

Ing. VÁCLAV KLEKNER, CSc., RNDr. EVA ŠÍMOVÁ, RNDr. JAN ŘIČICA, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

**Klíčová slova:** *Agrobacterium*, extracelulární polysacharidy, heteropolysacharidy, míchání, newtonské médium, sukcinoglykan, reologie, viskozita

Řada bakterií tvoří při přebytku utilizovatelného uhlíkatého substrátu extracelulární polysacharidy. Jejich chemická struktura a jí odpovídající fyzikálně chemické i biologické vlastnosti jsou velmi rozmanité. Tento referát se zabývá některými otázkami kultivační přípravy bakteriálních heteropolysacharidů, přičemž řada problémů se zdá být obdobná u různých mikroorganismů. V naší laboratoři se konkrétně zabýváme otázkami přípravy a vlastnostmi sukcinoglykanu produkovaného kmenem *Agrobacterium radiobacter* CCM 2704.

Tvorba většiny bakteriálních extracelulárních heteropolysacharidů probíhá tak jako u lipopolysacharidů a glykoproteinů z glykosylfosfátů přes glykosyl nukleotidy a oligosacharidy navázané na isoprenoidní alkohol ke konečné molekule [1]. Isoprenoidní alkohol zřejmě slouží pro transport oligosacharidů nepolární buněčnou membránou [2]. Systém polymeráz tvořící makromolekuly polysacharidů je pravděpodobně součástí buněčné membrány [3]. Většina bakteriálních heteropolysacharidů je složena z tzv. opakovaných jednotek, které obsahují 2–8 monosacharidových stavebních částí a popř. necukerné složky. Způsob připojení necukerných komponentů vyskytujících se v bakteriálních exopolysacharidech není dosud znám. Nejdelší opakovaná jednotka byla dosud identifikována u některých půdních bakterií a také u *Agrobacterium radiobacter* [4]. Obsahuje okolo 10 %

kyseliny jantarové a pyrohroznové, D-glukosu a D-galaktosu v molárním poměru 7 : 1 a polymer z ní složený se obvykle nazývá sukcinoglykan.

Fyziologické chování bakterií při kultivacích je vyjádřením genové informace v daných konkrétních podmínkách. Tedy i tvorba bakteriálních heteropolysacharidů je závislá jak na genovém vybavení bakterie, tak i na faktorech prostředí, v němž se bakterie nacházejí. Genetický základ syntézy exopolysacharidů však dosud nebyl šířeji zkoumán. U kmenů, které tvoří zajímavé makromolekuly ve větších kvantech, se převážně studoval vliv kultivačních podmínek na produkci polymeru. Tabulka 1 uvádí přehled některých bakterií, u nichž byly šířeji zkoumány kultivační podmínky pro přípravu heteropolysacharidů. Většina sledování se prováděla při jednorázové kultivaci, jež se pro produkci extracelulárních polysacharidů zdá být výhodnější, a to hlavně proto, že v kontinuální kultivaci se selektují neproduktivní mutanty [5, 6]. Teplota vhodná pro tvorbu exopolysacharidu je většinou blízko teplotě optimální pro růst bakterie. Na tvorbu exopolysacharidu má velký vliv hodnota pH kultivačního média, optimum je většinou blízko pH 7. U slabě pufrovaných médií má rozhodující vliv pH média na počátku kultivace [7, 8, 9]. U *Agrobacterium radiobacter* se ukázal jako nejlepší pufrací prostředek uhlíčan vápenatý [10], přičemž záleží na jeho kvalitě [11].

Tabulka 1. Přehled některých bakterií, u nichž byly studovány podmínky submerzní kultivace pro přípravu extracelulárních heteropolysacharidů

