САНКТ - ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
ИНСТИТУТ (ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

**Пестова Ольга Валерьевна**

**БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЯМИ
BACILLUSMUCILAGINOSUS В ГЛУБИННЫХ УСЛОВИЯХ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И НОВЫЙ АСПЕКТ ИХ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук профессор Виноградов Е.Я.

Научный консультант: кандидит биологических наук доцент Няникова Г.Г.

**САНКТ - ПЕТЕРБУРГ - 2000**

**СОДЕРЖАНИЕ**

Стр.

[ВВЕДЕНИЕ 6](#bookmark3)

ГЛАВА 1 .АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

1. Экзополисахариды микроорганизмов, их физико-химические свойства 11
	1. [Биохимические основы биосинтеза экзополисахаридов 13](#bookmark4)
	2. Влияние условий культивирования на биосинтез, физико-химические и

биологические свойства экзополисахаридов 17

* 1. Образование экзополисахаридов в процессе роста продуцентов 25
	2. Технологические приемы, оказывающие влияние на биосинтез

экзополисахаридов 29

* 1. Способы промышленного получения экзополисахаридов 36
	2. [Сферы практического использования экзополисахаридов 42](#bookmark7)
	3. Экзополисахариды Bacillus mucilaginosus и области их применения.. ..50
	4. Заключение 54

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Характеристика и свойства микроорганизмов, используемых в работе..56
2. Питательные среды 57
3. Реактивы и материалы 57
4. Методы и условия культивирования В. mucilaginosus 62
5. Методы определения биомассы 65
6. Определение pH питательных сред 65
7. Методы оптимизации питательных сред 65
8. Определение редуцирующих веществ 68

з

1. УФ-облучение вегетативных клеток и спор В. mucilaginosus 69
2. Методы исследования морфологии клеток и колоний 70
3. Методы выделения и очистки экзополисахаридов 71

2.12 Методы измерения вязкости и химических характеристик экзополисахаридов 71

1. Метод гидролиза биомассы В. mucilaginosus 74
2. Метод иммобилизации клеток В. mucilaginosus на хитиновых

сорбентах 75

1. Метод сорбции ионов меди из почвы 76
2. Определение концентрации ионов меди 77

2.17 Статистическая обработка результатов 79

ГЛАВА 3. БИОСИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ В. MUCILAGINOSUS В ГЛУБИННЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

1. Оптимизация питательной среды 81
2. Влияние источников азота и углерода на синтез экзополисахаридов 85
3. Исследование морфологии колоний В. mucilaginosus, выращенных при

культивировании на средах разного состава 90

1. Динамика роста В. mucilaginosus и синтеза экзополисахаридов 90
2. Исследование химического строения экзополисахаридов

*В. mucilaginosus* 91

3.5.1 Определение молекулярной массы и моносахаридного состава

экзополисахаридов В. mucilaginosus 93

1. Влияние условий культивирования и состава питательных сред на

химическое строение экзополисахаридов 93

1. Заключение 96

ГЛАВА 4. ИНТЕНСИФИКАЦИЯ БИОСИНТЕЗА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ В ГЛУБИННЫХ УСЛОВИЯХ

4Л Синтеза экзополисахаридов при дополнительном внесении в среду углерода 99

1. Влияние pH среды на синтез экзополисахаридов и рост

*В. mucilaginosus* 101

1. Интенсивность синтеза экзополисахаридов в зависимости от объема

питательной среды 102

1. Масштабирование процесса культивирования В. mucilaginosus 104
2. Влияние УФ-облучения на биосинтетическую активность продуцента. 108
3. Заключение 114

ГЛАВА 5. СОЗДАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО БИОСОРБЕНТА НА ОСНОВЕ БИОМАССЫ И ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ В. MUCILAGINOSUS

1. Биосорбция тяжелых металлов экзополисахаридами и клетками

*В. mucilaginosus* 117

1. Иммобилизация клеток В. mucilaginosus на хитиновых сорбентах 118
2. Исследование структуры биосорбента 121
3. Оценка сорбционных свойств биосорбента 121
4. Извлечение меди из почв с помощью биосорбента 123
	1. Подбор условий ферментативного гидролиза биомассы 126
5. Применение гидролизата биомассы В. mucilaginosus в качестве

компонента питательных сред 128

1. Заключение 134

ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Перспективы получения экзополисахаридов в глубинных условиях

культивирования 137

1. Новые направления использования экзополисахаридов

В. mucilaginosus и разработанного биосорбента 144

[ВЫВОДЫ 147](#bookmark21)

ЛИТЕРАТУРА 149

ПРИЛОЖЕНИЯ 167

ВЫВОДЫ

1. Разработаны основы биосинтеза экзополисахаридов бактериями В.

mucilaginosus. Установлены факторы, оказывающие наиболее существенное влияние на биосинтетическую активность продуцента: pH среды,

интенсивность аэрации, соотношение углерода и азота в среде. Кроме того, впервые показано, что выход экзополисахаридов можно увеличить более, чем в 6,5 раз путем УФ-облучения посевного материала (в виде споровой суспензии).

1. Предложена новая питательная среда для глубинной ферментации В. mucilaginosus в условиях промышленного получения экзополисахаридов (патент № 2140454). Установлено, что использование пептона в качестве источника азота увеличивает выход экзополисахаридов в 1,3 раза по сравнению с минеральными источниками азота. Биосинтетическая активность на мелассно-пептонной среде выше в 2 раза, чем на глюкозо-и сахарозо-солевых средах. Подача углерода в среду в стационарной фазе развития культуры приводит к увеличению выхода полисахаридов в 1.8 раз.
2. Максимальный синтез ЭПС наблюдается при достаточно интенсивной аэрации (рО2=70%). Концентрация растворенного кислорода в среде влияет как на динамику накопления ЭПС, так и на время их максимального выхода. В зависимости от аэрации питательной среды изменяется не только выход ЭПС, но и их качественный состав. При высокой степени аэрации в ЭПС увеличивается содержание -СООН-групп.
3. Установлено, что независимо от состава сред и условий культивирования ЭПС В. mucilaginosus относятся к 1,4-гликанам, в состав которых входят глюкоза, галактоза, манноза и уроновые кислоты. Средняя молекулярная масса ЭПС варьирует от 100 до 130 тыс Да.
4. Разработан новый комплексный препарат, который может служить белковой основой и стимулятором роста в составе микробиологических питательных сред. Преперат представляет собой ферментативный гидролизат биомассы В. mucilaginosus, являющейся отходом в производстве экзополисахаридов.
5. Установлено, что ЭПС обладают сорбционными свойствами в отношении ионов меди. Иммобилизация клеток В. mucilaginosus на хитиновых сорбентах приводит к улучшению сорбционных свойств ЭПС в
6. раза. Эффективным носителем для иммобилизации клеток В. mucilaginosus служит агрохитин (степень иммобилизации достигает 96,4%).

Предложен новый способ использования ЭПС В. mucilaginosus в составе комплексного сорбента для восстановления и улучшения почв, загрязненных тяжелыми металлами. Созданный биосорбент состоит из агрохитина и иммобилизованных на нем клеток В. mucilaginosus, вырабатывающих ЭПС