

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ “СТЕФАН АНГЕЛОВ”

София 1113, ул. “Акад. Георги Бончев” Бл. 26

инж. Надя Стойчева Радченкова

**Продукция и характеристика на екзополизахарид(и),
синтезиран(и) от термофилен щам *Aeribacillus pallidus* 418**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”
професионално направление „Биологически науки”, шифър 4.3.
(научна специалност “Микробиология”, шифър 01.06.12)

Научен ръководител: доц. д-р Маргарита Камбурова, дбн

София, 2014

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ “СТЕФАН АНГЕЛОВ”

София 1113, ул. “Акад. Георги Бончев” Бл. 26

инж. Надя Стойчева Радченкова

**Продукция и характеристика на екзополизахарид(и),
синтезиран(и) от термофилен щам *Aeribacillus pallidus* 418**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”
професионално направление „Биологически науки” с шифър 4.3.
 (“Микробиология” - 01.06.12)

Научен ръководител: доц. дбн Маргарита Камбурова

Официални рецензенти:
проф. дтн Венко Бешков
доц. д-р Златка Алексиева

Становища:
проф. дбн Яна Топалова
доц. д-р Вяра Иванова
доц. дбн Маргарита Камбурова

София, 2014

Дисертационният труд съдържа 146 страници, онагледен е с 49 фигури и 23 таблици.
Библиографската справка включва 258 заглавия на латиница.

Изследванията, свързани с дисертационния труд, са проведени в Лаборатория по Екстремофилни бактерии, Институт по микробиология „Стефан Ангелов”, БАН. Част от изследванията са извършени в Университет по хранителни технологии-Пловдив и козметична фирма “Боди-Д”.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на разширено заседание на научния семинар по “Обща микробиология” на 12.12.2013 г. в Институт по микробиология на БАН, ул. „Акад. Г. Бончев”, бл. 26, София.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2014 г. от часа в залата на Институт по микробиология, БАН, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл. 26, София.

Материалите по защитата са на разположение в кабинета на научния секретар на Институт по микробиология “Стефан Ангелов”, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл. 26, София.

Използвани съкращения

- Aga - арабиноза
- Fuc - фукоза
- Gal - галактоза
- GC – газхроматограма
- GC-MS – газ- хроматография мас-спектрометрия
- GDP - гуанозин дифосфат
- Glc - глюкоза
- GlcA - глюкоренова киселина
- kDa – килодалтони
- $K_L a$ - обменен коефициент на масопренасяне
- μ - специфична скорост на растеж
- Man – маноза
- NDP - нуклеозид дифосфат
- NMP - нуклеозид монофосфат
- NMR – ядрено магнитен резонанс
- OD₆₆₀ – оптическа плътност, измервана при 660 nm
- OTR (oxygen transfer rate)- скорост на пренос на кислорода
- OUR (oxygen uptake rate) - скорост на поглъщане на кислорода
- PCR – полимеразна верижна реакция
- PY – среда, съдържаща пептон и дрождев екстракт
- Raf - рафиноза
- Rha – рамноза
- rpm – об/минута
- TDP - тирозин дифосфат
- UDP - уридин дифосфат
- vvm – обем/обем/минута
- Xyl - ксилоза
- YE – дрождев екстракт
- ЕПЗ - екзополисахарид
- МСС – минимална солева среда
- ПЗ – полизахарид

1. Увод

Ограниченият обем растителни полизахариди е проблем на съвременното общество, който налага търсенето на възможности за подмяната им с микробни полизахариди. Микробните полизахариди са бързо възобновяема суровина за редица производства. Те могат да бъдат произведени от евтини материали или отпадни продукти от някои производства. За разлика от растителните полимери, те са хетерополимери с разнообразен състав и структура, определящи и разнообразните им свойства. Използват се отскоро в биотехнологията, но някои от тях вече са намерили широко приложение като стабилизатори, емулгатори, желиращи агенти и уплътнители в редица промишлености като хранително-вкусовата, козметичната, фармацевтичната. Нови направления в експлоатирането на екзоползахаридите (ЕПЗ) са в областта на медицината, основано на тяхната имуномодулираща и антитуморна активност, производството на превързочни материали, в аудио-мембрани.

Въпреки че все още представляват само малка част от глобалния въглехидратен пазар, броят на техните приложения ежегодно осезаемо нараства. Много от мезофилните продуценти на интересни полизахариди са патогени. Нуждата от биополимери, които да запазват свойствата си при суровите индустриални условия, фокусира научният интерес към идентификацията на екзоползахариди от екстремофили. Продукцията на екзоползахариди от термофили се характеризира с: кратки ферментационни процеси, което се дължи на високите растежни скорости на термофилите; понижен вискозитет при високата температура, което улеснява масообмена и аерацията; намален риск от микробно замърсяване; повишена разтворимост на субстратите; термостабилност на полизахаридната молекула; термофилните микроорганизми са непатогенни и техните продукти са подходящи за използване в хранителната промишленост. Изброените предимства определиха нашия интерес към изолирането на термофилни ЕПЗ продуценти от български горещи извори, развитието на ефективни ферментационни процеси с тяхното използване, пречистване и характеризиране свойствата на синтезираните ЕПЗ.

2. Цел и задачи:

Основна цел на настоящия дисертационен труд е изолирането от български горещ извор на перспективен термофилен продуцент на ЕПЗ, определянето и оптимизирането на хранителната среда и физико-химичните условия за полимерна синтеза, характеризирането на свойствата на новосинтезирания полимер.

За осъществяването на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Изолиране на термофилни бактериални продуценти на ЕПЗ от почвени и водни проби, събрани от горещи извори в района на София, Южна и Югозападна България.
2. Скрининг за добър ЕПЗ продуцент.
3. Филогенетично, морфологично и физиологично характеризиране на избрания щам-продуцент.
4. Оптимизиране състава на хранителната среда.
5. Определяне на оптималните рН и температура за растеж и продукция на ЕПЗ.
6. Определяне влиянието на аерацията и масообмена в лабораторни ферментори. Определяне на кинетичните параметри на периодичния процес.
7. Продукция на ЕПЗ в условия на непрекъснати култури.
8. Пречистване на новоизолирания полимер.
9. Характеризиране на монозахаридния състав на синтезирания (синтезираните) ЕПЗ. Определяне на неговите (техните) физико-химични свойства.
10. Функционални свойства на синтезирания полизахарид.
11. Определяне на синергичния ефект между новосинтезирания ЕПЗ и други използвани в козметиката полизахариди.
12. Проучване ефекта от включване на проучвания полизахарид в състава на козметичен крем.

3. Материали и методи

3.1. Основни хранителни среди, разтвори, буфери.

3.2. Методи

3.3. Събиране и обработване на проби от геотермални извори в района на София, Югозападна и Южна България.

Бяха събрани проби от горещи извори в района на София, Югозападна и Южна България. Пробите бяха използвани като инокулум (2%) за набогатяване на присъстващите в пробите микроорганизми в течна минимална среда със захароза като единствен въглероден източник (0.6%), рН на средата 7.2. Растежът на смесените култури и ЕПЗ продукция бяха определяни до 42-ия час на култивиране при 55°C. За изолиране на чисти щамове културите бяха разсяти върху твърда среда.

3.4. Скрининг за изолиране на термофилни бактериални продуценти на ЕПЗ

Петриевите панички бяха инкубирани за 24 часа на 55°C. След поне трикратно разсяване и микроскопски наблюдения, бяха получени чисти култури. Колониите с мукоидна консистенция бяха посяти в течна среда. След култивиране на чистите щамове в минималната среда със захароза като единствен въглероден източник, бяха избрани 12, показали продукция повече от 20 µg/ml.

3.5. Методи за фенотипно характеризиране на избрания термофилен продуцент

Морфологични свойства

Физиологична характеристика на изолатите

Определяне на абсолютно сухо вещество (АСВ)

3.6. Оптимизиране на хранителната среда

Влиянието на въглеродния източник върху екзополизахаридната продукция беше проучено в минимална среда, към която бяха добавени по 0.6% от различни захари (малтоза, арабиноза, глюкоза, галактоза, захароза, ксилоза, лактоза, рибоза, рамноза, рафиноза, трехалоза, фруктоза). Оптималната концентрация на избрания въглероден източник беше определена чрез вариране на концентрацията му от 0.05 до 1.2%.

Беше изпитано влиянието на седем азотни източника върху полимерната синтеза: NH_4Cl , NH_4NO_3 , KNO_3 , NaNO_3 , уреа, дрождев екстракт и пептон.

3.7. Ферментационни процеси

Периодично култивиране в колби

Периодичното култивиране в колби беше провеждано в 20 ml среда в колби от 100 ml на клатачка при 120, 240 и 360 rpm.

Периодично култивиране във ферментори с работен обем 1 l и 2.5 l

Двата използвани ферментора бяха „АК 3-1” с общ обем 3.0 l, работен обем 1.0 l и „LF-2” с общ обем 5 l, работен обем 2.5 l. Те бяха с механично разбъркване с бъркачка от типа хидрообтекаема, даваща радиално-осев поток, означена като NS (Нарцис).

Култивирането беше проведено при оптималната за щама температура 55°C и pH 7.0. За проучване влиянието на разбъркването върху ЕПЗ продукция в лабораторен ферментор АК 3-1 периодичните процеси бяха проведени при скорост на въздушния поток 0.8 vvm и следните скорости на разбъркване: 100, 400, 500, 600 и 800 rpm. За проучване влиянието на аерацията върху ЕПЗ продукция ферментациите бяха проведени при разбъркване 600 rpm и следните скорости на въздушния поток: 0.8, 1.2, 1.6 и 2 vvm. Влиянието на разбъркването върху растежа на щама и ЕПЗ продукция беше проучено в лабораторен ферментор LF-2 при скорост на въздушния поток 0.5 vvm и скорост на разбъркване 100, 200, 600, 900 или 1100 rpm. Влиянието на аерацията беше изследвано при разбъркване 900 rpm и скорост на аериране 0.25, 0.5, 1.0 и 1.5 vvm.

Непрекъснато култивиране

Непрекъснатото култивиране беше проведено във ферментор АК 3-1. Влиянието на скоростта на разреждане (D , h^{-1}) върху растежа на щама и неговата екзополизахаридна синтеза беше проучено в оптималната среда, температура, pH, скорост на разбъркване и на въздушния поток. Скоростите на разреждане бяха варирани при следните параметри на разбъркване и аерация: скорости на разреждане 0.06, 0.1 и 0.2 при 600 rpm и 1.6 vvm; скорост на разреждане 0.1 при 600 rpm и 2 vvm; скорост на разреждане 0.1 при 800 rpm и 1.6 vvm.

Определяне на k_{La} , OTR и OUR

Измерванията на скоростите на поглъщане и пренос на кислорода, както и изчисленията на коефициентите на масопренасяне във ферментационната среда бяха проведени по време на логаритмичната и стационарната фаза от развитието на културата в лабораторен ферментор LF-2 с работен обем 2.5 l. k_{La} беше определен чрез динамичен метод.

3.8. Изолитране и пречистване на екзополитзахаридите

Биомасата беше отделяна от културалната течност чрез центрофугитране. Екзополитзахаридите се утаяваха с етанол. Образуваните утайки се промиваха с етанол и се центрофугираха. Получените утайки се разтваряха във вода и се определяше количеството на продуцирания екзополитзахарид.

