

Синтез и применение микробных полисахаридов

Канарский А.В.,
ФГБОУ ВПО Казанский национальный
исследовательский технологический университет
alb46@mail.ru

О микробных полисахаридах области применения

КЛАССИФИКАЦИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ

Полисахариды в микроорганизмах:

- Внутриклеточные - эндополисахариды
- Внеклеточные- экзополисахариды
- Полисахариды клеточных стенок

По химическому составу

- Гомополисахариды
- и гетерополисахариды

По химической природе

- нейтральные,
- аминосахара,
- кислые

Структурная организация полисахаридов

- Первичная структура
- Вторичная структура
- Третичная структура
- Четвертичная структура

Полисахариды грибов

Карбоксиметилат – 1,3- β -D-глюкан *Saccharomyces cerevisiae*

Пуллулан α -1,6-гликозидные связи *Aureobasidium pullulans*

Лентинан β -(1-3), и β -(1-6)-гликан. *Lentinus edodes*

Шизофиллан *Schizophyllum commune*

Полисахариды дрожжей

- Клеточной стенки дрожжей
 - хитин – глюкан
 - маннаны
- Внеклеточные
 - маннаны,
 - крахмалоподобный полисахарид

Полисахариды бактерий

- **Велан** – рода *Alcaligenes*
- **Ацетан** - *Acetobacter xylinum*
- **Альгинат** - *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*
- **Геллан** - *Sphingomonas paucimobilis* (*Pseudomonas paucimobilis*)
- **Ксантан** - *Xanthomonas campestris*
- **Курдлан** - рода *Rhizobium* и *Agrobacterium*
- **Этаполан** - *Acinetobacter* sp. B-7005
- **Декстран** - *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptobacterium dextranicum* B-1254.
- **Целлюлоза** - *Acetobacter xylinum* и др.

Известные продуценты целлюлозы:

Glucanacetobacter xylinus,
Acetobacter aceti,
Acetobacter xylinodites,
Medusomyces gisevii и др.

Штамм *Acetobacter* sp. Продуктивность
– 8,5-16 г/л бактериальной целлюлозы

Преимущества:

- отсутствие гемицеллюлозы и лигнина;
- легкость культивирования;
- желеобразная структура, легко гомогенизируемая.

Acetobacter xylinum

- Грамотрицательная бактерия, которая была
- выделена впервые в 1886 году для производства уксуса.
- Hestrin в конце 1950 года определил оптимальные условия роста для производства бактериальной микроцеллюлозы (Schramm and Hestrin 1954).
- Acetobacter xylinum штамм способен производить целлюлозу при температуре 25 °С- 30 ° С и pH 4.5-7.5 на простых сахарах.

Свойства бактериальной целлюлозы и целлюлозы из растений (Гладышева Е.К)

Свойства	Бактериальная целлюлоза	Целлюлоза вегетативной части растений
Ширина волокон, нм	70-80	14000-40000
Кристалличность, %	65-79	56-65
Степень полимеризации	2000 - 2600	13000-14000
Модуль Юнга, МПа	15-30	5,5-12,6
Влагоудерживающая способность, %	98,5	60

Применение бактериальной целлюлозы

- В производстве бумажных изделий высокой полиграфии, и даже предлагают использовать в плитах ДВП
- В текстильной промышленности для получения новых тканей
- Для получения фильтров с целью очистки воды и воздуха
- Для получения диафрагм при производстве акустических динамиков
- Для биохимии (получение диализных мембран)
- В пищевой промышленности
- Для получения уникальных нанокомпозитных материалов
- В медицине:
 - - для получения искусственной кожи
 - - в качестве перевязочных материалов
 - - в составе имплантационных материалов для реконструктивно-восстановительных операций
 - - носитель для лекарственных препаратов,
 - - в тканевой инженерии для получения искусственных кровеносных сосудов
 - - как основа энтеросорбентов, диетических продуктов

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА БИОСИНТЕЗ ПОЛИСАХАРИДОВ

- количество азота в питательной среде,
- источника углерода,
- минералы и витамины,
- температуры, pH и степени аэрации
- биологический фактор

ПРОБЛЕМЫ ПРОМЫШЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

- дорогие источники углерода,
- необходимость стерильного производства,
- нестабильность штаммов культур,
- вязкая среда – затрудняется аэрация, дорогостоящие приемы разделения продуцента и полисахаридов,
- затруднено масштабирование процессов.

