

Погорелова Н. А., Сарницкая Н.А.

Изолирование целлюлозосинтезирующих микроорганизмов из симбиотического консорциума и оценка их продуктивности

ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»
(Россия, Омск)

doi: 10.18411/trnio-11-2023-329

Аннотация

Бактериальная целлюлоза (БЦ) является перспективным материалом для технологического и медицинского применения. Выделение эффективных продуцентов БЦ из природных симбиотических консорциумов является перспективным направлением в отношении промышленной биотехнологии БЦ. В работе представлены результаты исследований по изолированию уксуснокислых бактерий симбиота *Medusomyces gisevii*. Определено влияние состава питательной среды на биосинтез БЦ.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, симбиотический консорциум, уксуснокислые бактерии, биосинтез, микроорганизмы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-10052 от 20.04.2023).

Abstract

Bacterial cellulose (BC) is a promising material for technological and medical applications. Isolation of effective BC producers from natural symbiotic consortia is a promising direction in relation to industrial biotechnology of BC. The paper presents the results of studies on the isolation of acetic acid bacteria of the symbiote *Medusomyces gisevii*. The influence of the nutrient medium composition on the biosynthesis of BC has been determined.

Keywords: bacterial cellulose, symbiotic consortium, acetic acid bacteria, biosynthesis, microorganisms.

Financing. The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 23-24-10052 dated 04/20/2023).

Введение

Бактериальная целлюлоза (БЦ), состоящая из β -1,4 связанных глюкозных звеньев, является универсальным природным материалом, идеально подходящим для технологического и медицинского применений [1, 2]. Бактериальную целлюлозу отличает от растительной высокая кристалличность и степень чистоты, влагоудерживающая способность и низкая экологическая нагрузка при производстве, а также выдающиеся механические свойства [3, 4].

Исследования механизма биосинтеза БЦ, проведенные за последние два десятилетия, внесли значительный вклад в выяснение процессов биогенеза продуцентов БЦ [4]. Среди источников углерода глюкоза считается основным субстратом в биосинтезе этого полисахарида. Однако ряд исследований показал и эффективность сахарозы и других углеводов, которые могут быть биотехнологически и экономически предпочтительными субстратами для биосинтеза БЦ [5].

Несмотря на существующие исследования, особенности синтеза БЦ с использованием источников углерода, отличных от глюкозы, все еще слабо изучены. Среди продуцентов БЦ (*Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, он же *Komagataeibacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sarcina* и т.д.) существуют значительные различия в продуктивности и свойствах синтезированной БЦ. Тот факт, что различные источники углерода имеют разную молекулярную массу, химическую структуру и биодоступность, приводит к изменению скорости биосинтеза и структурных характеристик БЦ [3, 6, 7]. Таким образом, оптимизация состава питательной среды, pH, содержания углерода и ионной силы остаются актуальными задачами, поскольку многим

технологиям производства БЦ критически препятствуют низкая скорость производства и значительная вариабельность выхода от партии к партии [8, 9].

В некоторых наших предыдущих исследованиях мы сообщали о молекулярной сборке, структуре и прочностных характеристиках нативных и модифицированных БЦ, синтезированных симбиотом *Medusomyces gisevii* [10]. Этот симбиотический консорциум, преимущественно состоит из уксуснокислых бактерий (*Acetobacter*, *Komagataeibacter*) и дрожжей *Zygosaccharomyces* [11]. Дрожжевые клетки, потребляя углеводы, образуют этиловый спирт и витамины, таким образом, поддерживая и стимулируя метаболическую активность уксуснокислых бактерий. Последние, в свою очередь, осуществляют частичное окисление углеводов и алкоголя, приводящее к накоплению ацетата, глюконата и цитрата. Эти и другие органические кислоты, полученные из бактерий, служат дополнительным источником углерода для дрожжевых клеток. Благодаря этим процессам взаимной регуляции симбиотические популяции сосуществуют как самоподдерживающаяся динамическая система.

В этой работе мы попытались оценить продуктивность целлюлозосинтезирующих микроорганизмов, выделенных из симбиота *Medusomyces gisevii*, на питательной среде RAE [12] в зависимости от времени и состава питательной среды.