Пречистването на синтезирания ЕПЗ беше извършено посредством анионо обменна и гел хроматография. Фракциите бяха събирани и анализирани за съдържание на ЕПЗ, ДНК и белтък. Пречистените ЕПЗ фракции бяха диализирани, след което бяха тествани за ЕПЗ, белтък и ДНК. Така обработените проби бяха лиофилизирани.

3.9. Аналитични методи

Определяне на въглехидратно съдържание

Методи за определяне на белтък и ДНК

Физико-химично характеризирание на ЕПЗ

Определяне на молекулното тегло

Тънкослойна хроматография

Газ-хроматографски анализ

Термогравиметричен и диференциално термичен анализ

Реологични характеристики на ЕПЗ

Емулсионни характеристики на полимера

*Определяне на синергичното взаимодействие на ЕПЗ от *A. pallidus* 418 с други политзахариди*

*Изследване на повърхностната активност и пенообразуващата способност на кремове с използване на ЕПЗ от *A. pallidus* 418*

4. Резултати и обсъждане

4.1. Събиране на проби от районите на Софийска област, Южна и Югозападна България.

От водата, седимента и тинята на 17 термални извора бяха събрани 38 проби. Температурата на водите в момента на взимане на пробите варираше от 40°C до 85°C, рН от 7.0 до 9.2.

4.2. Изолиране на термофилни бактериални продуценти на екзополизахариди

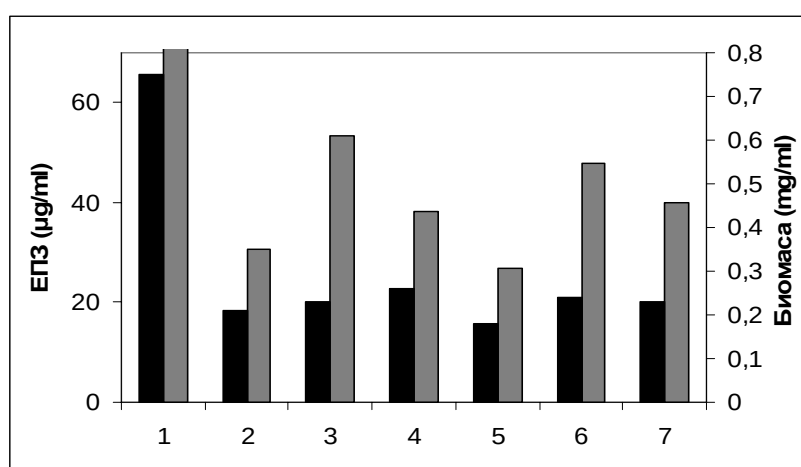
Културалните течности бяха разсяти върху твърда комплексна среда. Бяха изолирани чисти култури на 38 щамове с мукоидна консистенция на колонииите, използвана като селекционен маркер. След култивиране на чистите щамове в минималната среда със захароза бяха избрани 12, показали продукция повече от 20 µg/ml. Филогенетичният анализ на 16S рРНК ген показва, че те принадлежат основно към 4 рода - *Brevibacillus*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus* и *Aeribacillus* със степен на подобие до най-близките филогенетични съседи по-висока от 97%. Повечето от тях (девет) бяха отнесени към *B. thermoruber*. Най-висока ЕПЗ продукция (53 µg/ml) беше регистрирана за щам 418.

4.3. Характеризиране на филогенетичните и фенотипни свойства на *Aeribacillus pallidus*

Щам 418, показал най-висока екзополизахаридна продукция, беше използван за по-нататъшна работа. От изолираната тотална ДНК успешно беше амплифициран и секвениран пълният ген на 16S рРНК. Резултатите от филогенетичния анализ на 1446 bp от 16S рРНК ген показаха най-голямо сродство с щамове от вида *Aeribacillus pallidus*. Щамът растеше в температурни граници от 35 до 72°C с оптимум при 55°C, стриктен аероб. При анаеробни условия се наблюдаваше липса на растеж, не усвояваше арабиноза, рибоза, казеин, желатин. Растеше добре в среда с нишесте и карбоксиметил целулоза. Не образуваше фенилпироват, не усвояваше цитрат като единствен въглероден източник, не редуцираше NO₃ до NO₂. Реакцията на Voges-Проскауер теста и теста за продукция на индол бяха отрицателни. Не беше отчетена каталазна активност. Положителен резултат беше отчетен при теста за уреазна активност. Беше отчетен слаб растеж в среда с NaN₃. Усвояваше лакмусовото мляко като се наблюдаваха коагулирани белтъци, а цветът на лакмуса оставаше непроменен.

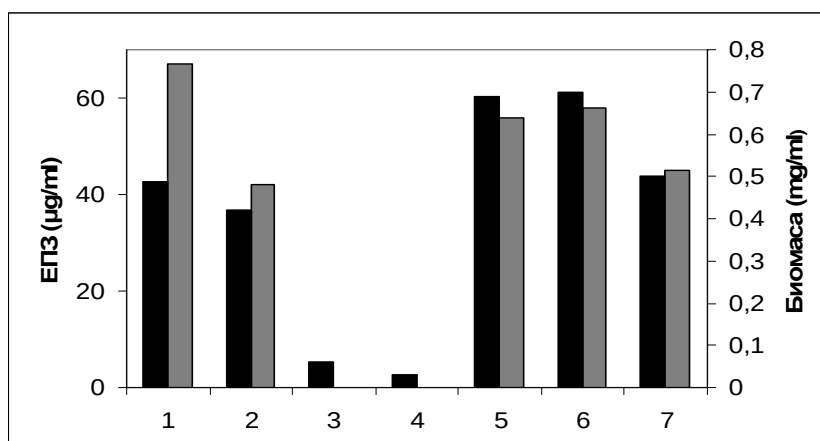
4.4. Оптимизиране на състава на хранителната среда и параметрите за синтеза на ЕПЗ от *Aeribacillus pallidus* 418

За да проследим ефекта на въглеродния източник върху полимерната синтеза, щам *A. pallidus* 418 беше култивиран в минимална солева среда в присъствието на 12 различни захари като единствен въглероден източник в концентрация 0.6%. Щамът използваше за растеж седем вида захари (малтоза, глюкоза, захароза, ксилоза, рамноза, трехалоза и фруктоза). Максимален растеж и ЕПЗ продукция бяха регистрирани в среда с малтоза, определена като най-добър въглероден източник. При вариране нивата на малтозата в интервала от 0.05 до 1.2% максимална продукция беше регистрирана при концентрация 0.9%.



Фиг. 1. Влияние на въглеродния източник върху растежа (■) и полизахаридната синтеза (▒). *A. pallidus* 418 беше култивиран в основна среда с добавени различни захари: 1, малтоза, 2, глюкоза; 3, захароза; 4, ксилоза; 5, рамноза; 6, трехалоза; 7, фруктоза.

Измежду седем тествани азотни източника на среда с 0.6% малтоза, най-висока продукция беше регистрирана в среда, съдържаща амониеви соли (Фиг. 2). В присъствието на нитрати растежът беше слаб, а ЕПЗ продукция не беше регистрирана. Използването на неорганичен въглероден източник за ЕПЗ синтеза от *A. pallidus* 418 е важно предимство за евентуално индустриално приложение, тъй като ценово ефективните среди са предпочитани. Най-висока продукция беше регистрирана в среда, съдържаща 0.2% NH_4Cl .



Фиг. 2. Влияние на азотния източник (0.2%) върху растежа (■) и ЕПЗ синтеза (▒) от *A. pallidus* 418. Означенията са както следва: 1, NH₄Cl; 2, NH₄NO₃; 3, KNO₃; 4, NaNO₃; 5, Уреа; 6, УЕ; 7, Пептон.

Съотношението между въглероден и азотен източник беше 4.5:1 (w/w).

Позитивен ефект върху продукцията на ЕПЗ от *A. pallidus* 418 беше отчетена в присъствието на минимални количества дрождев екстракт (0.04%), при което ЕПЗ синтеза нарастваше с 10%.

При изследване влиянието на микроелементите върху полимерната синтеза беше установено увеличаване на ЕПЗ количество в присъствие на Fe³⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ и Cu²⁺.

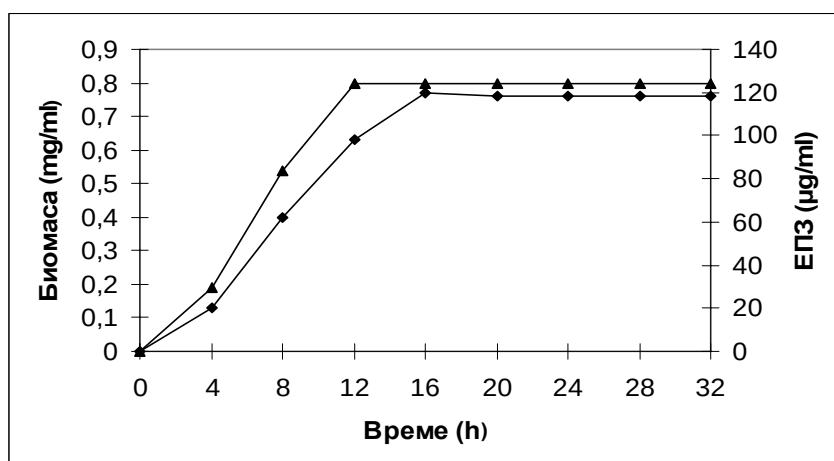
При проучване влиянието на температурата върху ЕПЗ синтеза беше установено, че оптималната температура за растеж и за полизахаридна синтеза е 55°C.

Щамът растеше най-добре и продуцираше в областта на неутралните рН стойности. Оптималното рН за растеж беше 7.0-7.5, а за максимална продукция - 7. *A. pallidus* 418 растеше и продуцираше екзополизахарид в границите рН между 6.0 и 8.5.

4.5. Ферментационни процеси за ЕПЗ синтеза

Периодично култивиране в колби

Динамиката на ферментационния процес беше проследен първоначално в колби на клатачка при 120, 240 и 360 грт (Фиг. 3). Най-висока ЕПЗ продукция беше наблюдавана при 240 грт.



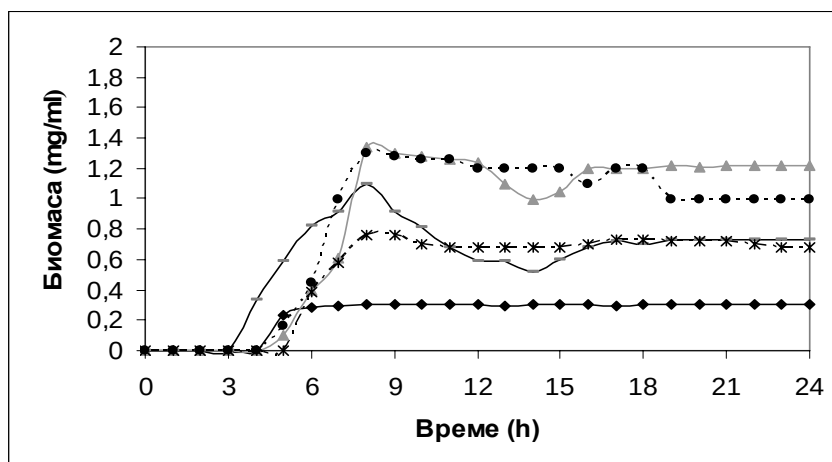
Фиг. 3. ЕПЗ (—◆—) и растеж (—▲—) на *A. pallidus* 418 в оптималната среда при 240 rpm.

