

А.И. Кулонов, базовый докторант

(Институт микробиологии АН РУз, г. Ташкент)

Ж. Гуломкодиров, студ.; И. Рихсибоев, студ.; А. Нуритдинов, студ.;

А. Комилов, студ.; Д. Т. Мирзарахметова, проф., д-р техн. наук  
(ТГТУ, г. Ташкент);

М. У. Мирзаулукова, преп. высшей категории  
(Академический лицей Ташкентского фармацевтического института, г. Ташкент)

## ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ

Галофильные почвенные микроорганизмы представляют собой группу микроорганизмов, которые могут расти в средах с высокой концентрацией соли [1]. Большинство галофилов встречаются в гиперсоленых водах, почвах, солевых и соленых отложениях [2]. Аэробные, анаэробные и факультативные микроорганизмы архей и бактерий соленых вод Мертвого моря, Средиземного моря, Большого Соленого озера (Юта, США), Антарктических озер, Магади и других регионов были изучены и разделены на группы в соответствии с их ростом и развитием в солевой среде [3]. Концентрация солей для слабых галофилов составляет 2-5%, 5-20% для средних галофилов и 20-30% для сильных галофилов [4-5]. Эти бактерии продолжают свою деятельность с помощью систем переноса протонов в цитоплазматической мембране (АТФ и замена натрия протонным насосом) [6-7].

Целью данной работы являлась разработка технологии получения полисахаридов *Halovibrio variabilis*. Поставленная задача решается применением в качестве продуцента полисахарида штамма бактерий *Halovibrio variabilis* UzAS3. Указанный штамм депонирован во Коллекции микроорганизмов Института микробиологии АН РУз.

Объектом исследования служили бактерии *Halovibrio variabilis* UzAS3, выделенные в 2019 году из гиперсоленых водоемов Республики Каракалпакстан: озёро около Кунграда [8]. Пробы воды отбирали из дна высыхающего озера (глубина 10–20 см) в месяце май 2019 г. и собирали в стерильные пластиковые контейнеры. Соленость образцов определяли на рефрактометре MASTER-S28a (ATOGO, Япония). Для культивирования галофильных бактерий использовали жидкую среду следующего состава (г/л): NaCl – 156,0; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 13,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 20,0; CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O – 1,0; KCl – 4,0; NaHCO<sub>3</sub> – 0,2; NaBr – 0,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,5; NH<sub>4</sub>Cl – 2,0; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O – 0,005; глюкоза – 10,0; дрожжевой экстракт – 10,0 (рН 7,2).

Культивирование бактерий в периодическом процессе проводили в термостате (Mettler, Германия) в колбах Эрленмейера объемом 1 л, содержащих 500 мл питательной среды с барботированием воздуха (аэрация, 100%) и подсветкой белым светом периодичностью 14 часов подсветки и 10 часов темной фазы при 35-37°C при соотношении питательной среды и инокулята (титр  $10^8$  клеток в 1 мл) 100 : 1 [9]. Для подсчета титра клеток использовали камеру Тома-Горяева (МиниМед, Россия) [10].

Для изолированной культуры бактерии описывали морфологию колоний, осуществляли окрашивание по Граму согласно процедуре [11], тесты с гидроксидом калия [12], окрашивание спор в соответствии с [13]. Исследование проводилось на лабораторном микроскопе DM1000 (Leica, Германия) для определения подвижности, формы и размера клеток на разных стадиях роста в жидкой и твердой питательной среде [10, 14].

Для отнесения галофильных микроорганизмов к одной из четырех групп изоляты тестировали на способность к росту на плотной среде с различным содержанием NaCl (0.5, 10, 15 и 25%) [14].