Материалы и методы:

Штаммы-продуценты бактериальной целлюлозы выделяли из симбиотического консорциума *Medusomyces gisevii*, которые адаптировали на питательной среде, содержащей 7,5 % глюкозы и экстракта зеленого чая. По литературным данным установлено, что симбиот имеет относительно низкое разнообразие, в нем доминирует четыре рода бактерий, а именно *Komagataeibacter*, *Acetobacter*, *Gluconobacter* и *Pseudomonas*, и три рода дрожжевых грибов, включая *Brettanomyces*, *Pichia* и *Zygosaccharomyces* [13].

На первом этапе исследований, в задачу которого входило изолирование целлюлозосинтезирующих бактерий из симбиотического консорциума и элиминации других представителей его микробиоты путем создания селективных условий для первых. Для выделения продуцентов БЦ - уксуснокислых бактерий, симбиот *Medusomyces gisevii* культивировали в течение 4-5-ти суток при температуре 29°C на жидкой (ЖПС) и плотной (ППС) дифференциально-диагностических среде RAE (глюкоза — 20 г/л, пептон — 5 г/л, дрожжевой экстракт — 5 г/л, лимонная кислота — 0,5 г/л, Na₂HPO₄ × 12 H₂O — 6,8 г/л, ледяная уксусная кислота 70% — 1,0 мл/л и этиловый спирт 98% — 10 мл/л, агар для ППС 15 г/л) [14].

Культивирование, хранение и изучение бактерий осуществляли в лаборатории Агротехнологического факультета в термостате при температуре 29 ± 0,4 °C в течение 3–5 дней. Идентификацию изолятов осуществляли по морфологическим, культуральным признакам, учитывая характерные для ацетобактерий свойства [15].

Степень конверсии субстрата глюкозы рассчитывали по изменению его массы в процессе биосинтеза к массе БЦ в сухих веществах по формуле:

$$\% = \frac{m_{\text{БЦ}} \times 0,018}{m_{\text{субстрата}}^0 - m_{\text{субстрата}}^1} \times 100,$$

где % - степень конверсии субстрата, %;

$m_{\text{БЦ}}$ - масса БЦ, г;

0,018 - коэффициент пересчета на сухие вещества БЦ;

$m_{\text{субстрата}}^0$ - стартовая масса субстрата, г;

$m_{\text{субстрата}}^1$ - масса субстрата в период биосинтеза БЦ, г.

Определение глюкозы культуральной жидкости проводили ТЕСТ системой «Глюкоза-Ново» производства «Вектор-Бест» (глюкозооксидазным методом)

Результаты и обсуждение

На первом этапе, учитывая, что виды бактерий рода *Komagataeibacter*, такие как *K. xylinus* и *K. hansenii*, плохо развиваются на плотной питательной среде, для их изолирования использована жидкая селективная питательная среда RAE (ЖПС). Проводили три

параллельных инокулирования симбиотического консорциума в ЖПС RAE при их соотношении 1:3, с целью минимизировать погрешности и иметь средние результаты.

На 4-5-ые сутки культивирования консорциума глубинным методом на поверхности культуральной среды образовывались гель пленки бактериальной целлюлозы, синтезируемые уксуснокислыми бактериями.

Из культуральной жидкости методом «истощающего штриха» были получены изолированные колонии на агаризированной ППС RAE. Микроскопия клеток этих колоний позволила дифференцировать несколько морфологических типов микробиота представленных на рисунке 1.

Исследование морфологических и культуральных признаков микроорганизмов, выросших на ППС RAE доказывает наличие уксуснокислых бактерий – мелкие палочки, и дрожжей – крупные овальные клетки. Колонии уксуснокислых бактерий отличаются кремовым цветом, меньшим размером (2-7 мм) и характерным блеском от колоний дрожжей.

Такое различие дало возможность отделить их друг от друга, а изолированные уксуснокислые бактерии использовать в последующих исследованиях их продуктивности в отношении бактериальной целлюлозы.