При измерване сухото тегло на клетките в различни точки на растежната фаза беше установено, че на единица оптическа плътност отговаряха 1.05 mg суха биомаса/ml. Стойността на икономическия коефициент по отношение на биомасата, определена по формулата: $Y=x/s$ беше $Y=0.814$. Максимално количество ЕПЗ беше синтезиран от *A. pallidus* 418 само за 18 часа.

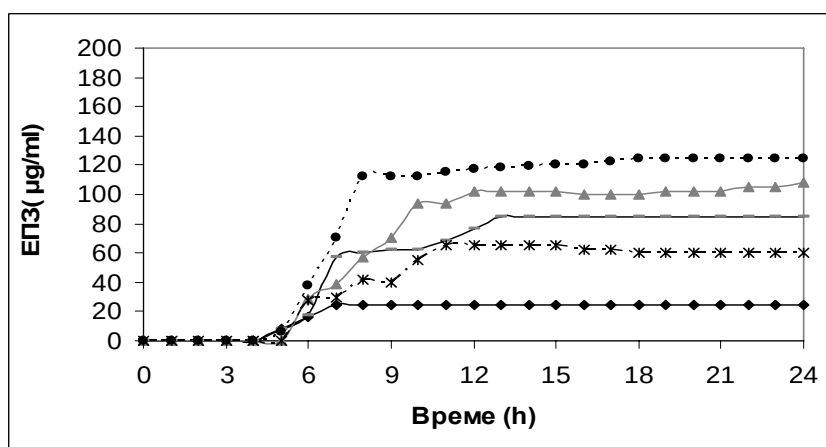
Периодично култивиране във ферментор с работен обем 1 l

Разбъркването и количеството на разтворения кислород са важни параметри, от които зависи както растежа, така и ЕПЗ продукция. За повишаване добива на ЕПЗ и оптимизиране условията на аерация и масообмен бяха проведени серия от ферментации в лабораторен ферментор с механично разбъркване с общ обем 3.0 l, работен обем 1.0 l, с бъркачка тип „Нарцис“ при оптималната температура за продукция и растеж на щама, а именно 55°C.

За да проследим влиянието на разбъркването върху растежа на щама (Фиг. 4) и полизахаридната синтеза (Фиг. 5) бяха проведени експерименти при 100, 400, 500, 600 и 800 rpm при скорост на въздушния поток 0.8 vvm. При така проведената оптимизация беше установено, че максимална продукция беше постигната при 600 rpm.

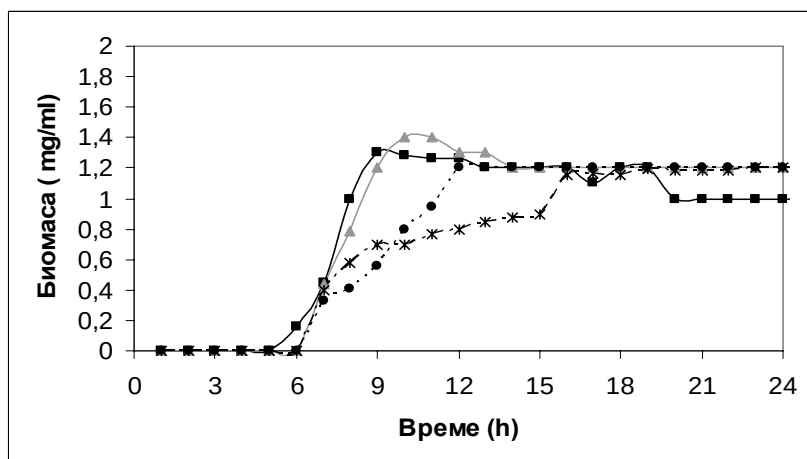


Фиг. 4. Влияние на скоростта на разбъркване върху растежа при скорост на въздушен поток 0.8:1, където 100 rpm (♦); 400 rpm (-); 500 rpm (▲); 600 rpm (●); 800 rpm (*).

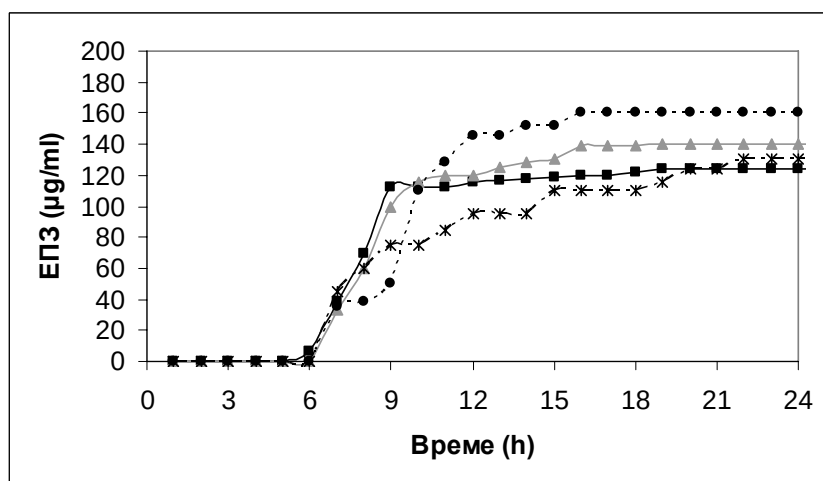


Фиг. 5. Влияние на скоростта на разбъркване върху ЕПЗ синтеза при скорост на въздушен поток 0.8:1, където 100 rpm (♦); 400 rpm (-); 500 rpm (▲); 600 rpm (●); 800 rpm (*).

При скоростта на разбъркване, водеща до максимална полизахаридна продукция (600 rpm), беше изследван и ефектът на аерацията върху бактериалния растеж (Фиг. 6) и ЕПЗ синтеза (Фиг. 7). При сравняване на резултатите, получени при различна скорост на аерация, (0.8, 1.2, 1.6 и 2.0 vvm) беше установено, че аерацията повлиява ЕПЗ синтеза в по-малка степен в сравнение с разбъркването.



Фиг. 6. Влияние на аерацията върху растежа на *A. pallidus* 418 при 600 грт и количество подаван въздух: 0,8 vvm (*); 1,2 vvm (▲); 1,6 vvm (●); 2 vvm (■).



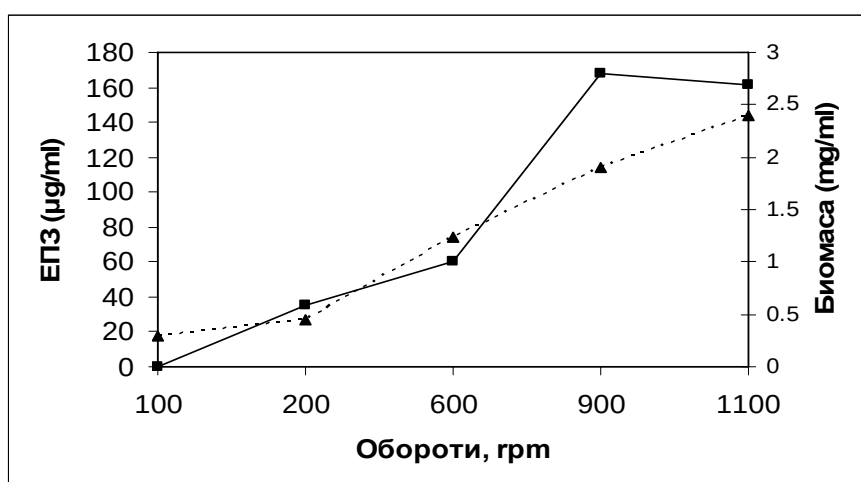
Фиг. 7. Влияние на аерацията върху ЕПЗ синтеза на *A. pallidus* 418 при 600 грт и количество подаван въздух: 0,8 vvm (*); 1,2 vvm (▲); 1,6 vvm (●); 2 vvm (■).

Периодично култивиране във ферментор с работен обем 2.5 l

Успехът на мащабирането се базира обикновено на неоспорими експериментални резултати, които показват, че няма различие между малките и големите ферментации, проведени при аналогични параметри на масообмен и аерация. За целта ЕПЗ синтеза в лабораторен ферментор с работен обем 1.0 l беше сравнена с тази във ферментор с работен обем 2.5 l. Кислородната консумация на изследвания от нас микроорганизъм в 2.5 l ферментор беше проследена в серия от експерименти при разбъркване 100, 200, 500, 600, 900 и 1100 грт и аерация 0.25, 0.5, 1, 1.2 и 2.0 vvm. Възможността за отчитане на кислородната консумация в този съд ни позволи да

изведем зависимостта на ЕПЗ синтеза от количеството разтворен в културалната течност кислород и да определим кинетичните параметри $k_L a$ и OUR.

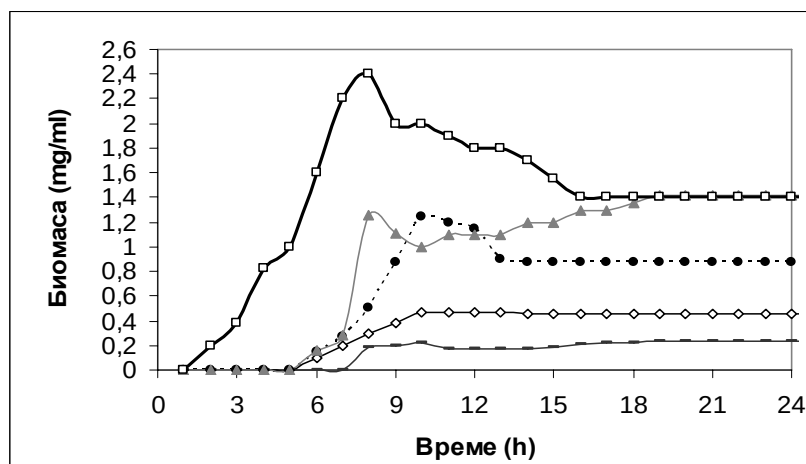
Сравняването на резултатите, получени след 24 h ферментации при различни скорости на разбъркване и постоянна скорост на въздушния поток 0.5 vvm, показва силна зависимост на разбъркването върху ЕПЗ продукция и растежа на щама (Фиг. 8).



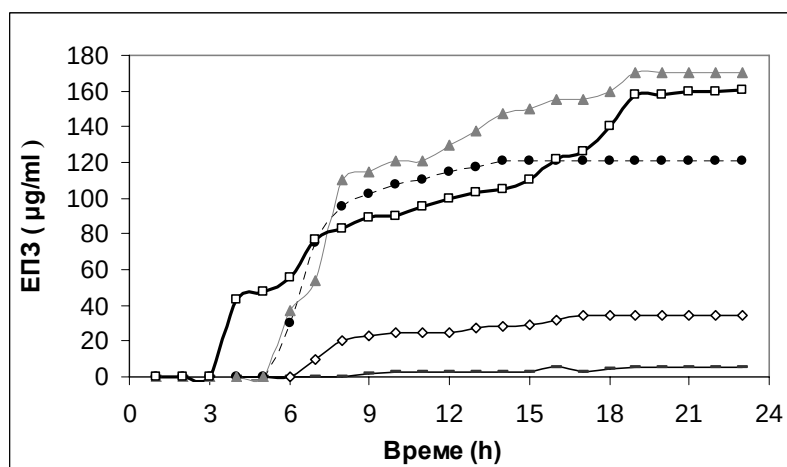
Фиг. 8. Влияние на разбъркването върху растежа ($\blacktriangle$) и синтеза на ЕПЗ ($\blacksquare$) от *A. pallidus* 418.

