



УДК 577.114.083

## ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

Н. А. Фокина, Г. Т. Урядова, Л. В. Карпунина

Фокина Надежда Александровна, микробиолог, Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова, fockina.nadejda@yandex.ru

Урядова Галина Тимофеевна, аспирант, Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова, eni\_galina@mail.ru

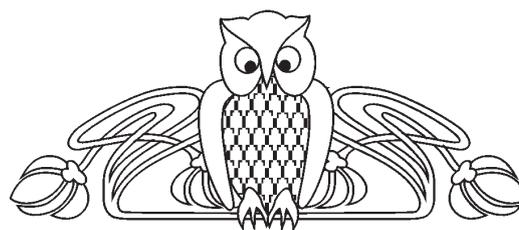
Карпунина Лидия Владимировна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии, Саратовский государственный аграрный университет имени Н. И. Вавилова, karpuninal@mail.ru

Выделен экзополисахарид *Streptococcus thermophilus*. Подобраны условия культивирования бактерий для максимального выхода экзополисахарида. Бактериальную культуру *S. thermophilus* инкубировали в течение 48 часов в жидкой питательной среде А. Welman при 38 °С, 180 об/мин на термостатируемом шейкере-инкубаторе. В качестве источника углерода были использованы сахароза, лактоза и глюкоза. Для продуцирования экзополисахарида наилучшим источником углерода оказалась сахароза. Выделение экзополисахарида проводили по методу J. Cerning в нашей модификации. Очистку выделенного ЭПС от низкомолекулярных соединений осуществляли с помощью гель-фильтрации на колонке с наполнителем Sephadex G-50. Экзополисахарид *S. thermophilus* не содержал в своем составе белок, нуклеиновые кислоты и клетки продуцента. Наличие белка определяли методом М. Бредфорд, содержание нуклеиновых кислот – на спектрофотометре при 260 нм, отсутствие бактерий в препарате контролировали путем микроскопирования по методу Грама. Изучали влияние времени культивирования *S. thermophilus* на продукцию экзополисахарида, выход которого определяли фенол-серным методом. Было показано, что максимальная продукция ЭПС совпадала с максимальным ростом культуры стрептококка и приходилась на стационарную фазу роста.

**Ключевые слова:** бактерии, стрептококк, экзополисахарид, выделение, очистка.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-2-179-181

В последние годы большое внимание уделяется экзополисахаридам (ЭПС) микробного происхождения в связи с их физиологической значимостью в организме человека и животных и возможностью применения в различных отраслях народного хозяйства [1–4]. Продуцентами ЭПС являются микроорганизмы различных родов и видов [5–9]. Среди них менее изученными являются молочнокислые бактерии [10–11].



Целью данной работы явилось выделение экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* и изучение продукции ЭПС в зависимости от источника углерода и времени культивирования.

### Материалы и методы

Объектом исследования явилась культура *Streptococcus thermophilus*, которая была получена из ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (г. Москва).

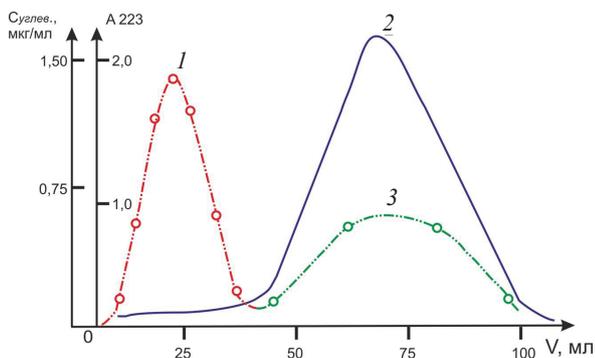
Культивирование *Streptococcus thermophilus* проводили при 38 °С в течение 48 ч на термостатируемом шейкере-инкубаторе ES-20 (Литва) при 180 об/мин на среде А. Welman [12]. Выделение осуществляли по методу J. Cerning [13] в нашей модификации. Очистку ЭПС проводили методом гель-фильтрации на колонке с носителем Sephadex G-50. Наличие белка определяли методом М. Бредфорд [14], содержание нуклеиновых кислот на спектрофотометре «Cary 100 Scan» («Varian», США) при 260 нм [15], концентрацию углеводов – фенол-серным методом [16].

