

Получение бактериальной целлюлозы в смешанной культуре *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 и базидиомицета *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill

Гаврюшина И.А., Каширин В.В., Губайдуллин А.В., Кудрякова Г.Х.

ФГОУ ВПО Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова

Email: irina-alekcandrovna2013@yandex.ru

Актуальность

Бактериальная целлюлоза как уникальный природный материал все больше привлекает внимание специалистов различных областей. Она обладает высокими адсорбционными свойствами, нетоксична, является биоразлагаемым и биосовместимым полимером. В биотехнологии бактериальную целлюлозу рекомендуют для иммобилизации клеток или мицелия трудно культивируемых продуцентов, таких как базидиомицет *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill. Биомасса мицелия этого продуцента содержит каротиноид, обладающий иммуномодулирующими, противоопухолевыми и антиоксидантными свойствами. Полученный материал, содержащий бактериальную целлюлозу и мицелий базидиомицета, может представлять большой интерес для разработки новых фармацевтических препаратов.

Объекты и методы исследования

В связи с этим, целью работы было исследовать возможность совместного культивирования штамма-продуцента бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 (ВКПМ В-10547) и базидиомицета *Laetiporus sulphureus* Ls 1-06 (ВКПМ F-982).

Трутовик серно-жёлтый — (лат. *Laetiporus sulphureus*) — гриб-трутовик семейства Полипоровые (*Polyporaceae*). Народное название: *ведьмина сепа*. *L.sulphureus* – гриб, способный к синтезу каротиноидов. Содержание каротиноидных пигментов в сухом мицелии достигает 0,8-1,0% (Гвоздикова, Черноок, 2005). В составе каротиноидных пигментов мицелия гриба *L.sulphureus* выявлено 3 фракции, которые являются ксантофиллами, а точнее, кетокаротиноидными кислотами. Количественное соотношение каротиноидных фракций в общей их компоненте составляет - 6,4:86,7:6,9. Наиболее высокий удельный вес приходится на пигмент, получивший тривиальное название лэтипорксантин (Феофилова, 1994).

Гриб известен как источник нескольких антибиотиков, активных в отношении устойчивых форм стафилококков. Описан ряд ферментов этого гриба, способных метаболизировать целлюлозу и полупродукты ее распада (Vole et al., 1978; Даниляк, 1980; Sack, Ginter, 1993; Sack et al., 1997; Сашенкова и др., 2005). Кроме того, *Laetiporus sulphureus* давно известен в народной медицине как лекарственный гриб, обладающий антисептическими свойствами, но природа действующих веществ не была установлена (Зерова, 1979; Bulakh, 2001; Psurtseva, Belova, 2001).

Известно также, что *Laetiporus sulphureus* образует психотропные (Appleton et al., 1988), гемоагглютинирующие, гемолитические (Konska et al., 1994), антиоксидантные, противовирусные (Капич и др., 2004) и противоопухолевые вещества (Yoshikawa et al., 2001). Ранее в ходе поиска антибиотиков, преодолевающих лекарственную устойчивость патогенных бактерий, были проведены исследования антимикробных свойств *Laetiporus sulphureus*, позволившие предположить, что этот вид может быть перспективным объектом для медицинских исследований (Тихонова и др., 2002, 2003; Ершова и др., 2003).

Бактериальная целлюлоза – уникальный полимер, редко встречающийся у прокариот. Макромолекулы целлюлозы построены из элементарных звеньев D-глюкозы, соединённых 1,4-β-гликозидными связями в линейные неразветвленные цепи. Молекулы бактериальной целлюлозы имеют нитевидную форму. Эти нитевидные молекулы объединяются в мицеллы и формируют микрофибриллы с диаметром 1,5 – 2 нм и длиной микрофибрилл около 50-100 мкм. Длина макромолекулы бактериальной целлюлозы от 1 мкм до 9 мкм (рисунок 1 и 2).

Штамм продуцент бактериальной целлюлозы *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008, выделенный из культуры «чайного кваса» в 2008 году (Громовых и др., 2009).

Штамм является облигатным аэробом, грамотрицательный, не образует спор, имеет подвижные клетки, не продуцирует пигмент, поэтому колонии, образованные на плотных питательных средах, бледные, белого цвета и может образовывать бактериальную целлюлозу на различных средах, но лучшая продукция происходит на средах, содержащих сахарозу. Штамм может расти при pH от 2.5 до 6.5.

Бактериальная целлюлоза обладает рядом свойств: пористость (*хорошо аэрируется*), высокая влагоудерживающая способность, прозрачность, биосовместимость (*природный полисахарид без примесей*), эластичность и гидрофильность.