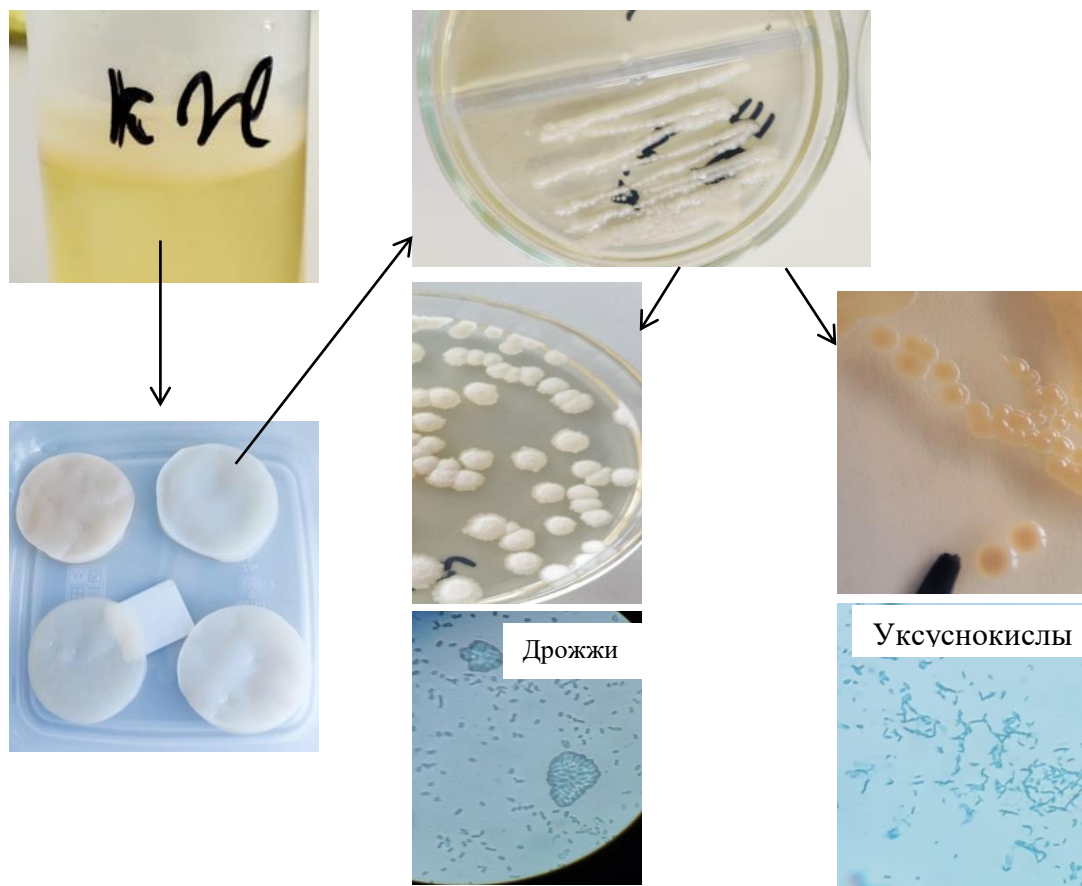


Рисунок 1. Морфология клеток микроорганизмов симбиотического консорциума.

Задачей второго этапа являлось определение эффективности биосинтеза БЦ ранее изолированными уксуснокислыми бактериями в зависимости от качественного и количественного состава ЖПС RAE (табл 1).

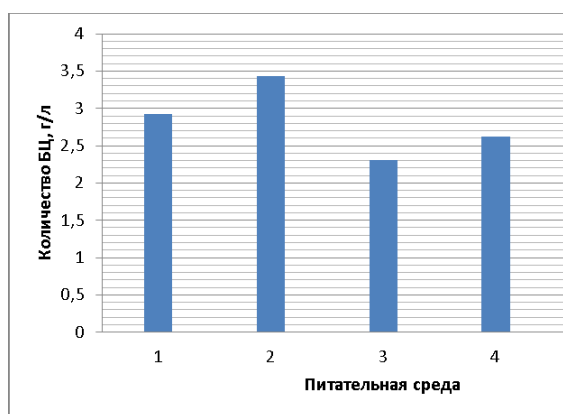
Таблица 1

Состав жидкой питательной среды RAE для культивирования продуцентов БЦ.