При ниските скорости ЕПЗ продукция беше незначителна, а скоростта на растеж беше от четири до осем пъти по-ниска от измерената при 900 rpm (Фиг. 9). Вероятно при тези условия не могат да се постигнат добра хомогенизация, масообмен и топлинен трансфер, а кислородът е лимитиращ микробния растеж субстрат. Лаг фазата продължаваше 5-6 часа за всички тествани нива на разбъркване с изключение на най-ниските и най-високите скорости (съответно 8 h при 100 rpm и 1.5 h при 1100 rpm), което още веднъж доказва силната зависимост на развитието на културата от скоростта на разбъркване. Максимална скорост на растежа ($\mu_{\max}=0.851 \text{ h}^{-1}$) беше измерена при 900 rpm.

При увеличаване скоростта на разбъркване от 100 до 900 rpm се наблюдаваше увеличаване на количеството ЕПЗ, като разликата между ниските скорости (100 и 200 rpm) и средните скорости беше значителна (Фиг. 10). По-нататъшното повишаване скоростта на разбъркване до 1100 rpm благоприятстваше растежа, но ЕПЗ продукция намаляваше. Отново беше наблюдавана частично свързана с растежа синтеза на ЕПЗ.



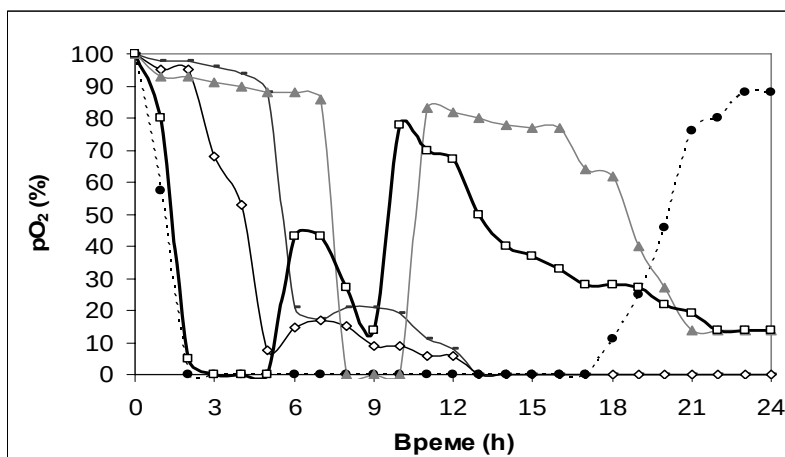
Фиг. 9. Влияние на различните скорости на разбъркване върху растежа на *A. pallidus* 418 във ферментор с разбъркване при аерация 0.5 vvm. Символи: (-) 100 rpm; ($\diamond$) 200 rpm; ($\bullet$) 600 rpm; ($\blacktriangle$) 900 rpm; ($\square$) 1100 rpm.



Фиг. 10. Влияние на различните скорости на разбъркване върху ЕПЗ продукцията по време на култивирането на *A. pallidus* 418 във ферментор с разбъркване при аерация 0.5 vvm. Символи: (-) 100 rpm; ($\diamond$) 200 rpm; ($\bullet$) 600 rpm; ($\blacktriangle$) 900 rpm; ($\square$) 1100 rpm.

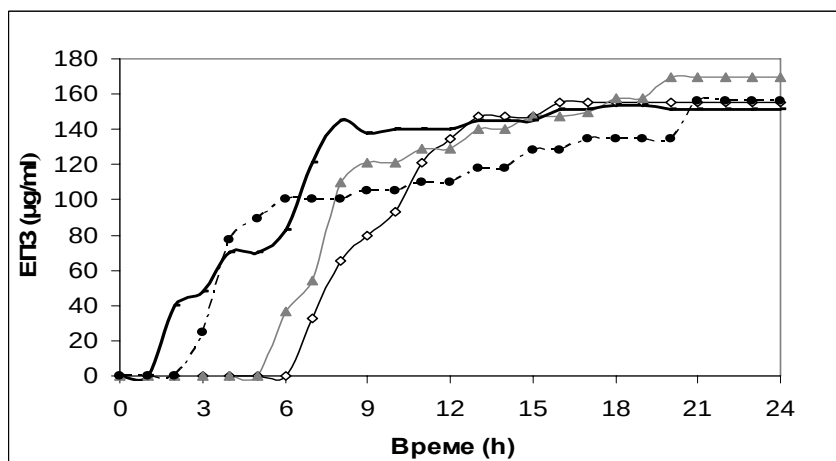
Проследяването на количеството разтворен кислород в културалната течност при различни скорости на разбъркване показва различен профил на кривите (Фиг. 11). Вероятно поради ниската разтворимост на кислорода при висока температура (55°C), нивото на разтворен кислород бързо намаляваше и достигаше до 0% в четири от проследените пет скорости на разбъркване, а именно при 100, 200, 600 и 900 rpm. Кислородът беше критичен фактор, причиняващ ранното прекъсване в развитието на микробната култура при ниските скорости на разбъркване (100 и 200 rpm). Въпреки че кислородна лимитация беше наблюдавана за известен период от време и при по-високите скорости (за 10 h при 600 rpm и за 2 h при 900 rpm), разтвореният кислород

при тези скорости беше достатъчен за добър растеж, а неговата лимитация стимулираше ЕПЗ синтеза като клетъчен отговор към тази лимитация.



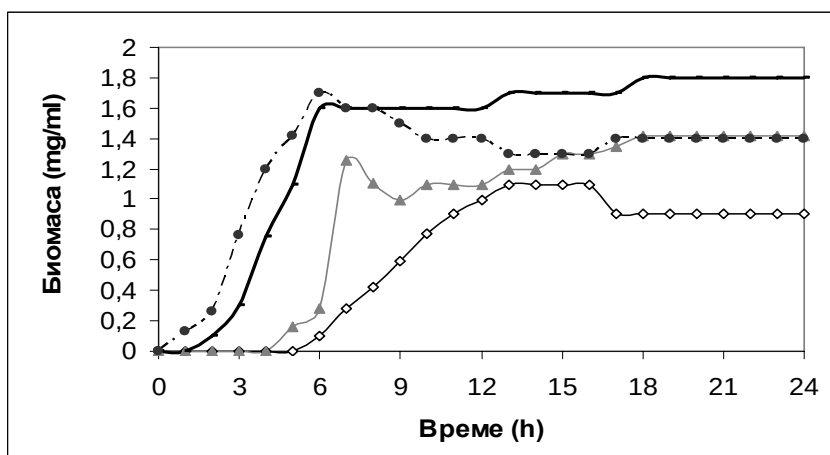
Фиг. 11. Влияние на различните скорости на разбъркване върху количеството разтворен кислород (%) по време на култивирането на *A. pallidus* 418 във ферментор 2.5 l при аерация 0.5 vvm. Символи: (-) 100 rpm; ($\diamond$) 200 rpm; ($\bullet$) 600 rpm; ($\blacktriangle$) 900 rpm; ($\square$) 1100 rpm.

Измереното максимално количество ЕПЗ във ферментор 2.5 l беше подобно на максималното количество, измерено в 1 l ферментор, което демонстрира, че е постигнат максимума на щам за ЕПЗ синтеза, независимо от големината на ферментора, т.е. преходът към по-голям ферментор е осъществен успешно.



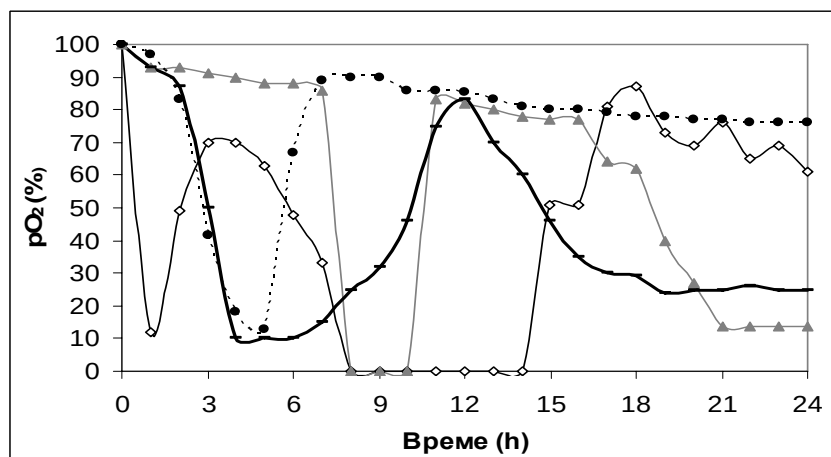
Фиг. 12. Влияние на различната аерация върху ЕПЗ продукция по време на култивирането на *A. pallidus* 418 във ферментор с разбъркване при определените оптимални условия за разбъркване 900 rpm. Символи: ($\diamond$) 0.25 vvm; ($\blacktriangle$) 0.5 vvm; (-) 1.0 vvm; ($\bullet$) 1.5 vvm.

При скоростта на разбъркване, осигуряваща максимална полимерна синтеза (900 rpm) беше проследена полизахаридната синтеза и растежа при различни скорости на аериране: 0.25 vvm (0.6 l/min), 0.5 vvm (1.2 l/min), 1 vvm (2.4 l/min), и 1.5 vvm (3.6 l/min). Максимално количество ЕПЗ беше измерено при 0.5 vvm (Фиг. 12). Биомасата варираше в интервала 1.4-1.8 mg/ml (Фиг. 13).



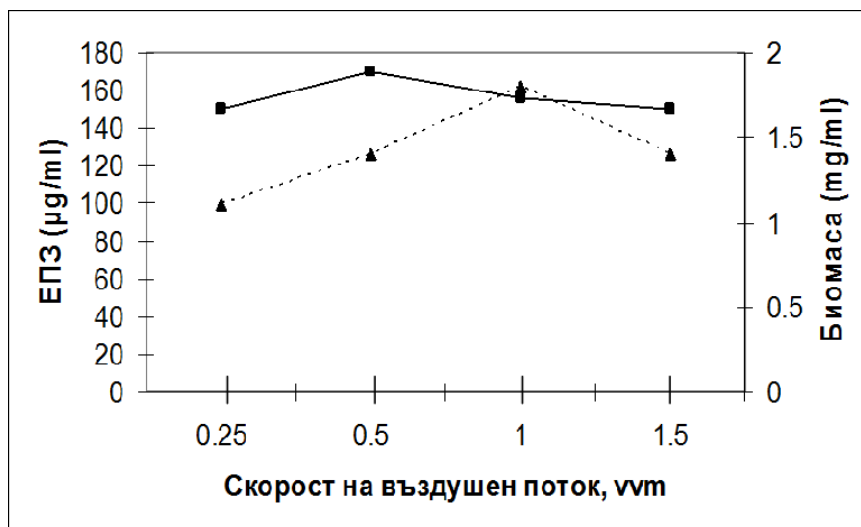
Фиг. 13. Влияние на различната аерация върху биомасата по време на култивирането на *A. pallidus* 418 във ферментор с разбъркване при 900 rpm. Символи: ($\diamond$) 0.25 vvm; ($\blacktriangle$) 0.5 vvm; (-) 1.0 vvm; ($\bullet$) 1.5 vvm.