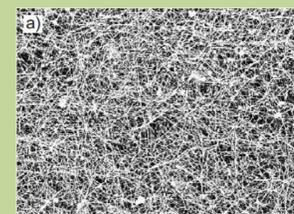


Рис. 1 Структура бактериальной целлюлозы

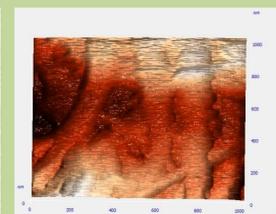


Рис. 2 Структура микро- и макрофибрилл

Культивирование штаммов *G. hansenii* и *L. sulphureus*

Культивирование штамма Ls 1-06 *Laetiporus sulphureus* проводили на трех жидких питательных средах: MALTAX 5, MALTAX 10, H5-2. Учитывая физиологические особенности исследованных штаммов *G. hansenii* и *L. sulphureus*, подбирали питательную среду для их совместного культивирования. В исследованиях использовали питательную среду H5-2, состав которой разработан для *G. hansenii* (Фан Ми Хань и др., 2012). Совместное и раздельное культивирование каждого продуцента проводили стационарно в колбах Эрленмейера. Клетки продуцента *G. hansenii* в полученной биомассе многократно отмывали 5%-м раствором NaHCO₃ и дистиллированной водой.

Определение иммобилизованного в пленке мицелия *L. sulphureus*

Количество иммобилизованного в пленке мицелия *L. sulphureus* в процессе культивирования определяли по доле белка (Bradford, 1976; Bailey, 2009). Брали 0,05 г навески мицелия, высушенной в сушильном шкафу при температуре 60 °С до постоянной массы, перетирали в гранитной ступке и заливали детергентом – 60 мл 6М раствором мочевины, после чего выдерживали сутки и затем центрифугировали 60 секунд со скоростью 12 000 об/мин. Оптическую плотность экстракта определяли на планшетном фотометре Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific при длине волны 595 нм.

Содержание каротиноидных соединений в мицелии штаммов *Laetiporus sulphureus*

Для определения концентрации каротиноидных пигментов использовали раствор двухромовокислого калия. Для приготовления стандартного раствора двухромовокислого калия брали навеску бихромата калия массой 0,720 г, взвешенного с погрешностью не более 0,001 г, растворяли в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1000 см³ и затем объем раствора доводили до метки и тщательно перемешивали. Для приготовления растворов сравнения в мерные колбы вместимостью 100 см³ из бюретки приливали каждый раз от нуля 10, 20, 30, 40 и 50 см³ основного раствора двухромовокислого калия и доводили объем до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивали.

Оптическая плотность полученного раствора равна оптической плотности раствора каротина концентрации 0,00416 мг/см³ [ГОСТ 13496.17–95 Методы определения каротина]. Фотометрирование растворов сравнения проводили на планшетном фотометре Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific при длине волны 450 нм.

Подготовка проб для определения каротиноидов

Для расчетов брали навеску мицелия, подсушивали в сушильном шкафу при температуре 60 °С в течении двух часов, перетирали в гранитной ступке и заливали детергентом – 96% этанолом, после чего выдерживали сутки в теплом месте и затем центрифугировали 60 секунд со скоростью 14 000 об/мин. Оптическую плотность экстракта определяли на планшетном фотометре Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific при длине волны 450 нм.

Результаты исследования

Исследования показали, что оба продуцента, *G. hansenii* и *L. sulphureus*, растут на среде H5 как в чистой культуре (рисунок 3, 4, 7 и 8) так и при совместном культивировании (рисунок 5,6), образуя пленки различной толщины, при этом выход биомассы абсолютно сухого мицелия в пересчете на абсолютно сухое вещество составил от 0,473 г/л до 4,845 г/л питательной среды.

В пленке бактериальной целлюлозы содержание белка не было обнаружено, тогда как в биомассе чистого мицелия *L. sulphureus* содержание белка составляло 17,2 %. При совместном культивировании оба продуцента синтезируют пленку, в которой количество белка составило 15,05 %, а доля биомассы мицелия – 87,5 %. Полученные результаты свидетельствуют о возможном совместном культивировании *G. hansenii* и *L. sulphureus*, при котором бактериальная целлюлоза служит каркасом для иммобилизации в процессе роста продуцента каротиноида.

Анализ показал, что наибольший выход каротиноидов в пересчете на абсолютно сухую массу наблюдается у штамма при совместном культивировании на бедной питательными веществами среде и составляет 1,02 мг/%, тогда как при культивировании продуцента в монокультуре выход каротиноида составляет 0,5 мг/%.

Таким образом, для получения *Laetiporus sulphureus* целесообразно использование совместного культивирования с продуцентом бактериальной целлюлозы.



Рис. 3 Морфология роста штамма Ls 1-06 *Laetiporus sulphureus* при поверхностном культивировании на среде MALTAX 10



Рис. 5 Рост *Laetiporus sulphureus* и *Gluconacetobacter hansenii* на среде H5-2



Рис.6 Пленка *Laetiporus sulphureus* после культивирования на среде H5-2



Рис.4 Морфология роста штамма Ls 1-06 *Laetiporus sulphureus* при поверхностном культивировании на среде H5-2



Рис.7 Рост *Gluconacetobacter hansenii* на среде H5-2



Рис.8 Пленка *Gluconacetobacter hansenii* после культивирования на среде H5-2