Mikroorganismus	Stavební jednotky polysacharidu	Typ kultivace	Odkaz
<i>Xanthomonas campestris</i>	D-glukosa, D-mannosa, k. D-glukuronová a k. pyrohroznová (xanthan)	jednorázová	J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 3, 51, 1961 Biotechnol. Bioeng. 7, 161, 1965; 8, 511, 1966; 13, 381, 1971; 15, 225, 1973 Z. Allg. Mikrobiol. 17, 339, 1977; 20, 209, 1980 Biotechnol. Bioeng. 12, 75, 1970; 14, 23, 1972
<i>Azotobacter vinelandii</i>	D-mannuronová a L-gulonová kys. (alginát)	jednorázová	Biotechnol. Bioeng. 22, 2321, 1980
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—, —	kontinuální	J. Gen. Microbiol. 107, 59, 1978
<i>Arthrobacter viscosus</i>	D-glukosa, D-galaktosa, k. D-mannuronová a octová	jednorázová	J. Bacteriol. 118, 915, 1973 J. Bacteriol. 134, 418, 1978
<i>Arthrobacter stabilis</i>	D-glukosa, D-galaktosa, k. jantarová, pyrohroznová a octová	jednorázová	Appl. Microbiol. 11, 488, 1963 J. Bacteriol. 90, 147, 1965
<i>Erwinia tahitica</i>	D-glukosa, D-galaktosa, L-fukosa, k. uronová a octová	jednorázová	J. Appl. Polym. Sci. 9, 627, 1965 U. S. Patent 3, 632, 570
<i>Pseudomonas PB1</i>	D-glukosa, D-galaktosa, k. pyrohroznová a octová	jednorázová	U. S. Patent 3, 933, 788
<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i>	D-glukosa, D-galaktosa, k. jantarová a pyrohroznová (sukcinoglykan)	jednorázová	J. Appl. Chem. Biotechnol. 26, 326, 1976 J. Gen. Microbiol. 102, 13, 1977 J. Gen. Microbiol. 104, 47, 1978
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	—, —	kontinuální	J. Ferment. Technol. 49, 559, 1971
		jednorázová	Agric. Biol. Chem. 41, 1847, 1977



Zdrojem uhlíku a dusíku mohou být nejrůznější sloučeniny. Jako definované zdroje uhlíku je možno použít podle rodu bakterie hexosy, pentosy, některé organické kyseliny, řadu alkoholů a také alifatické uhlovodíky [12]. Na necukerných substrátech jsou však výsledky většinou malé, např. sukcinoglykan z ethanolu [13]. V případě cukrů se počáteční koncentrace pohybují mezi 2–5 % v závislosti na typu zdroje a délce kultivace, výtežky exopolysacharidu pak jsou 40–70 %. Koncentrace dusíkatého zdroje se většinou pohybují v takovém rozmezí, aby se dusíkatý substrát stal pro růst limitujícím faktorem.

Důležitá je otázka vedení míchání během kultivace, které zajišťuje homogenizaci vsádky a přestup kyslíku z plynné do kapalně fáze. Produkovaný exopolysacharid totiž mění reologické vlastnosti média během kultivace a významně ovlivňuje hydrodynamické pochody uvnitř fermentoru. Charakterizujeme-li reologické chování roztoků bakteriálních polysacharidů, a tedy i kultivačního média, jsou tyto roztoky pseudoplastické nebo mírně viskoelastické [14]. Nejčastěji používaná viskozitní funkce pro popis vlastností takového média je mocninová formule  $\tau = K\dot{\gamma}^n$ , kterou lze použít i pro roztoky sukcinoglykanu. Zde  $K$  se obvykle nazývá konstanta konzistence a  $n$  index toku kapaliny,  $\tau$  je tečné napětí a  $\dot{\gamma}$  je střižná rychlost. Při kultivacích může nastat situace, kdy se kapalina u stěny nádoby právě přestává pohybovat, tj. jde o práh míchání. Pro pseudoplastické kapaliny s  $n \rightarrow 0$  lze pak odvodit, že velikost míchané zóny je dána vztahem  $d_c/d_m = C Re_m^{0,5}$  ( $d_c$  je charakteristický rozměr míchané zóny, pro pseudoplastickou kapalinu je Reynoldsovo číslo  $= N^2 - n d_{mp}/K$ ;  $N$  je frekvence otáčení míchadla,  $d_m$  je průměr míchadla a  $\rho$  je měrná hmotnost kapaliny). Experimentálně byly nalezeny hodnoty parametru  $C$  0,6 pro axiální míchadla a 0,3 pro míchadla radiální [15]. Navíc vzdušněním média hodnota parametru  $C$  klesá [11].

Míchání zajišťuje kromě homogenizace vsádky také přestup kyslíku z plynné do kapalně fáze. V míchaném tanku nastává první distribuce plynu na lopatkách míchadla, na jejichž koncích se tvoří víry plynu a kapaliny. Za lopatkou pak tyto víry přecházejí do mikroturbulence, kde se disipuje nejvíce energie a nejvíce se disperguje plyn do kapaliny. Při velké viskozitě kapaliny velké bubliny dále od míchadla rychle koaleskují a opouštějí kapalinu, malé naopak vůbec nestoupají a zůstávají v kapalině po dlouhou dobu [16]. Celkově objemový koeficient přestupu hmoty  $K_{La}$  klesá se stoupající viskozitou roztoku, avšak různými pracovníky byl zjištěn značný rozdílný vliv reologických vlastností kapaliny. Celkově lze říci, že velká míchadla budou promíchávat celý objem kapaliny, avšak budou poskytovat malý přestup hmoty. Naproti tomu při stejném příkonu bude malé míchadlo vytvářet dobré podmínky pro vznik malých bublin plynu v oblasti míchadla, ale nebude dostatečně promíchávat kapalinu.