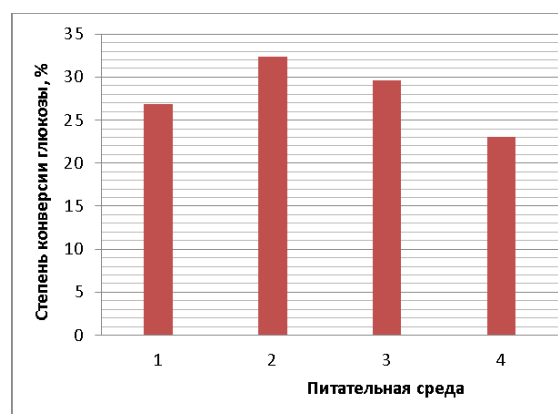
RAE		1	2	3	4
	Глюкоза, г/л	20	20	20	20
	Пептон, г/л	5	-	5	2,5
	Дрожжевой экстракт, г/л	5	5	-	2,5

Лимонная кислота, г/л	0,5	0,5	0,5	0,5
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, г/л	6,8	6,8	6,8	6,8
Ледяная уксусная кислота 70%, мл/л	1,0	1,0	1,0	1,0
Этиловый спирт 98%, мл/л	10	10	10	10

Уксуснокислые бактерии инокулировали в 50 мл ЖПС RAE. Биосинтез БЦ проводили в статических условиях, в течение 6 суток, в термостате при 290С. Для определения эффективности продуцентов в отношении синтеза целлюлозы, полученные гелевые пленки БЦ извлекали из культуральной жидкости, отмывали поочередно в 0,1 М растворе гидроксида натрия и дистиллированной воде, затем сушили до постоянной массы. Результаты представлены на рисунке 2.



А)



Б)

Рисунок 2 Изменение количества продуцируемой БЦ (а) и степени конверсии субстрата -глюкозы от состава питательной среды RAE.

Из анализа данных (количества продуцируемой целлюлозы и степени конверсии субстрата) биосинтеза БЦ уксуснокислыми бактериями, изолированными из симбиотического консорциума, установлено, что уменьшение в 2 раза количества пептона и дрожжевого экстракта питательной среды до 2,5 г/л, снижает как количество синтезируемой БЦ (2,6 г/л), так и степень конверсии глюкозы (23,1%) в сравнении с контролем. Интересно, что исключение пептона из состава ЖПС RAE, способствует как биосинтезу БЦ (3,4 г/л), так и определяет наибольшую степень конверсии глюкозы (32,4 %) для исследуемых составов питательных сред.

1. Gupte Y., Kulkarni A., Raut B., Sarkar P. et al. Characterization of nanocellulose production by strains of Komagataeibacter sp. isolated from organic waste and Kombucha // Carbohydrate polymers. 2021; 266:118176. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118176.
2. Basu A., Vadan S.V., Lim S. Rational design of a scalable bioprocess platform for bacterial cellulose production // Carbohydrate polymers. 2019; 207:684–693. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.10.085.
3. Wang S-S., Han Y-H., Chen J-L., Zhang D-C. et al. Insights into bacterial cellulose biosynthesis from different carbon sources and the associated biochemical transformation pathways in Komagataeibacter sp. W1 // Polymers. 2018; 10(9):963. DOI: 10.3390/polym10090963.
4. Mikkelsen D., Flanagan B.M., Dykes G.A., Gidley M.J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus strain ATCC 53524 // Journal of applied microbiology. 2009; 107(2):576–583. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04226.x.
5. Hodel K.V.S., Fonseca L.M.D.S., Santos I.M.S., Cerqueira J.C. et al. Evaluation of different methods for cultivating Gluconacetobacter hansenii for bacterial cellulose and montmorillonite biocomposite production: wound-dressing applications // Polymers. 2020; 12(2):267. DOI: 10.3390/polym12020267.
6. Singhsa P., Narain R., Manuspiya H. Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different Komagataeibacter xylinus strains and carbon sources in static and agitated conditions // Cellulose. 2018; 25(3):1571–1581. DOI:10.1007/s10570-018-1699-1.