Кривите, отразяващи количеството разтворен кислород (Фиг. 14) се различаваха значително при различните скорости на аериране. Кислородна лимитация беше наблюдавана при 0.25 vvm (за 7 h), и 0.5 vvm (за 2 h).



Фиг. 14. Влияние на различната аерация върху количеството разтворен кислород (%) по време на култивирането на *A. pallidus* 418 във ферментор с разбъркване при определените оптимални условия за разбъркване 900 rpm. Символи: ($\diamond$) 0.25 vvm; ($\blacktriangle$) 0.5 vvm; (-) 1.0 vvm; ($\bullet$) 1.5 vvm.

Подобно на процесите с вариране скоростта на разбъркване, и при процесите с вариране скоростта на аериране при ферментацията, осигуряваща най-кратка кислородна лимитация (0.5 vvm) беше установена най-висока ЕПЗ продукция.



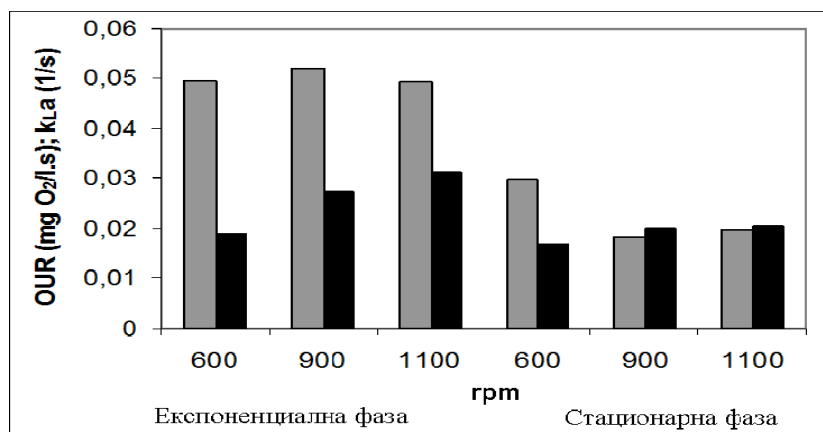
Фиг. 15. Влияние на аерацията върху растежа (▲) и синтеза на ЕПЗ (■) от *A. pallidus* 418.

Сравнително малките различия в растежа и полимерната синтеза при четирите нива на аериране (Фиг. 15) предполага, че влиянието на аерирането върху полимерната синтеза е по-малко в сравнение с това на разбъркването.

Определяне на, k_{La} и OUR

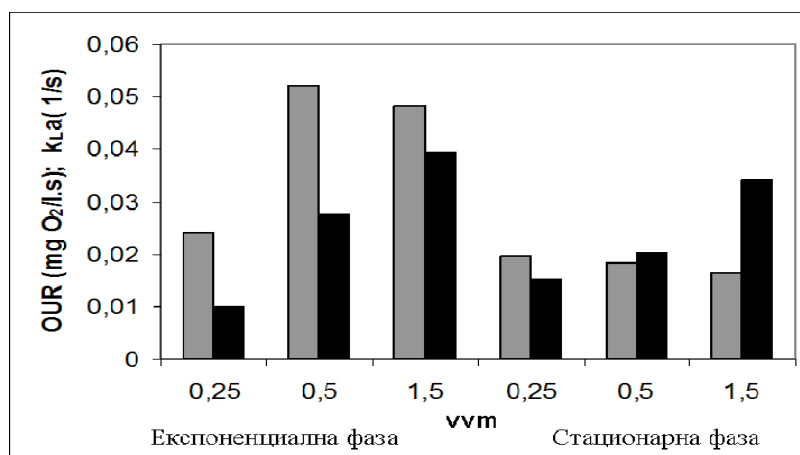
Двата параметъра, обемен коефициент на масопренасяне (k_{La}) и скорост на поглъщане на кислорода (OUR , oxygen uptake rate) бяха анализирани в експоненциална и стационарна фаза. Въздухът беше прекратяван и отчитана промяната в неговата концентрация. При различни скорости на разбъркване (600, 900 и 1100 rpm) (Фиг. 16), както и при различните скорости на аериране (0,25, 0,5 и 1,5 vvm) (Фиг. 17), получените стойности за OUR бяха в интервала 0,01-0,055 mgO₂/ls, а за k_{La} - в интервала 0.009 s⁻¹-0.036 s⁻¹. Най-високите стойности за OUR бяха отчетени при 900 rpm и 0.5 vvm, т.е. при условията, при които се наблюдаваха най-високи количества биомаса и ЕПЗ. Стойностите на k_{La} зависеха силно от растежа на щама и бяха най-високи при най-голямо количество натрупана биомаса, k_{La} нарастваше както с увеличаване интензивността на разбъркване, така и при увеличаване на аерацията. Наблюдаваше се пряка зависимост между интензивността на разбъркване и скоростта на пренос на кислорода и съответно на коефициента на масопренасяне, както и на

количеството биомаса в реактора. Този ефект е очакван, защото по-доброто разбъркване дава по-добро хомогенизиране на системата, по-равномерно разпределение на газовите мехури и съответно по-добро разтваряне на кислорода.



Фиг. 16. Коефициенти на кислороден пренос OUR и k_{La} при различна скорост на разбъркване, rpm, където OUR (■); k_{La} (■).

Тенденцията беше добре изразена в експоненциална фаза, тъй като в стационарна фаза респираторният капацитет на културата намаляваше, а масообменът, изразен чрез консумацията на кислород, беше нисък или дори клонеше към нула.



Фиг. 17. Коефициенти на кислороден пренос OUR и k_{La} при различна скорост на аерация (vvm), където: OUR (■); k_{La} (■).

Определянето на кинетичните параметри в посочения ферментор предполага възможност за успешно мащабиране на процеса в по-големи съдове при запазване на съответните коефициенти.

Непрекъснато култивиране

Непрекъснатото култивиране е доказал своята ефективност метод за повишаване на микробната продукция, като обикновено това повишение се свързва с премахване на продуктната инхибиция. Непрекъснатите култури са отворени системи, характеризиращи се с добавяне на хранителна среда с постоянна скорост и поддържане на културите в различни точки на експоненциалната фаза, в зависимост от скоростта на разреждане. Предимства на непрекъснатите култури в сравнение с периодичните са премахването на операционното време за почистване и стерилизация на ферменторите и избягване на лаг-фазата. Такава система поддържа постоянно качество на продукта и постоянна скорост на синтеза при добро използване на реактора и с възможности за автоматизация на системата. Особено перспективно е използването на непрекъснатото култивиране при термофилните процеси, при които периодичните процеси често продължават няколко часа, а подготовката на нов реактор продължава по-дълго. Непрекъснатото култивиране беше проведено в лабораторен ферментор с работен обем 1 l при оптималните за този ферментор скорост на разбъркване (600 rpm) и аерация (1.6 vvm), като резултатите бяха отчитани след изтичане на културална течност, равна на поне три работни обема на ферментора и равновесното състояние (steady state) на културите беше доказвано с поне трикратно повторение на измерванията на растежа и ЕПЗ продукция. Основните параметри на растеж и ЕПЗ синтеза при три различни скорости на разреждане (D 0.06, 0.1 и 0.2 h^{-1}) бяха сравнени с тези при периодично култивиране (Табл. 1). Скоростта на разреждане D при непрекъснато култивиране съвпада със специфичната растежна скорост μ и беше определена по формулата $D = F / V$, където F е скоростта на подаване на хранителната среда, а V е работният обем на ферментора.

Представените в Табл. 1 резултати ясно показаха зависимостта на количеството синтезиран полимер от скоростта на разреждане като най-високо съдържание на ЕПЗ в културалната течност ($170 \text{ } \mu\text{g/ml}$) беше отчетено при най-ниската скорост на разреждане 0.06 h^{-1} . Отчетено беше 10% увеличение в ЕПЗ продукция от *A. pallidus* 418 при непрекъснато култивиране в сравнение с периодичното култивиране в същия ферментор. От представените в таблицата данни се вижда, че продуктивността на процеса, представляваща синтезирания за единица време ЕПЗ при най-високата скорост на разреждане ($D=0.2$) е 1.8 пъти по-висока в сравнение с тази при 0.06, но количеството изразходвана среда е повече от три пъти по-голямо, което демонстрира

необходимостта от прецизен анализ на условията за продукция на ЕПЗ в условията на непрекъснато култивиране с цел постигане на максимална икономическа ефективност.

Табл. 1. ЕПЗ синтеза от *A. pallidus* 418 в условия на периодично и непрекъснато култивиране.

Тип култивиране	Скорост на разреждане (D)	Биомаса (X, mg/ml)	ЕПЗ ($\mu\text{g/ml}$)	Специфична продукция (ЕПЗ/X)	Продуктивност (h^{-1})	
					Биомаса (X.D)	ЕПЗ (EPS.D)
Периодично	-	1.4	160	114	-	-
Непрекъснато	0.06	1.3	170	130.8	0.078	10
	0.1	0.76	131	172.4	0.076	13.1
	0.2	0.57	91	159.6	0.114	18.2

За сравнение при скорост $D\ 0.06\ \text{h}^{-1}$ беше проведен процес и при по-високи скорости на разбъркване (800 rpm), при което беше наблюдавано намаление на ЕПЗ количество ($65\ \mu\text{g/ml}$) в сравнение с това при 600 rpm. Също така беше променяна и скоростта на въздушния поток (1.2 и 2.0 vvm) без да се променят останалите показатели, като също се наблюдаваше намаление в сравнение с ЕПЗ, синтезиран при 1.6 vvm (съответно 123 и 113 $\mu\text{g/ml}$).

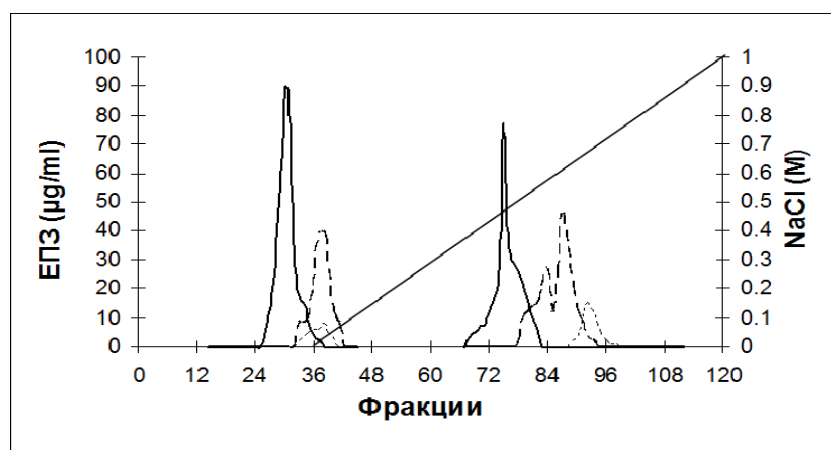
Друго предимство при използването на непрекъснати култури е увеличената степен на чистота на синтезирания продукт, което улеснява процеса на неговото пречистване. Установеното съдържание на ЕПЗ в полимерната фракция, получена след преципитация с етанол на културална течност от непрекъснато култивиране при $D=0.06$ беше 95.3%, докато от периодично култивиране беше 65.3% (Табл.2).

