накопления целевого продукта благоприятным является восстановленная форма азота, наличие ростовых факторов, а также сдвиг соотношения основных источников питания в пользу углерода. Наиболее активный продуцент экзогликана – штамм П7 – в зависимости от условий ферментации дающий выход чистого экзополисахарида 12,9 - 16,4 г/л, с эффективностью конверсии субстрата в целевой продукт 47,9%.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Нешатаева Е.В. Дрожжеподобные грибы рода *Aureobasidium* как продуценты полисахаридов и других биологически активных веществ // Труды ЛХФИ. 1967. В. 22. С. 25-28.

2. Елинов Н.П., Юрлова Н.А. Меланиновый пигмент *Aureobasidium (Pullularia) pullulans Arnaud (De BARY)*, 1910. // Науч. докл. высш. шк., биолог. науки. 1976. № 7. С. 108 – 112.

3. Кондратьева Т.Ф. Образование *Aureobasidium (Pullularia) pullulans* полисахарида пуллулана // Успехи микробиологии. 1981. Вып. 16. С.175-193.

4. Цзю В.Л. Продукция экзогликанов штаммами грибов рода *Aureobasidium* // Вестник КазГУ. Сер. биол. 1999. №7. С. 85-89.

5. Игнатова Л.В. Экспериментальный контроль морфогенеза *Aureobasidium pullulans* П5 – продуцента внеклеточного полисахарида. Автореф. канд. дисс.- Алматы, 2001. - 30 с.

6. Юрлова Н.П., Копылова Г.В. Оптимизация питательной среды для биосинтеза экзополисахарида *Aureobasidium (Pullularia) pullulans (de Bary) Arnaud K-371* // Микология и фитопатология. 1993. Т. 27. С. 56-62.

7. Баснакян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. - М.: Наука, 1992. - 430 с.

8. Kudryashova O.A., Yurlova N.A. Effect of the nitrogen source on the biosynthesis, composition, and structure of the exopolysaccharides of *Aureobasidium pullulans (de Bary) Arnaud* // Microbiology. 2000. V. 9. P. 429-435.

9. Ueda S. Polysaccharide production by genus *Pullularia* // Kogyo Kagaku. 1964. Vol. 67. №5. P. 757-760.

10. Юрлова Н.А., Кудряшова О.А., Софьян А.В. Влияние источников азота на биосинтез экзополисахаридов и активность ферментов углеродного обмена у *Aureobasidium pullulans* // Микробиология. 1997. Т. 66. № 4. С. 468-474.

11. Augustin J., Kuniak L., Hudceov D. Screening of yeasts and yeast-like organisms *Aureobasidium pullulans* for pullulan production // Biologia. 1997. V. 52. P. 399-404.

#### Резюме

*Aureobasidium pullulans* штаммының экзогликан түзіндегі өсу параметрлері мен биохимиялық белсенделілігі жөнінде баға берілді, ол негізгі коректену түріне, олардың арақатынасы, коректік ортадағы өсу факторларына байланысты. Ең белсенді штаммың биомасса түзілуіне және пайда болған өнімі бойынша өсу белсенделілігінің нәтижелілігі анықталды.

#### Résumé

Dанна оценка параметров роста и биохимической активности штаммов *Aureobasidium pullulans*, синтезирующих экзогликаны, в зависимости от основных источников питания, их соотношения, присутствия в среде факторов роста. Определена эффективность роста по выходу биомассы и целевого продукта наиболее активного штамма.