Решение проблем

- Иммобилизация продуцентов при культивировании внеклеточных полисахаридов для пищевой промышленности, пластиков и т.п.
- Получение гетерогенных по химическому составу кормовых продуктов, содержащих внеклеточные полисахариды, полисахариды клеточных стенок, белки и липиды микроорганизмов.

Цель наших исследований

- Изучение возможности использования вторичных ресурсов переработки растительного сырья для синтеза микробных полисахаридов.

Внимание! Вторичные ресурсы как дешевые источники углерода для культивирования микроорганизмов

Что же интересного получили? О чем расскажем?

- хитин глюкан из мицелиальных грибов, культивируемых на березовых опилках и целлолигнине из торфа,
- хитин глюкан из дрожжей, культивируемых на **сульфитных** щелоках,
- бета глюканы из дрожжей, культивируемых на сульфитных щелоках,
- внеклеточные полисахариды, синтезируемые дрожжами, культивируемые на бисульфитных щелоках
- внеклеточные полисахариды, синтезируемые бактериями, культивируемые бактериями, культивируемые на бисульфитных щелоках,

Обратим Ваше внимание на

- некоторые особенности культивирования при синтезе полисахаридов микроорганизмами и их выделения
- адсорбционные свойства полисахаридов, синтезируемых микроорганизмами, по отношению к микотоксинам.

- хитин глюкан из грибов и дрожжей, культивируемых на вторичных ресурсах переработки растительного сырья
- бета-глюкан

Культивирование микроорганизмов и параметры выделения хитин глюкана

- *Saccharomyces cerevisiae* – глубинное культивирование на питательной среде из мелассы,
- *Candida scottii* – глубинное культивирование на питательной среде из сульфитных щелоков,
- Гриб рода *Pleurotus* – твердофазная ферментация на питательной среде из березовых опилок
- Концентрация гидроокиси натрия 6 %, гидромодуль 1:10, температура обработки 93 ± 2 °С, продолжительность 6 час,

Влияние условий обработки биомассы микроорганизмов гидроокисью натрия на выход хитин-глюкана и бета -глюкана

Характеристика хитин глюкана	Источник хитин глюкана		
	дрожжи <i>Candida scottii</i>	дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	гриб рода <i>Pleurotus</i>
Выход хитин- глюкана, %	11,1	14,5	16,0
Зольность, %	1,6	2,7	2,9
Содержание Д-глюкозамина %	21,5	7,1	15,3
Коэффициент обратно пропорциональный глубине очистки хитин-глюканового комплекса от глюканов	622	1220	950
Выход бета-глюкана от массы микроорганизмов, %	4,1	3,2	3,1

Адсорбция хитин - глюкоаном Т 2 микотоксина

Адсорбция	Источник хитин-глюкана		
	дрожжи <i>Candida scottii</i>	дрожжи <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	гриб рода <i>Pleurotus</i>
Общая адсорбция, %	70,5	68,4	66,0
Адсорбция за счет химического взаимодействия, %	69,6	67,7	62,9

Общая адсорбция Т-2 микотоксина бактериальной целлюлозы - 42 %
За счет химической связи - 38 %

Биоадсорбент на основе клеточной стенки
мицелиального гриба *T. reesei* M18
и лигнина торфа