Табл. 2. Сравнителен анализ на количеството и степента на чистота на ЕПЗ при различни типове култивиране.

Тип култивиране	ЕПЗ		Белтък		ДНК	
	(µg/mg)	%	(µg/mg)	%	(µg/mg)	%
Периодично	653	65.3	300	30	47	4.7
Непрекъснато, D=0.06	953	95.3	42	4.2	5	0.5
Непрекъснато, D=0.1	870	87	105	10.5	25	2.5

4.5. Изолиране и пречистване на полимерната фракция

Пречистването беше проведено с използването на гел- и йонообменна хроматография. Елуационният профил на пречистването на полимерната фракция (Фиг. 18) показва присъствие на два различни полизахарида: електронеутралният ЕПЗ 1 беше елуиран с вода непосредствено след празния обем на колоната, докато ЕПЗ 2 беше отрицателно зареден и се елуираше при 0.4 М NaCl. Количественото съотношение между двата полизахарида беше 3:2.2.

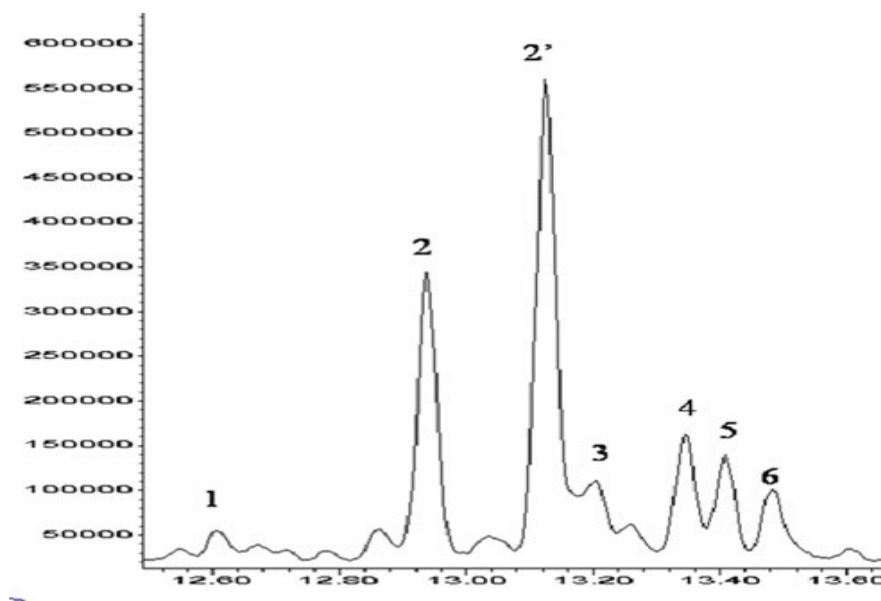


Фиг. 18. Пречистване на ЕПЗ на колона със Sepharose DEAE CL-6B. Елуирани полимери: ЕПЗ (—), белтък (---) и нуклеинови киселини (...).

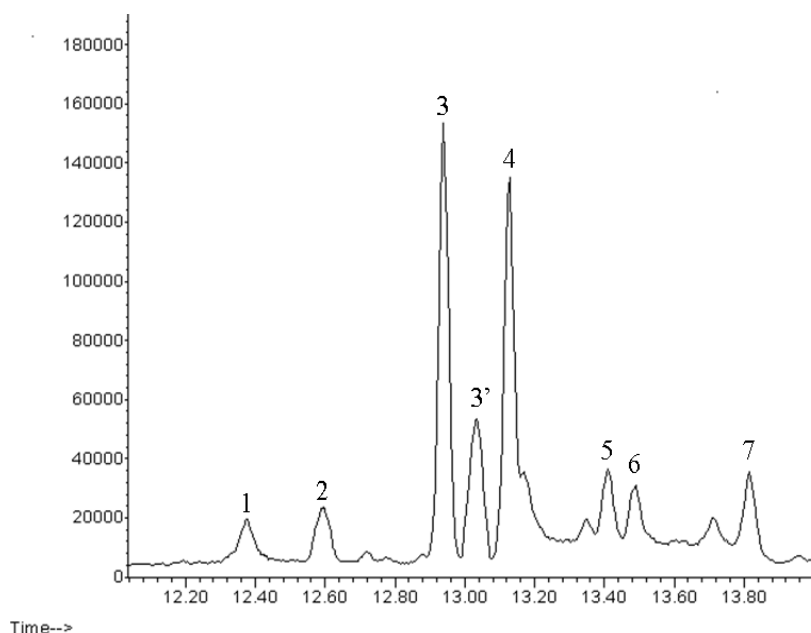
4.7. Химичен състав и строеж

Монозахариден състав

Двата пречистени полизахарида представляваха гликопротеини, тъй като съдържаха, макар и в малки концентрации, белтъчна компонента в молекулата си. Регистрираното белтъчно съдържание в молекулата на ЕПЗ 1 беше 3.0%, а в ЕПЗ 2 - 7.0%. Беше регистрирано присъствието и на уронови киселини и в двата ЕПЗ - 1.9% за ЕПЗ 1 и 6.5% за ЕПЗ 2. GC-MS анализи показаха необичайно висок брой различни захарни остатъци в молекулата на ЕПЗ 1 и ЕПЗ 2. ЕПЗ 1 се състоеше от шест монозахарида, а ЕПЗ 2 - от седем, като пет от тях бяха общи, но представени в различни пропорции. Манозата беше основният компонент и на двата ЕПЗ (69.3% в ЕПЗ 1 и 33.9% в ЕПЗ 2). Наред с нея, в състава на ЕПЗ 1 се включваха глюкоза (11.2%), галактозамин (6.3%), глюकोзамин (5.4%), галактоза (4.7%) и рибоза (2.9%) (Фиг. 19). В състава на ЕПЗ 2 се включваха допълнително галактоза (17.9%), глюкоза (15.5%), галактозамин (11.7%), глюкозамин (8.1%), рибоза (5.3%) и арабиноза (4.9%) (Фиг. 20). Манозата и в двата полимера беше представена от два различни изомера.



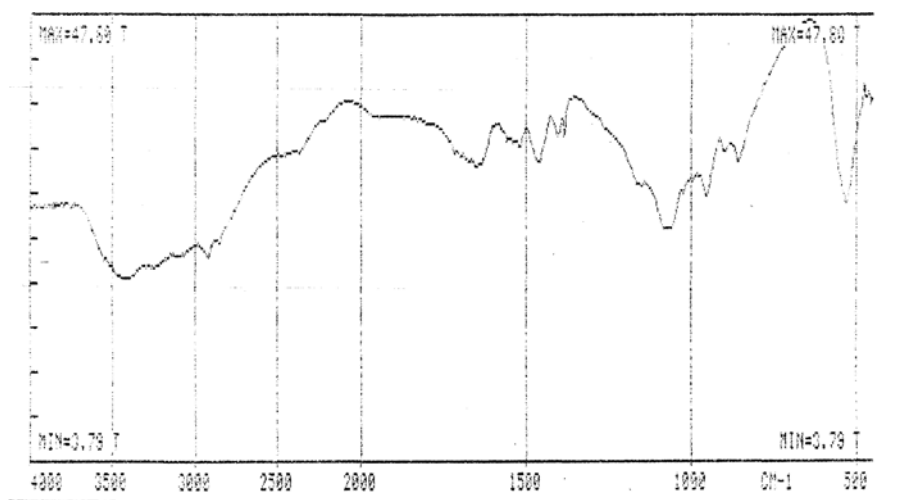
Фиг. 19. GC газхроматограма на ЕПЗ 1: 1, рибоза; 2 и 2', два изомера на маноза; 3, глюкоза, 4, глюкозамин; 5, галактозамин; 6, галактоза.



Фиг. 20. GC газ хроматограма на ЕПЗ 2: 1, арабиноза; 2, рибоза; 3 и 3', два изомера на манозата; 4, глюкоза; 5, глюкозамин; 6, галактозамин; 7, галактоза.

IR-спектър

При изследване на IR-спектър, даващ информация за съдържащите се в молекулата химични групи се наблюдаваха характеристични ивици на поглъщане, типични за природните полизахариди (Фиг. 21).

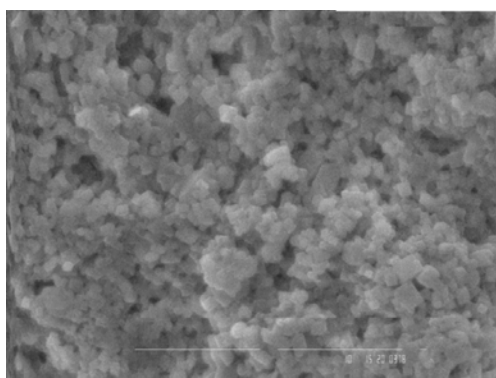


Фиг. 21. IR-спектър на ЕПЗ, синтезиран от *Aeribacillus pallidus* 418.

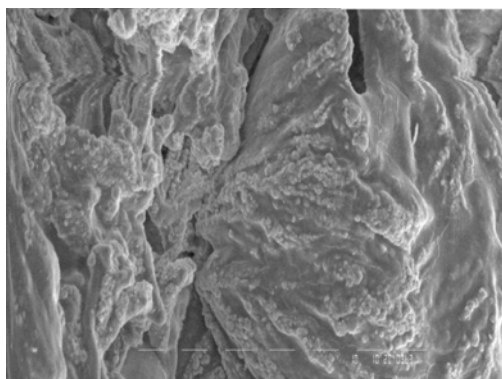
Широката и интензивна ивица при $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ с абсорбционен максимум при 3400 cm^{-1} се дължи на ОН-групата. Сравнена с валентните колебания на характеристичната ивица на поглъщане на свободна хидроксилна група (--OH) при $3650\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, тя беше изместена към по-малките честоти, което е характерно за --OH - групи, участващи

в образуване на вътрешно молекулни водородни връзки. Ивицата при 1654 cm^{-1} се отнася към деформационните колебания на абсорбираната вода, не участваща в образуване на водородни връзки. Сравнително интензивната ивица при 1078 cm^{-1} може да бъде отнесена към валентните колебания на (C-C), (C-O) и (C-O-C) в пиранозния пръстен. Наблюдаваното при 1740 cm^{-1} трептене съответства на присъствие на карбоксилна група, което може да се свърже с регистрираните уронови киселини.

Структурата на двата синтезирани екзополизахарида след лиофилизиране беше наблюдавана със сканираща електронна микроскопия (Фиг. 22 и 23).



Фиг. 22. Микрофотография на прахообразна проба от ЕПЗ 1.



Фиг. 23. Микрофотография на прахообразна проба на ЕПЗ 2.