### Результаты и их обсуждение

Выделение ЭПС проводили методом J. Cerning [13] в нашей модификации. Для этого бактерии *S. thermophilus* выращивали на среде А. Welman при 38 °С, при 180 об/мин на шейкере-инкубаторе в течение 48 ч. Затем культуральную жидкость центрифугировали при 3000 г в течение 30 мин. Осадок биомассы удаляли, а освобожденную от клеток продуцента культуральную жидкость упаривали на роторном испарителе N-1100VWD (Япония). Отсутствие бактерий на данном этапе контролировали путем микроскопирования методом Грама. Затем ЭПС осаждали двойным объемом 96%-ного этилового спирта. Полученный концентрат растворяли в небольшом количестве дистиллированной воды, далее центрифугировали при 3000 г в течение 30 мин и осаждали двойным объемом 96%-ного этилового спирта. Процедуру центрифугирования и переосаждения повторяли еще 2 раза. Дальнейшую очистку проводили методом гель-фильтрации на



колонке, используя в качестве носителя Sephadex G-50. В качестве элюента использовали 1М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , pH 5,5 (рисунок). Выделенный ЭПС после высушивания (сушка лиофильная, COOLSAF 55-4 SISTEM, ScanLaf, Дания) представлял собой порошок светло-коричневого цвета, без запаха, не имеющий в своем составе белка, нуклеиновых кислот и клеток продуцента.



Хроматограммы экзополисахарида *S. thermophilus* (1, 490 нм), пигмента (2), примесей, не дающих реакцию фенол-серным методом при 490 нм (3) на колонке с Sephadex G-50.  $V_0 = 35$ . Буфер уксуснокислый 1М (pH 5,5). Скорость элюции 1,0 мл/мин

Из литературных данных известно [17, 18], что на биосинтез ЭПС оказывает влияние наличие разных источников углерода в среде культивирования. Для молочнокислых бактерий такими источниками углевода являются глюкоза, сахароза, лактоза, а также комбинации этих сахаров.

Исходя из этого изучали влияние данных углеводов на продукцию ЭПС *S. thermophilus*. Было показано (таблица), что при выращивании стрептококка на среде с глюкозой выход ЭПС составлял 1,5 г/л. При внесении в среду культивирования лактозы продукция ЭПС была равна 1,7 г/л. При добавлении же сахарозы в среду культивирования продукция ЭПС увеличивалась до 2,3 г/л. Имеются работы [19], свидетельствующие о том, что и для других бактерий, в частности ксантомонад, наилучшим источником углерода для продукции ЭПС также являлась сахароза.

**Влияние углеводов на продукцию ЭПС *S. thermophilus***

Углевод	Продукция ЭПС, г/л
Глюкоза	1,5±0,4
Лактоза	1,7±0,2
Сахароза	2,3±0,2

В литературе встречаются сведения о том, что продукция ЭПС у некоторых молочнокислых бактерий совпадает с ростом самой культуры

[20]. Для изучения влияния времени культивирования на продукцию ЭПС строили кривую роста *S. thermophilus*. Бактерии выращивали на среде с сахарозой. Параллельно с ростом данной культуры в процессе культивирования определяли выход ЭПС фенол-серным методом. Было показано, что максимальный рост культуры стрептококка совпадал с максимальной продукцией ЭПС и приходился на стационарную фазу роста (20–24 часа), что хорошо совпадает с данными других исследователей [20].

Таким образом, из культуры *S. thermophilus* был выделен ЭПС, не содержащий в своем составе белок, нуклеиновые кислоты и клетки продуцента. Подобраны условия культивирования бактерий для максимального выхода ЭПС: источник углерода – сахароза и время культивирования.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность Сергею Владимировичу Семенову, сотруднику ООО «ВИК – здоровье животных» кандидату биологических наук за оказанную помощь в проведении гель-фильтрации.

### Список литературы

1. Ботвинко И. В. Экзополисахариды бактерий // Успехи микробиологии. 1985. Т. 20. С. 79–122.
2. Ермольева З. В., Вайсберг Г. Е. Стимуляция неспецифической резистентности организма и бактериальные полисахариды. М.: Медицина, 1976. 184 с.
3. Ширококов В. П. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Винница: Нова книга, 2015. 896 с.
4. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / под ред. Г. Г. Онищенко. М.: ГОУ ВУНМЦ Минздрава РФ, 2002. 608 с.
5. Няникова Г. Г., Куприна Е. Э., Пестова О. В., Водолажская С. В. Иммунизация на хитине *Bacillus subtilis* – продуцента экзополисахаридов // Прикладная биохимия и микробиология. 2002. № 3. С. 300–304.
6. Ксенофонтов Б. С., Козодаев А. С., Таранов Р. А., Сенник Е. В., Виноградов М. С., Воропаева А. А. Особенности получения экзополисахаридов биотехнологическим способом // Universum: Химия и биология: электрон. науч. журн. 2015. № 5 (13). URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/2126>.
7. Ганина В. И., Рожкова Т. В. Анализ зарубежных исследований в области молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды // Изв. вузов. Пищевые технологии. 2005. № 5–6. С. 65–66.
8. Garcia-Ochoa F. Xanthan gum: production, recovery and properties // Biotechnology Advance. 2000. Vol. 18. P. 549–579.