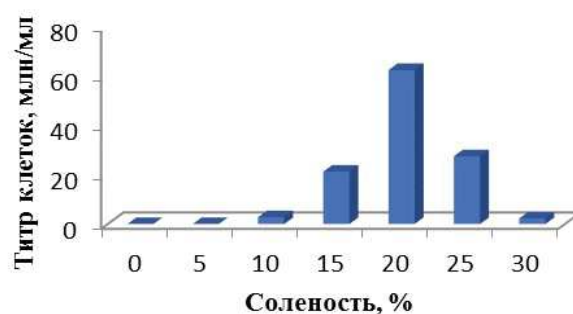
Из жидкой культуры на стационарной фазе роста клетки осаждали центрифугированием (РС-6, Россия) при 4400 об/мин в течение 20 мин, супернатант диализовали в течение 24 ч против дистиллированной воды через мембрану с пределом исключения 12-14 кДа (Scienova GmbH, Германия). Из диализата культуральной жидкости полисахариды осаждали 1,5 объемами охлажденного 96% этанола (4°C, 12 ч), отделяли осадок (полисахариды), промывали дважды по 200 мл этанолом (96 %) и сушили при 25 °С.

Количество углеводов определяли методом [15]. Получили 5 г (1 %) сухих бактериальных полисахаридов [8].

Образцы гиперсолёных вод и кристаллов солей высевали в питательную среду с концентрацией NaCl от 5 до 30 %).

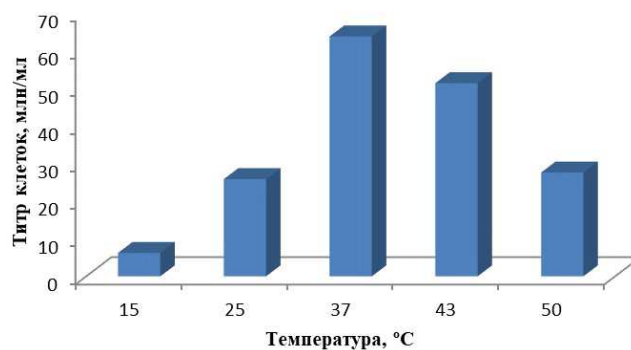
Различные образцы были отобраны на основе формы, розово-красного цвета бактерий, образованию отдельных колоний в питательных средах.

Рост изолированных бактериальных колоний в питательной среде с высокой концентрацией соли (20–25 %) указывает на то, что выделенные бактерии являются галофильными (рисунок 1).



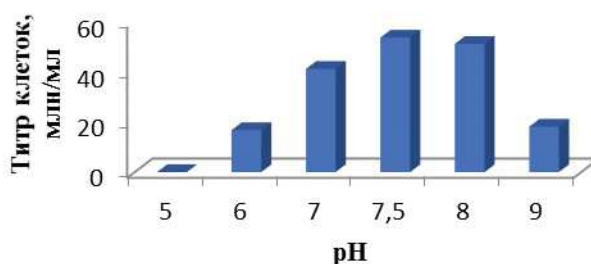
**Рисунок 1 - Зависимость титра клеток от солености питательной среды**

Оптимальную температуру для культивирования бактерий определяли, выращивая бактерии в средах при температурах от 15 до 50°C (рисунок 2). Оптимальной температурой для культивирования бактерий является 37°C.



**Рисунок 2 – Зависимость титра клеток от температуры среды**

pH среды также является важным показателем, т. к. он показывает уровень закисленности среды метаболитами и является критерием, влияющим на выход полисахаридов в культуральную среду (рис. 3) [16-17]. Оптимальный pH для культивирования бактерии определяли на pH-метре (Mettler-Toledo, Китай), выращивая бактерии в твердых питательных средах в исходными pH от 5,1 до 9,0. Оптимальным pH для бактерий было 7,5.



**Рисунок 3 – Зависимость титра клеток от pH среды**

Далее изучали титр клеток бактерий во времени при вышеуказанных оптимальных условиях в течение 13 суток (рис. 4). На 10 сутки бактерии переходят на стационарную фазу и в этот период наблюдается выход полисахаридов.