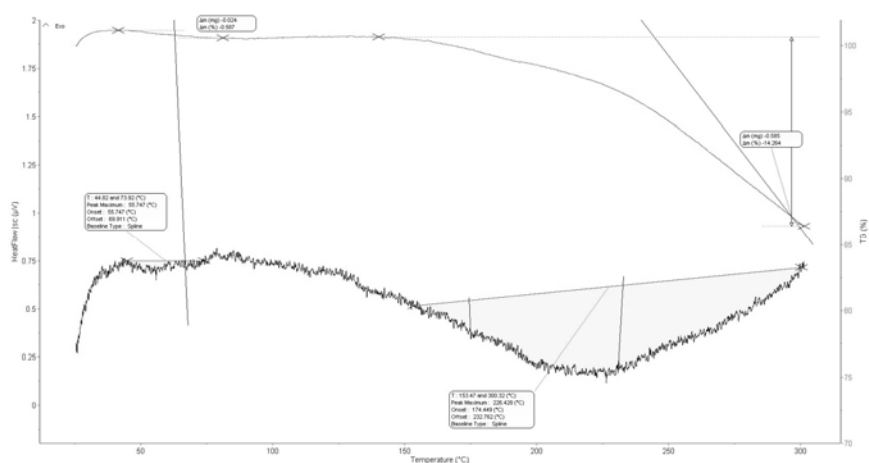
4.8. Свойства на синтезираните ЕПЗ

Молекулно тегло

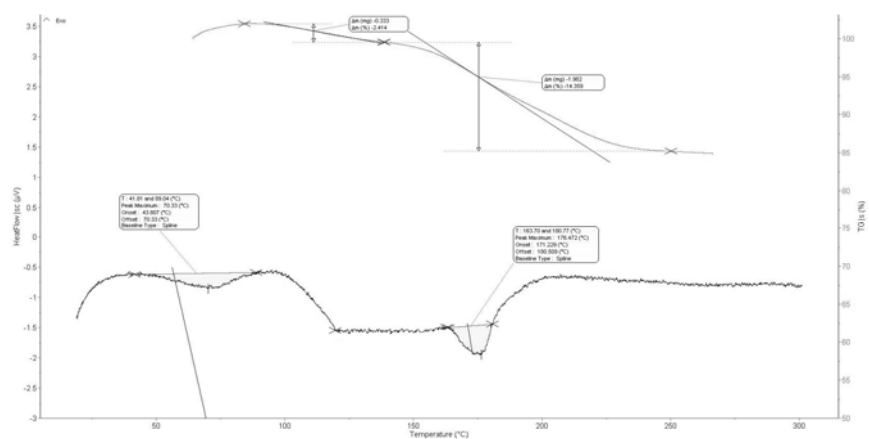
Двата полизахарида, синтезирани от *A. pallidus* 418 бяха високомолекулни. Определеното от калибрационната крива с използването на различни декстрирани молекулно тегло на ЕПЗ 1 беше 700 kDa, а на ЕПЗ 2 - над 1000 kDa.

Термостабилност

Познаването на термостабилността на микробните ЕПЗ е от особено значение при евентуалното им използване в индустрията. Резултатите от термогравиметричните анализи (Фиг. 24 и 25) показваха загуба на тегло при 80°C за ЕПЗ 1 и 50-60°C за ЕПЗ 2, съответстващи на отделянето на водата. От тази температура до 160°C ЕПЗ 1 беше стабилен и транзитният максимум на процеса на разграждане беше установен при 176°C, а за ЕПЗ 2 - при 226°C.



Фиг. 24. DTA-TG термограма на ЕПЗ 1, синтезиран от *Aeribacillus pallidus* 418.



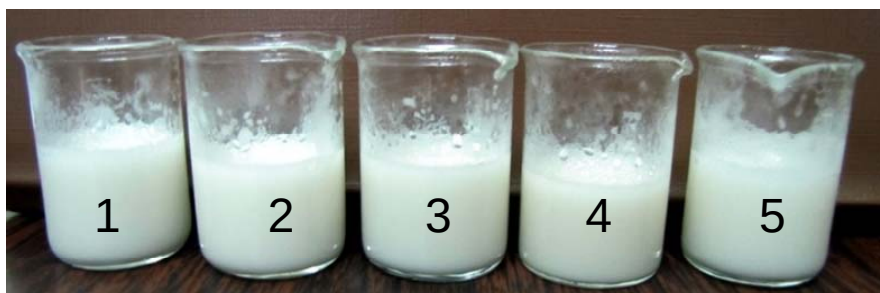
Фиг. 25. DTA-TG термограма на ЕПЗ 2, синтезиран от *Aeribacillus pallidus* 418.

4.9. Емулсионни свойства на ЕПЗ от *Aeribacillus pallidus* 418

Едно от най-перспективните приложения на биополимерите е използването им като емулгатори и стабилизатори на различни емулсионни системи. Въпреки високата

цена на термофилните ЕПЗ, тяхната термостабилност, високото молекулно тегло и необикновената структура провокират индустриалния интерес към техните свойства. Изследванията на емулгиращите свойства на непречистената ЕПЗ фракция от *A. pallidus* 418 показва способността ѝ да формира стабилни емулсии с олио, като количеството емулсия доминираше над количеството отделена вода за всички концентрации на ЕПЗ. Синтезираният полимер показва липофилен характер, позволяващ абсорбцията му на граничната фаза масло/вода в емулсионната система. Фактът, че добавеното масло беше здраво свързано в емулсията и не се отделяше маслена фаза е важно свойство на този ЕПЗ, предпазващ олиото от окисляване и поява на нежелана миризма в бъдещи търговски продукти. Хидрофилната природа на ЕПЗ беше по-слабо изразена, като отделената вода намаляваше от 42 до 26% с увеличаване количеството на използвания полимер. С увеличаване на концентрацията на ЕПЗ количеството на не разрушената при центрофугиране емулсия се повишаваше от 58 до 74%. Концентрацията на ЕПЗ оказваше влияние върху емулсионната стабилност и микроструктурата на колоидните разтвори. Качеството на емулсиите беше оценено с измерването на преминалата през емулсията светлина (Т%, транслюкационен индекс), който варираше между 82 и 61%, отразяваща известна нестабилност на дисперсионната система при ниски концентрации на ЕПЗ.

Илюстрация на получените емулсии са показани на фиг. 26.



Фиг. 26. Емулсии, получени с ЕПЗ от *A. pallidus* 418: 1, 0.5%; 2, 1.0%; 3, 1.5%; 4, 2.0%; 5, 2.5%.

Свойствата на полизахарида дават надежда за потенциално приложение в козметиката.

4.10. Синергично действие между ЕПЗ от *A. pallidus* 418 и други полизахариди

Проучен беше синергичният ефект между ЕПЗ, синтезиран от *A. pallidus* 418 и някои използвани като сгъстители и стабилизатори в хранителната и козметичната промишленост растителни и микробни хидроколоиди - гуар гум, целулоза, ксантан,

Na-алгинат (Табл. 3). Опитите бяха проведени с 1% ЕПЗ, синтезиран от *A. pallidus* 418 и 0,5% от използваните хидроколоиди (% съдържание във водната фаза). Съотношението между водна и маслена фаза беше 1:1. Наблюдаваното различие в емулгиращите свойства на използваните смеси от полизахариди показват, че тези хидроколоиди проявяват различен емулгиращ ефект. Значително количество вода (40%) се отделяше след центрофугиране на емулсиите с целулоза или Na-алгинат. Положителният ефект върху емулсионната стабилност достигаше 95-98% при добавянето на гуар гум или ксантан и не се наблюдаваше отделяне на водна фаза, което се дължи на по-високия вискозитет на водните им разтвори. Тези резултати ясно демонстрират синергизма между ЕПЗ, синтезиран от *A. pallidus* 418 и широко използваните в хранителната и козметична промишлености хидроколоиди. При изследване емулгиращия и стабилизиращ ефект на 0.5 и 1% водни разтвори на изследваните хидроколоиди самостоятелно се наблюдаваха слаби емулгиращи свойства, демонстрирани от високите стойности за Т% (от 78 до 92%) и значителното количество отделена маслена фаза при центрофугиране. Получените резултати показват, че е налице изразен синергичен ефект и повишена стабилност при емулсиите, получени със смесените разтвори.

Табл. 3. Стабилност на емулсии с ЕПЗ, синтезиран от *A. pallidus* 418 с добавка на други хидроколоиди.

Емулсия на ЕПЗ от <i>A. pallidus</i> 418 (1%) с други хидроколоиди (0.5%)	Отделена фаза, %		
	Масло	Вода	Емулсия
гуар	5	0	95
целулоза	следи	40	60
ксантан	2	0	98
Na-алгинат	следи	40	60

Опитите за установяване на най-ефективната концентрация на ЕПЗ и хидроколоида, с който беше наблюдаван най-добър синергизъм, а именно ксантан, бяха проведени с различни концентрации на двата полизахарида. Най-стабилна

емулсионна система (100% неразрушена емулсия) се получаваше при концентрация 2% ЕПЗ и 1% ксантан. Получените резултати показаха, че не беше наблюдавана пряка зависимост между емулсионната стабилност и сумарната концентрация на водните разтвори на полизахаридите.

При определяне на реологичните характеристики на водни разтвори и емулсии с 0.5% ЕПЗ при различни температури беше установено, че те са типични ненютонови течности ($0 \leq n \leq 1$), като индексът на консистенция (К) е най-голям за емулсия, съдържаща ксантан и ЕПЗ от щам *A. pallidus* 418. Доказателство за ненютоновия характер на емулсията е и фактът, че вискозитетът не намаляваше значително с повишаване на температурата. Наблюдавана беше по-ниска стойност на К за емулсия, съдържаща 0.5% ЕПЗ в сравнение с воден разтвор на ЕПЗ. Този факт вероятно е свързан с диспергирането на ЕПЗ в разтвора и емулсията. Тази хипотеза се нуждае от допълнителни изследвания, за да бъде доказана.

4.11. Свойства на козметични кремове, съдържащи ЕПЗ от *A. pallidus* 418

Влиянието на ЕПЗ от *A. pallidus* 418 върху свойствата на козметични кремове беше проучено във фирма Боди Д и УХТ, Пловдив. За целта полизахаридът беше включен в концентрация 1 или 2% към водната фаза на крема. Бяха получени следните резултати за вискозитета, К (Pa.s) и течливостта, n (Табл. 4).

Табл. 4. Реологични характеристики на проучваните козметични кремове.