7. Kiziltas E.E., Kiziltas A., Gardner D.J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars // Carbohydrate polymers. 2015; 124:131–138. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.01.036
8. Li Z., Chen S-Q., Cao X., Li L., Zhu J., Yu H. Effect of pH Buffer and carbon metabolism on the yield and mechanical properties of bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582 // Journal of microbiology and biotechnology. 2021; 31(3):429–438. DOI: 10.4014/jmb.2010.10054
9. Semjonovs P., Ruklisha M., Paegle L., Saka M. et al. Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha // Applied microbiology and biotechnology. 2017; 101(3):1003–1012. DOI: 10.1007/s00253-016-7761-8.
10. Pogorelova N., Rogachev E., Digel I., Chernigova S., Nardin D. Bacterial cellulose nanocomposites: morphology and mechanical properties // Materials (Basel). 2020; 13(12):2849. DOI: 10.3390/ma13122849.
11. Marsh A.J., O'Sullivan O., Hill C., Ross R.P., Cotter P.D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples // Food microbiology. 2014; 38:171–178. DOI: 10.1016/j.fm.2013.09.003.
12. Боиштян А.В., Кирсанова А.И., Рубцов С.Л., Киселица Н. Выявление оптимального источника для изолирования уксуснокислых бактерий // Все о мясе. 2020. № 5S. С. 59-62. DOI 10.21323/2071-2499-2020-5S-59-62.
13. Huang X., Xin Y., Lu T. A systematic, complexity-reduction approach to dissect microbiome: the kombucha tea microbiome as an example // Cold Spring Harbor Laboratory. 2022; 11: e76401. DOI: 10.7554/eLife.76401.
14. Trček J., Jernejc K., Matsushita K. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression // Extremophiles. 2007; 11(4):627–635. DOI: 10.1007/s00792-007-0077-y.
15. Joao Nuno Serodio de Melo. Dissertation — Microbiology of Vinegar: from Isolation, Phenetic Characterization and Detection of Acetic Acid Bacteria to Microbial Profiling of an Industrial Production. 2016 [Electronic resource: <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/cursos/microbio/dissertacao/846778572211566> (Access date 23.09.2020)].

Сулейманова Т.З.

Ультра-переработанная пища и ее влияние на организм человека

*Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова
(Россия, Грозный)*

doi: 10.18411/trnio-11-2023-330

Аннотация

В данной статье описывается влияние ультра-переработанной пищи на организм человека.

Ключевые слова: ожирение, пища, калории, ультра-переработанные продукты.

Abstract

This article describes the effects of ultra-processed food on the human body.

Keywords: obesity, food, calories, ultra-processed foods.

За последние 50 лет каждое новое поколение весило больше предыдущего. У 80 % подростков с ожирением возникнут проблемы со здоровьем в зрелости. Главная причина ожирения – переработанная пища, которая доступна в больших количествах. Современная обработанная еда, очень выгодна пищевой промышленности, но не всегда полезна для нас. С эпидемией ожирения нельзя справиться, вызывая только к личной ответственности. Человеческая природа не изменилась, изменилось наше продовольственное окружение, ассортимент продуктов, способы их приготовления. Нет такого, что люди за последние 20-30 лет стали слабовольными. Вся проблема в том, какая еда нам доступна. Мы недооцениваем влияние промышленно-произведенной или по-другому ультра-переработанной еды на рост ожирения.

57 % калорий британцы получают, употребляя ультра-переработанную пищу. У детей и подростков этот процент еще выше (у детей – 64 %, а у подростков – 68 %). Каждый 5 британец 80 % калорий получает из ультра-переработанной пищи. В других странах похожая ситуация. В Западной Европе и Северной Америке, большую часть калорий люди получают, питаясь переработанными продуктами. Запад догоняют Восточная Азия и Южная Америка, где потребление такой еды растет с каждым годом.