Для выделения экзополисахаридов, образованных в культивируемой среде использовали 96% этанол. Для этого 100 мл культивируемой жидкости центрифугировали (РС-6, Россия) при 8000 об/мин в течение 20 минут. Полученный супернатант помещали в целлюлозный диализный мешок Zellu Trans Dialysis Tube T4 (Scienova GmbH, Германия) и диализовали при 4°C в течение 24 часов против 2,5 литров дистиллированной воды (воду меняли дважды). Далее диализат смешивали с охлажденным этанолом в соотношении 1,0:1,5 и выдерживали в течение 6 часов при температуре 4°C для образования плотного осадка. Осадок экзополисахаридов отделяли от надосадочной жидкости фильтрованием и промывали дважды этанолом в соотношении 1:2 в течение 30 мин. Полученные полисахариды сушили при 25°C в течение 24 часов в сушильном шкафу (Memmert, Германия).

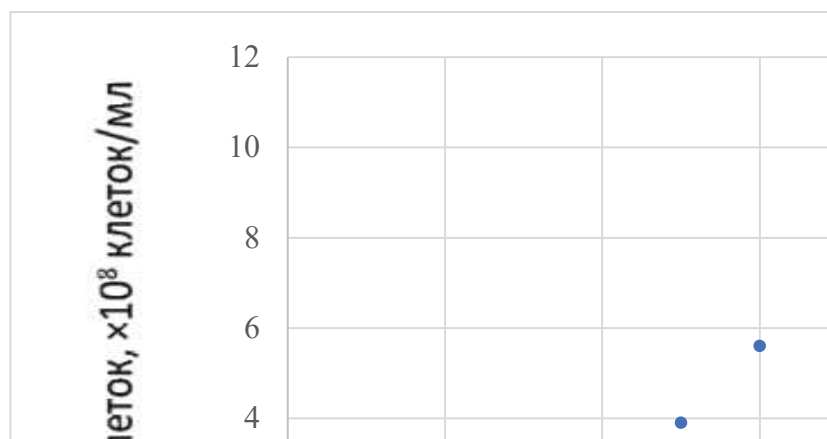


Рисунок 4 – Зависимость титра клеток от длительности культивирования бактерий

Полученные результаты показывают, что бактерии обладают высоким потенциалом по выходу бактериальных экзополисахаридов (7,1-9,5 мг/мл) по сравнению с результатами, представленными в литературе (3 мг/мл) [17]. В нашей работе, лимитирующими факторами являются количество глюкозы и рН среды. Полученные результаты показывают, что бактерии обладают высоким потенциалом по выходу бактериальных полисахаридов (10 мг/мл). Поддержание в среде культивирования концентрации питательных веществ и солей, температуры 37°C, а также 100% насыщение воздухом питательной среды в процессе культивирования создает оптимальные условия для роста бактерий, а управление таких параметров, как количество глюкозы