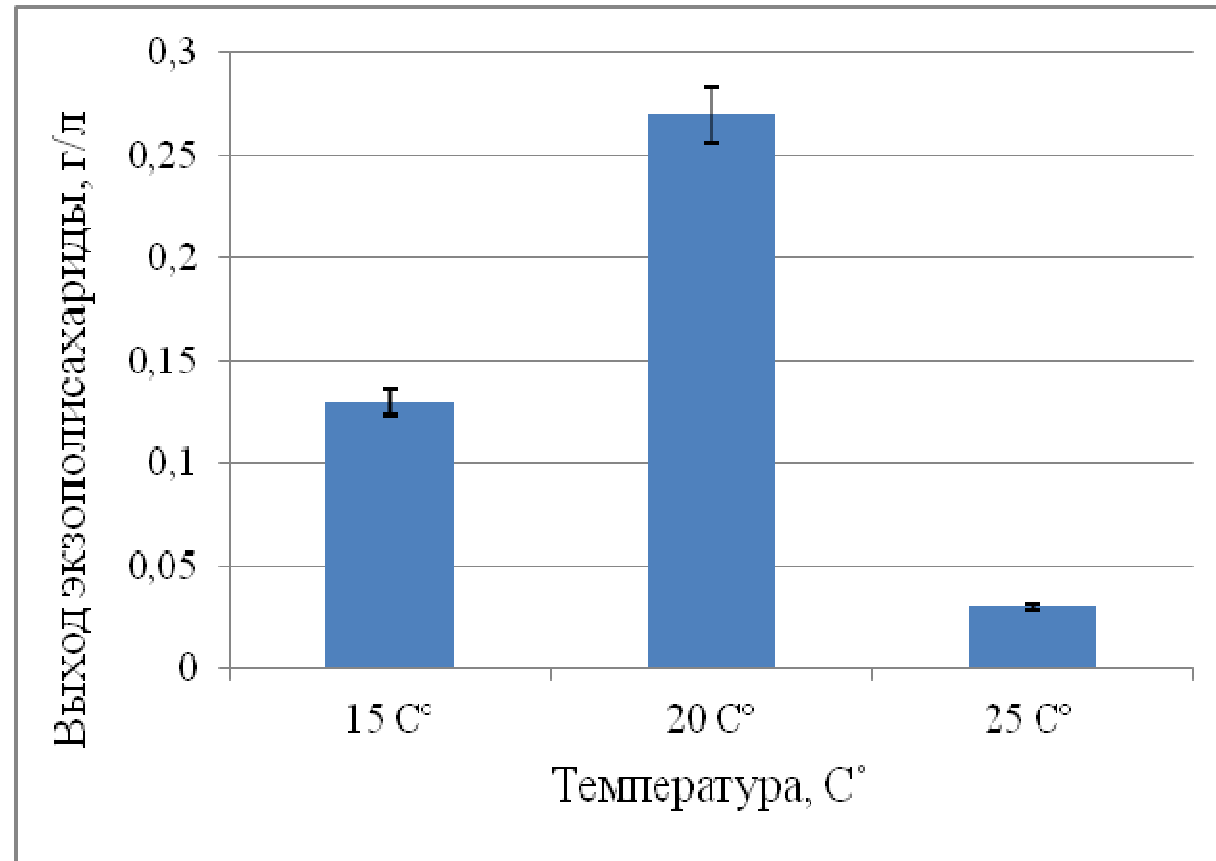
- содержание клеточной стенки мицелиальных грибов - 60 %,
- сырой протеин - 10 %,
- белок по Барнштейну - 8,5 %,
- содержание хитин глюкана -15 %,
- содержание лигнина 40 %,
- адсорбция Т-2 микотоксина не менее 72 %,

Синтез внеклеточных полисахаридов
дрожжами рода *Lipomyces tetrasporus* sp. на
питательной среде из бисульфитных
щелоков, полученных при варке целлюлозы
из соломы

Кинетические характеристики роста и выход биомассы дрожжей *Lipomyces tetrasporus* sp при культивировании на питательной среде из бисульфитного щелока.

Характеристики роста и выход биомассы	Температура культивирования, °C		
	15	20	25
Удельная скорость роста μ , ч ⁻¹	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Время генерации Q, ч	6,93 ± 0,01	5,33 ± 0,15	4,62 ± 0,02
Выход биомассы от РВ, %	13,47 ± 0,01	10,21 ± 0,01	14,01 ± 0,01

Влияние температуры культивирования дрожжей рода *Lipomyces tetrasporus* sp. на питательной среде из бисульфитного щелока на содержание экзополисахаридов в культуральной жидкости



внеклеточные полисахариды,
синтезируемые бактериями,
культивируемыми на бисульфитных
щелочах

Титр бактерий при культивировании на питательной среде,
приготовленной на щелоках *