9. Boyd A., Chakrabarty A. M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms : role of the alginate exopolysaccharide // J. Ind. Microbiol. 1995. Vol. 15. P. 162–168.
10. Артюхова С. И., Меньших С. А. Об актуальности-использования молочнокислых бактерий, синтезирующих экзополисахариды при производстве кисломолочного напитка «ТАН» // Междунар. журн. эксперимент. образования. 2016. № 12 (ч. 1). С. 11.
11. Красникова Л. В., Маркелова В. В. Синтез экзополисахаридов штаммами *L. acidophilus* в молочной сыворотке // Изв. вузов. Пищевая технология. 2013. № 4 (334). С. 26–28.
12. Welman A. D., Maddox I. S., Archer R. H. Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* // J. Appl. Microbiol. 2003. Vol. 95. P. 1200–1206.
13. Cerning J., Boullianne C., Desmazeaud M. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus* // Biotechnol. Lett. 1986. Vol. 8. P. 625–628.
14. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72, № 1. P. 248–254.
15. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М. : Наука, 1985. 536 с.
16. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for Termination of sugars and related substances // Anal. Chem. 1956. Vol. 28, № 3. P. 350–356.
17. Gamar-Nourani L., Blondeau K., Simonet J.-M. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83 // J. Appl. Microbiol. 1997. Vol. 83. P. 281–287.
18. Yüksesdag Z. N., Aslim B. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. vulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22) // Braz. Arch. Biol. Technol. 2008. Vol. 51, № 3. P. 581–585.
19. Рысмухамбетова Г. Е., Карпунина Л. В., Бухарова Е. Н., Жемеричкин Д. А. Выделение и очистка экзополисахаридов из ксантомонад // Вестн. Саратов. гос. аграр. ун-та им. Н. И. Вавилова. 2008. № 4. С. 42–45.
20. Deveau H., Van Calsteren M., Moineau S. Effect of exopolysaccharides on phage-host interactions in *L. lactis* // J. Appl. and Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. P. 4364–4369.

### The Influence of Culture Conditions on Production of Exopolysaccharide of *Streptococcus Thermophilus*

N. A. Fokina, G. T. Uryadova, L. V. Karpunina

Nadezhda A. Fokina, ORCID 0000-0002-0911-0287, Saratov State Agrarian University, 220, B. Sadovaya Str., 410005, Saratov, Russia, fockina.nadejda@yandex.ru

Galina T. Uryadova, ORCID 0000-0002-3684-9028, Saratov State Agrarian University, 220, B. Sadovaya Str., 410005, Saratov, Russia, eni\_galina@mail.ru

Lidia V. Karpunina, ORCID 0000-0002-9985-9944, Saratov State Agrarian University, 220, B. Sadovaya Str., 410005, Saratov, Russia, karpuninal@mail.ru

Isolated exopolysaccharide *Streptococcus thermophilus*. The conditions for the cultivation of bacteria for the maximum yield of the exopolysaccharide were selected. The bacterial culture of *S. thermophilus* was incubated for 48 hours in a liquid nutrient medium A. Welman at 38 °C, 180 rpm. on a thermostated shaker-incubator. As a source of carbon were used: sucrose, lactose and glucose. For the production of exopolysaccharide, the best source of carbon was sucrose. Isolation of the exopolysaccharide was carried out according to the J. Cerning method in our modification. Purification of the isolated EPS from low molecular weight compounds was carried out by gel filtration on a column filled with Sephadex G-50. The exopolysaccharide of *S. thermophilus* did not contain protein, nucleic acids and producer cells. The presence of protein was determined by M. Bradford's method, the nucleic acid content on a spectrophotometer at 260 nm, the absence of bacteria in the preparation was monitored by microscopy using the Gram method. The influence of the time of cultivation of *S. thermophilus* on the production of exopolysaccharide was studied, the yield of which was determined by the phenol-sulfur method. It was shown that the maximum production of EPS coincided with the maximum growth of streptococcal culture and accounted for the stationary phase of growth. **Key words:** bacteria, *Streptococcus*, exopolysaccharide (EPS), isolation, purification.

**Acknowledgements:** The authors are grateful to the employee of LLC "VIC – Animal Health" to Sergey V. Semenov for the rendered help in carrying out gel filtration.

#### Образец для цитирования:

Фокина Н. А., Урядова Г. Т., Карпунина Л. В. Влияние условий культивирования на продукцию экзополисахарида *Streptococcus Thermophilus* // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 2. С. 179–181. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-2-179-181.

#### Cite this article as:

Fokina N. A., Uryadova G. T., Karpunina L. V. The Influence of Culture Conditions on Production of Exopolysaccharide of *Streptococcus Thermophilus*. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 2, pp. 179–181 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-2-179-181.