Na základě výše načrtnutých úvah, popřípadě zabudovaných do matematického popisu kultivace [11], je možné navrhnout řízení míchání a vzdušnění během kultivace nebo posuzovat vhodnost daného zařízení pro přípravu extracelulárních bakteriálních heteropolysacharidů.

Lektoroval dr V. Jirků, CSc.

## Literatura

- [1] SUTHERLAND, I. W.: Adv. Microbial Physiol. **8**, 1972, s. 143.
- [2] LENNARZ, N. J.: Science **188**, 1975, s. 986.
- [3] MARKOWITZ, A., DORFMAN, A.: J. Biol. Chem. **237**, 1962, s. 273.

- [4] HISAMATSU, M., SANO, K., AMEMURA, A., HARADA, T.: Carbohydr. Res. **61**, 1978, s. 89.
- [5] SILMAN R. W., ROGOVIN, P.: Biotechnol. Bioeng. **14**, 1972, s. 23.
- [6] MIAN, F. A., JARMAN, T. R., RIGHELATO, R. C.: J. Bacteriol. **134**, 1978, s. 418.
- [7] ROGOVIN, S. P., ANDERSON, R. F., CADMUS, M. C.: J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. **3**, 1961, s. 51.
- [8] CADMUS, M. C., GASDORF, H., LAGODA, A. A., ANDERSON, R. F., JACKSON, R. W.: Appl. Microbiol. **11**, 1963, s. 488.
- [9] WILLIAMS, A. G., WIMPENNY, J. W. T.: J. Gen. Microbiol. **102**, 1977, s. 13.
- [10] NAGAHAMA, T., FUJIMOTO, S., KANIE, M.: Agric. Biol. Chem. **41**, 1977, s. 1847.
- [11] KLEKNER, V.: Kandidátská disertační práce, MBÚ ČSAV Praha 1984.
- [12] SLODSKI, M. E., CADMUS, M. C.: Adv. Appl. Microbiol. **23**, 1978, s. 19.
- [13] KLEKNER, V., ŠIMOVÁ, E., ŘIČICA, J., PANOŠ, J.: Folia Microbiol. **29**, 1984, s. 138.
- [14] JEANES, A., PITTSLEY, J. E.: J. Appl. Polym. Sci. **17**, 1973, s. 1821.
- [15] WICHTERLE, K., WEIN, O.: Internatl. Chem. Eng. **21**, 1981, s. 116.
- [16] SCHÜGERL, K.: Adv. Biochem. Eng. **19**, 1981, s. 72.

**Klekner, V. - Šimová, E. - Řičica, J.: Bakteriální extracelulární heteropolysacharidy.** Kvas. prům., **32**, 1986, č. 6, s. 138–139.

V článku jsou diskutovány kultivační podmínky pro submerzní produkci extracelulárních bakteriálních heteropolysacharidů. Krátce naznačen je rovněž možný přístup k problémům plynoucím z proměnlivých reologických vlastností neneutonského média, které jsou dány tvořením polysacharidem a které podstatně ovlivňují transportní pochody uvnitř fermentoru.

**Клекнер, В., Шимова, Е., Ржицица, Я.: Бактериальные внеклеточные гетерополисахариды.** Квас. прум. **32**, 1986, № 6, стр. 138–139.

V статье обсуждаются условия культивирования для глубинного производства внеклеточных бактериальных гетерополисахаридов. Коротко также указан подход к проблемам, вытекающим из непостоянных реологических свойств не-ньютоновской среды, которые даны образующимся полисахаридом и которые имеют существенное влияние на транспортные процессы внутри ферментера.

**Klekner, V. - Šimová, E. - Řičica, J.: Bacterial Extracellular Heteropolysaccharides.** Kvas. prům. **32**, 1986, No. 6, pp. 138–139.

The article deals with cultivation conditions for submerged production of extracellular bacterial heteropolysaccharides. There is also a short outline of a possible approach to problems ensuing from changeable rheological properties of the non-Newton medium, which are given by the forming polysaccharide and which substantially influence the transport processes in the fermentor.

**Klekner, V. - Šimová, E. - Řičica, J.: Extrazelluläre Bakterienheteropolysaccharide.** Kvas. prům. **32**, 1986, Nr. 6 S. 138–139.

Im Artikel sind die Kultivationsbedingungen für die Submersproduktion der bakteriellen Heteropolysaccharide diskutiert. Der mögliche Zutritt zu den aus veränderlichen rheologischen Eigenschaften des nichtnewtonischen Mediums hervorgehenden Problemen, die durch das sich bildende Polysaccharid gegeben sind und die auch wesentlich die Transportvorgänge im Fermentor beeinflussen, ist kurz angedeutet.