Наименование микроорганизма	КОЕ/см ³
<i>Xanthomonas sp2</i>	1,10*10 ⁹
<i>Agrobacterium radiobacter 437</i>	1,15*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis Ч-13</i>	1,86*10 ⁹
<i>Azotobacter chroococum12</i>	1,37*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis TR6</i>	1,12*10 ⁹
<i>Rhizobium leguminosarum 1082</i>	1,18*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis HC8</i>	1,16*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis MZ3</i>	0,45*10 ⁹
<i>Bacillus subtilis OP3</i>	0,30*10 ⁹

* Титр бактерий в контроле – 5,5 * 10⁹
КОЕ/см³

Эффективность адсорбции Т- 2 микотоксина инактивированными бактериями и дрожжами

Наименование адсорбента	рН 2	рН 8	Истинная адсорбция, %
	Адсорбции, %	Десорбции, %	
<i>Xanthomonas sp2</i>	92,0	1,2	90,9
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 437	84,0	3,4	81,1
<i>Bacillus subtilis</i> Ч-13	90,6	8,3	83,1
<i>Azotobacter chroococum</i> 12	90,6	4,2	86,9
<i>Bacillus subtilis</i> TR6	92,0	5,3	87,1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 1082	89,3	1,2	88,2
<i>Bacillus subtilis</i> HC8	84,0	2,1	82,2
<i>Bacillus subtilis</i> MZ3	74,6	1,5	73,5
<i>Bacillus subtilis</i> OP3	80,0	4,7	76,2
<i>Candida scottii</i> утамм К-41	35,0	9,0	26,0
<i>S. cerevisiae</i> ВКПМ У-720	35,0	2,3	32,7

Экзополисахариды, синтезируемые *Leuconostoc mesenteroides*

- линейные полимеры глюкозы с α 1-6 связью,
- в зависимости от применяемых штаммов возможны полисахариды с разветвленными связями (α 1-2, 1-3, 1-4).

Синтез биомассы

Leuconostoc mesenteroides

Условия культивирования бактерий и синтеза декстрана на бисульфитных щелоках из соломы:

- **Влияние pH:** оптимум pH для роста клеток находится в диапазоне 6,6-6,9. Максимальный выход биомассы клеток наблюдается при pH 6,7 (7-8 г/л). Максимальный выход декстрана при 5,0 (8,5 г/л) при времени ферментации 10 ч. Максимальная ферментативная активность при pH 5,5 (85 Ед/л).
- **Влияние температуры:** рост клеток примерно одинаков в диапазоне 20-30 °С, однако при 35 °С выход существенно выше (7,85 вместо 5,7) и ферментация проходит на 4 ч раньше, чем при 20 °С (7 ч). При 40 °С рост клеток не наблюдается. Аналогичная закономерность наблюдается с выходом декстрана (7,94 вместо 6,91 при 20 °С) и фруктозы, однако максимальная активность фермента декстрансахаразы ДС наблюдается при 20 °С.

Профилактическая кормовая балансирующая добавка для дойных коров

Сухие вещества – 95-97%

Сырая клетчатка – 5-10%

Внеклеточный полисахарид декстран – 20-25%

Сахара – 50-65%

Биомасса бактерий *Leuconostoc mesenteroides* – 1-3%

Протеин – 20-15%

Зола – 4-10%

Удойность молочного КРС поднимается на 30 %

ВЫВОДЫ

- ПРИ СИНТЕЗЕ МИКРОБНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ЦЕЛЕСООБРАЗНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ ВТОРИЧНЫЕ РЕСУРСЫ, ОБРАЗУЮЩИЕСЯ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЦЕЛЛЛОЗЫ
- ПРИ ПОДГОТОВКЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ПОЛИСАХАРИДОВ ЦЕЛЕСООБРАЗНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ МЕТОДЫ, ПРИНЯТЫЕ В ЦБП

Творческий коллектив

Канарская З.А. к.т.н., доцент, кафедра пищевой биотехнологии КНИТУ

Хусаинов И.А. аспирант кафедры пищевой инженерии КНИТУ,

Гематдинова В.М. аспирант кафедры пищевой инженерии,

Дулькин Д.А. д.т.н., профессор кафедры ЦБП

спасибо за внимание