Проба	К	n	Хистерезис, Pa.s ⁻¹
Контрола	13,98	0,86	1824
Крем 1 (1% ЕПЗ)	14,94	0.70	8234
Крем 2 (2% ЕПЗ)	37.57	0.48	7668

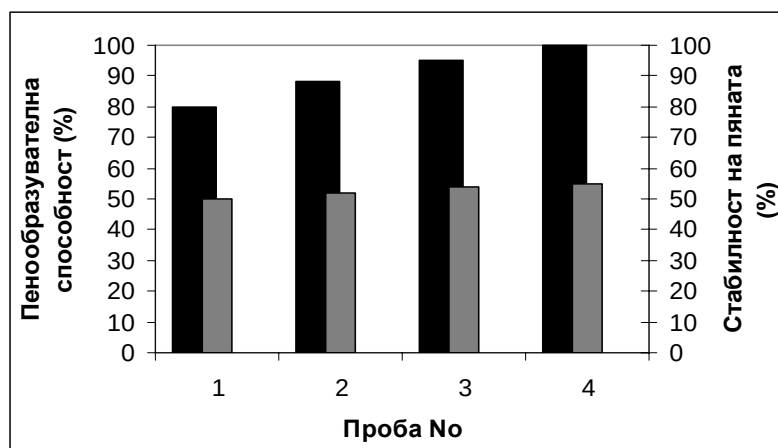
Получените резултати показаха, че добавянето на ЕПЗ води до нарастване на вискозитета, особено силно изразено при по-високата концентрация. Добавянето на полизахарида увеличава псевдопластичното поведение на крема – константата на течливостта n намалява с увеличаване на полизахаридната концентрация. Добре изразеното псевдопластично поведение улеснява по-доброто покритие на кожата при

енергично нанасяне, докато в покой затруднява втечняване на крема. С увеличаването на ЕПЗ концентрация кремът се стабилизира, което подобрява неговите свойства. Добавянето на ЕПЗ увеличава механичния хистерезис (силата, необходима за разрушаване на емулсията) в резултат на създаването на полимерна матрица в структурата на козметичния крем, разрушаването на която изисква допълнителна енергия. Механичният хистерезис за козметични кремове, съдържащи 1% и 2% ЕПЗ оставаше постоянен (различията са в рамките на експерименталната грешка), т.е. здравината на допълнително възникналата структура не зависеше съществено от концентрацията на ЕПЗ над 0.5% - критичната концентрация на структурообразуване. Повърхностната активност на крема с използването на екзополизахарида от *A. pallidus* 418 беше определена по метода на Шишковски. Опитните усреднени данни от 10-кратни измервания показаха понижение на повърхностното напрежение на крема в присъствие на ЕПЗ от *A. pallidus* 418, подобно на наблюдаваното при използване на други хидроколоиди (Табл. 5).

Табл. 5. Повърхностно напрежение на водни разтвори на природни полизахариди.

Полизахарид	Тегло (%)	σ (mN.m ⁻¹)
Вода	-	72
ЕПЗ от <i>A. pallidus</i> 418	0.5	57
Гуар	0.7	55
Locust gum	0.7	50
Ксантан	0.6	43
Трагакант	0.6	42

Резултатите за пенообразуващата способност на пяната, представени на Фиг. 27 показваха, че зависимостта на пенообразуващата способност от концентрацията на ЕПЗ не е линейна, като малки промени в концентрациите водят до по-съществено увеличаване на пенообразуващата способност. Показателят от 80% за 0.5% воден разтвор нарастваше до 100% за 2.0% воден разтвор.



Фиг. 27. Зависимост на пенообразуващата способност (■) и стабилността на пяната (■) от концентрацията на екзополизахарида от *Aeribacillus pallidus* 418, където: 1 - 0.5%; 2 - 1.0%; 3 - 1.5%; 4 - 2.0%.

С увеличаване на концентрацията на ЕПЗ се повишаваше, макар и слабо и стабилността на пяната, като тя се определяше от способността на повърхностно активното вещество да свързва течната фаза. Тази способност беше свързана и със стабилността на емулсионните системи при центрофугиране.

Проведените изследвания върху кремове с използването на ЕПЗ от *Aeribacillus pallidus* 418 показаха, че полизахаридът притежава повърхностна активност и понижава повърхностното напрежение на крема, както и добра пенообразуваща способност, което предполага добра перспектива за приложението му като емулгатор, стабилизатор и пенообразувател за различни дисперсни продукти за козметичната и хранителна промишленост.

5. Заключение

Българските горещи извори се оказаха естествена ниша за обитание на термофилни продуценти на екзополизахариди. От хидротермални извори в България бяха изолирани термофилни аеробни спорообразуващи бактерии, отнесени към четири вида - *Aeribacillus pallidus*, *Geobacillus toebii*, *Brevibacillus thermoruber* and *Anoxybacillus kestanbolensis*. Максимална продукция беше установена за щам 418, чиито филогенетични и фенотипни свойства го определиха като принадлежащ към вида *A. pallidus*. Малтозата и NH_4Cl бяха установени като съответно най-добри въглероден и азотен източници и нивото на продукция беше увеличено повече от два пъти в процеса на оптимизиране на културалните условия. За първи път беше проследено влиянието на разбъркването и аерацията в термофилни ферментационни процеси за микробна екзополизахаридна продукция. Възможността на *A. pallidus* 418 да расте и синтезира полизахарид беше изследвана в два вида биореактори с механично разбъркване при различни скорости на въздушния поток и на разбъркване, като беше регистрирана максимална екзополизахаридна продукция от 170 $\mu\text{g/ml}$. Бяха определени коефициентът на масопренасяне (k_La) и скоростта на кислородна консумация от микробната култура (OUR). След пречистване на полимерната фракция беше установено присъствието на два различни екзополизахарида, електронеутралният ЕПЗ 1 и отрицателно зареденият ЕПЗ 2 в съотношение 3:2.2. Установено беше, че са хетерополизахариди, изградени от необичайно високо разнообразие от захари, като и в двата беше най-високо количеството на манозата. При проучване перспективата за индустриално използване на ЕПЗ, синтезиран от термофилния щам *A. pallidus* 418 бяха установени добри емулгиращи свойства. Установена беше стабилност на емулсиите олио – вода, ниски нива на отделената водна фаза и висока диспергираща стабилност. Проучено беше и синергичното взаимодействие между синтезирания ЕПЗ от *A. pallidus* 418 и други, използвани в промишлеността хидроколоиди, като най-добри резултати бяха получени при опитите с ксантан. Реологичните характеристики на ЕПЗ от *A. pallidus* 418, както и добрите пенообразуващи свойства позволиха подобряване на качеството на козметичен крем след включването в състава му.

6. Изводи:

На базата на направените изследвания и получените от нас резултати можем да направим следните изводи:

1. От района на Южна и Югозападна България са изолирани 38 оригинални термофилни бактериални щама, продуциращи ЕПЗ.
2. Въз основа на неговите филогенетични, морфологични, физиологични и биохимични свойства най-високо продуктивният шам е определен като принадлежащ към вида *Aeribacillus pallidus*.
3. При оптимизиране на хранителната среда малтозата и амониевият хлорид са избрани съответно като най-добър въглероден и азотен източници. Максимална полизахаридна синтеза е наблюдавана при температура 55°C и рН 7.0.
4. Разработен е къс ферментационен процес, при който максимална продукция е постигната само за 18 ч.
5. При изследване влиянието на аерирането и разбъркването при култивиране в лабораторни ферментори е наблюдавана по-голяма зависимост на синтезата от разбъркването в сравнение с аерирането.
6. Разработена е лабораторна технология за синтеза на ЕПЗ в непрекъснати култури, в които синтезата запазва високи нива, а полученият продукт е с много висока степен на чистота.
7. В резултат на пречистване на полизахаридната фракция е установено, че тя се състои от два компонента – електронеутрален екзополisahарид (ЕПЗ 1) и отрицателно натоварен екзополisahарид (ЕПЗ 2).
8. Двата полизахарида са хетеро-полизахариди, изградени съответно от шест различни монозахарида за ЕПЗ 1 и седем различни монозахарида за ЕПЗ 2. Основен монозахариден компонент и в двата полизахарида е манозата: при ЕПЗ 1 - 69.3 % и при ЕПЗ 2 - 33.9 %.
9. Синтезираните полимери показват високо молекулно тегло - от 700 и 1000 кДа) и сравнително висока термостабилност – разграждането им започваше при 160 и 226°C съответно за ЕПЗ 1 и ЕПЗ 2.
10. Полизахаридната фракция от *Aeribacillus pallidus* 418 показва добри емулгиращи свойства при самостоятелно използване. В комбинация с промишлено използвани хидроколоиди се наблюдава синергичен ефект.

Най-добра стабилност на емулсията е наблюдавана за емулсиите, получени с добавка на ксантан гум.

- 11. Добавянето на ЕПЗ в козметичен крем води до увеличаване на пенообразуващата способност, стабилността на пяната и силата, необходима за разрушаване на емулсията.**

Приноси:

- 1. В Институт по микробиология, БАН е създадена колекция от термофилни бактериални продуценти на екзополизахариди, изолирани от български горещи извори.**
- 2. За първи път е изолиран ЕПЗ продуцент, принадлежащ към род *Aeribacillus*.**
- 3. В резултат на оптимизиране състава на хранителната среда и условията за култивиране полимерната синтеза е повишена повече от два пъти.**
- 4. За първи път са оптимизирани условията на аерация и разбъркване при синтеза на ЕПЗ от термофили в лабораторен ферментор.**
- 5. Разработеният ферментационен процес е сред най-късите за ЕПЗ синтеза.**
- 6. За първи път е осъществена ЕПЗ синтеза от микроорганизми в условия на непрекъснато култивиране.**
- 7. В състава на двата пречистени ЕПЗ е установено присъствие на необичайно висок брой различни монозахари.**
- 8. Показаните добри емулсионни способности на синтезираната полизахаридна фракция очертава перспективата за индустриалното използване на щама.**
- 9. Включването на ЕПЗ от *A. pallidus* 418 в състава на козметичен крем води до подобряване на качеството на крема.**

Публикации, свързани с дисертационния труд

1. Radchenkova, N., Vassilev, S., Panchev, I., Anzelmo, G., Tomova, I., Nicolaus, B., Kuncheva, M., Petrov, K., Kambourova, M. (2013). Production and properties of two novel exopolysaccharides synthesized by a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171, 31-43.

IF (2012) 1.893

2. Radchenkova, N., Vassilev, S., Martinov, M., Kuncheva, M., Panchev, I., Vlaev, S., Kambourova, M. (2014). Optimization of aeration and agitation speed on exopolysaccharide production by *Aeribacillus pallidus* 418 and emulsifying properties of the product. *Process Biochemistry* (in press).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.010>

IF (2012) 2.41

3. Radchenkova, N., Mandeva, R., Kambourova, M. (2010). Exopolysaccharides from thermophilic bacteria. *Scientific works volume LVII "Food science, engineering and technologies"* 495-500.

4. Radchenkova, N., Vassilev, S., Kambourova, M. (2012). Biosynthesis of exopolysaccharide from *Aeribacillus pallidus* 13-2 under different aeration and mass transfer. *Scientific works volume LIX "Food science, engineering and technologies"* 632- 635.

5. Vlaev, S., Martinov, M., Radchenkova, N. (2010). Mixing and aeration in EPS solutions related to extremophilic fermentations. *Scientific works volume LVII "Food science, engineering and technologies"* 389- 394.

6. Martinov, M., Radchenkova, N., Vlaev, S., Kambourova, M. (2010). Gas- liquid mass transfer coefficient in stirred batches containing EPS produced by thermophilic cells. *Scientific works volume LIX "Food science, engineering and technologies"* 806-810.

7. Vlaev, S., Martinov, M., Radchenkova, N., Kambourova M. (2013). Production of polysaccharides by bacterial strains from Bulgarian geothermal springs: engineering parameters et elevated scale. *International Multidisciplinary Scientific Geoconference SGEM* 219-226.

8. Panchev, I., Marudova, M., Dobрева, Sv., Kambourova, M., Radchenkova, N., Kuncheva, M. (2013). Physical characteristics of emulsion cosmetic creams containing exopolysaccharide extracted from *Aeribacillus pallidus* 13-2. *Scientific works volume LX "Food science, engineering and technologies"* 476-481.

- 9.** Radchenkova N., Kambourova, M., Vassilev, S., Alt, R., Markov, S. On the mathematical modelling of EPS production by a thermophilic bacterium. International conference on Mathematical Methods and Models in Biosciences (BIOMATH) 16 - 21 June 2013, Sofia.