(1%) и pH 7,5 дает возможность повысить титр бактерий и увеличить выход полисахаридов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. DasSarma S., Arora P. *Halophiles*. In: Encyclopaedia of lifescience. Nature Publishing Group, London, 2001, pp. 1-9.
2. Oren A. *Halophilic microorganisms and their environments*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, USA, 2002, pp. 1-19.
3. Oren A., Rodriguez-Valera F. The contribution of halophilic bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol.*, 2001, vol. 36, no. 2-3, pp. 123-130.
4. Zanjirband M, Kermanshahi K R, and Golbang N. Isolation of the Moderately Halophilic Bacteria and Effects of pH and Incubation on Their Growth. *Journal of Taxonomy and Biosistematics*, 2009, vol. 1, pp. 21-32.
5. Horikoshi K. *Alkaliphiles*. Kodansha, Hardwood Academy Publisher. Germany: Springer, 1999.
6. Hamdy A. H., Asmaa A. A., and Mohamed E. E. Cloning and expression of gene encoding meta-cleavage enzyme of BTEX degradation pathway from haloalkaliphilic *Pseudomonas* sp. HA10. *Life Science Journal*, 2014, vol. 11, pp. 403-11.
7. Feng J. P., Zhou Y., Zhou S., et al. *Halorubrum alkaliphilum* sp. nov., a novel haloalkaliphile isolated from a soda lake in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 2005, vol. 55, pp. 149-52. doi: 10.1099/ij.s.0.63320-0
8. Kulonov A. I. e. a. Shtamm bakterii *Halovibrio variabilis* UzAS3 - produtsent polisaxharidov [*Halovibrio variabilis* UzAS3 bacterial strain - producer of polysaccharides]. Patent RUz, no. FAP 20200269, 2020.
9. Kulonov A. I., Mirzarakhmetova D. T. O'zbekistondagi sho'rlangan xududlarida tarqalgan galofil bakteriyalar ekologiyasi va ularning ekzopolisaxaridlari hosil kilish potentsiali. *Scientific Acta of Namangan State University*, 2019, no. 10, pp. 143-149.
10. Netrusov A.I., Kotova I.B. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Moscow, Academia, 2006, pp. 252.
11. Dussault H. P. An improved technique for staining halophilic bacteria. *J. Bacteriol.*, 1955, vol. 70, pp. 484-485. doi: 10.1128/JB.70.4.484-485.1955
12. Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R. Methods for general and molecular bacteriology. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., 1994, pp. 607-654. doi:10.1002/food.19960400226

13. Oktari A., Supriatin Y., Kamal M., Syafrullah H. The Bacterial Endospore Stain on Schaeffer Fulton using methylene Blue Solution. *Journal of Physics*, 2017, Conf. Ser. 812. pp. 1-5. doi:10.1088/1742-6596/812/1/012066

14. Schneegurt, M. A. Media and conditions for the growth of halophilic and halotolerant bacteria and archaea. *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms* (Dordrecht: Springer), 2012, pp. 35–58. doi:10.1007/978-94-007-5539-0\_2

15. DuBois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 1956, vol. 28, pp. 350–356. doi:10.1021/ac60111a017

16. Rodriguez-Valera, F., Lillo, J. G. Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol Lett.*, 1992, vol. 103, pp. 181-186. doi:10.1016/0378-1097(92)90308-B

17. Rodriguez-Valera F., Lillo J. G. *Halobacteria* as Producers of Poly- $\beta$ -Hydroxyalkanoates. eds. Dawes E.A. Novel Biodegradable Microbial Polymers. *Kluwer Dordrecht*, 1990, vol. 186, pp. 425–426.

УДК 663.126

С. Ш. Қосимходжаев, инспектор  
(Агентство по регулированию алкогольного и табачного рынка и развитию  
виноделия Республики Узбекистан, г. Ташкент)  
Д. Т. Мирзарахметова, проф., д-р техн. наук (ТГТУ, г. Ташкент)

### **ВЛИЯНИЕ НИЗКОЧАСТОТНЫХ ВОЛН НА РОСТ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ И ВЫХОД ЭТАНОЛА**

Дегустационные показатели темного пива получаются недостаточно высокими: интенсивность цвета зачастую напрямую связана с повышенной горечью. Поэтому, в настоящее время совершенствование биотехнологии получения темного сортового пива с невысокой горечью очень актуальна.

Было исследовано влияние электромагнитного поля на метаболизм дрожжей и показано положительное его влияние на рост клеточной массы [1] и выход этанола [2]. Однако, полученные данные не решили одну из основных проблем спиртовой промышленности, решением которой является поиск путей интенсификации технологического процесса. Поэтому, процесс брожения был оптимизирован обработкой бродящей среды импульсным электромагнитным полем. В работе были использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Брожение проводили при обработке бродящей среды низкочастотными электромагнитными волнами (НЧВ) частотой 4 Гц и мощностью