

УДК 57.088.6

© 1992 г. ВОЦЕЛКО С.К., ПИРОГ Т.П., МАЛАШЕНКО Ю.Р.,  
ГРИНБЕРГ Т.А.

## МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБНЫХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ

Разработан экспресс-метод определения молекулярно-массового распределения микробных экзополисахаридов (ЭПС) путем их аналитического центрифугирования в комбинированном градиенте плотности солей NaCl и CsCl с использованием в качестве стандартов молекулярных масс декстранов.

Одновременно градиентное центрифугирование декстранов и исследуемых ЭПС позволяет значительно упростить и ускорить определение молекулярных масс исследуемых фракций ЭПС.

Разработанный метод позволяет анализировать нативные ЭПС с молекулярной массой, находящейся в диапазоне 13,7 тыс. – 2 млн.

Метод может быть использован в научно-исследовательских работах, а также в условиях производства ЭПС.

Широкий интерес к микробным экзополисахаридам (ЭПС) обусловлен их биологически активными и физико-химическими свойствами, которые определяются структурой биополимера в целом, но в значительной степени зависят от соотношения в составе ЭПС фракций различной молекулярной массы, т.е. их молекулярно-массовой неоднородности. При оценке синтезирующей способности штаммов – продуцентов ЭПС, отработке режимов культивирования и выделения ЭПС с целью получения препаратов с различными свойствами необходимо контролировать их молекулярно-массовые параметры. При этом исследователю приходится анализировать большое количество образцов, что диктует необходимость разработки специфических и более «быстрых» методов, чем существующие (электрофорез, гель-хроматография и др.).

Для анализа молекулярных масс белков, нуклеиновых кислот, вирусов применяют методы аналитического центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [4], хлористого цезия [8]. С целью повышения качества разделения компонентов исследуемого вещества по молекулярной массе используют градиент плотности CsCl и трибуфера с ЭДТА, смесь вольфраматов щелочных и щелочно-земельных металлов и NaCl, MgCl<sub>2</sub> [5].

Однако методы градиентного центрифугирования не нашли широкого применения при изучении микробных ЭПС. Так, в литературе приводятся данные по использованию этого метода для определения молекулярно-массовой неоднородности ксантана [7]. Описанный метод включает следующие этапы: фракционирование ксантана, получение флуоресцентных производных и центрифугирование отдельных фракций ЭПС в градиенте плотности хлористого натрия (1,03–1,05 г/см<sup>3</sup>), определение положения фракций в градиенте с помощью флуоресцентного спектрофотометра, расчет коэффициентов седиментации и диффузии, расчет молекулярных масс фракций ЭПС. Таким образом, недостатком данного методического подхода является длительность анализа из-за необходимости фракционирования ЭПС и исследования отдельных его фракций, проведение громоздких расчетов для определения молекулярной массы. Кроме того, метод позволяет определить молекулярную массу ЭПС в недостаточно широком интервале ее значений.

Целью наших исследований являлась разработка метода молекулярно-массового распределения (ММР) нативных ЭПС в интервале значений молекулярной массы от 13,7 тыс. до 2 млн.

### Материалы и методы исследования

Методическим подходом для решения поставленной задачи было избрано центрифугирование в комбинированном градиенте плотности солей NaCl и CsCl [1].

Объектом исследований являлись ЭПС, синтезируемые смешанной культурой бактерий *Acinetobacter* sp., *Micrococcus* sp. и дрожжей *Candida tropicalis* на основе этанола [2], препарат ксантана, полученный из *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8162 [3], а также ксантан фирмы «Sigma». В качестве стандартов молекулярных масс применяли декстраны фирмы «Fluka» с молекулярной массой 13,7; 20; 40; 110; 500 тыс. и 2 млн.

В работе использовали 0,05%-ные растворы ЭПС и 0,02%-ные растворы декстранов в количестве 1,5–5,5 мл. Центрифугирование осуществляли в комбинированном градиенте плотности солей NaCl ( $\rho = 1,03\text{--}1,2$  г/см<sup>3</sup>) и CsCl (1,2–1,6 г/см<sup>3</sup>), взятых в соотношении 5:1 – 1:1 при постоянном суммарном объеме на центрифугах К-32, К-32М (ротор С-30-6-66, объем пробирок 11 мл; ротор У-30-26-384, объем пробирок 38,1 мл), а также на центрифуге «Beckman L-60» (ротор SW-40; объем пробирок 11,5 мл) при 30 000 об/мин в течение 4–19 ч.

Для определения положения декстранов различных молекулярных масс в градиенте осуществляли градиентное центрифугирование как каждого декстрана в отдельности, так и смеси декстранов. Положение декстранов в обоих случаях было одинаковым. При центрифугировании ЭПС в две центрифужные пробирки (из шести) вносили смесь декстранов различных молекулярных масс, в оставшиеся четыре пробирки – анализируемые образцы ЭПС, т.е. в каждом опыте исследовали одновременно распределение в градиенте декстранов, применяемых в качестве стандартов молекулярных масс, и исследуемых ЭПС.

После центрифугирования анализировали содержание углеводов во фракциях (0,25–0,50 мл) по реакции с фенолом и серной кислотой [6].

Для проверки качества молекулярно-массового распределения ЭПС, полученных при аналитическом градиентном центрифугировании, параллельно осуществляли гель-хроматографию исследуемых ЭПС. Гель-хроматографию выполняли на колонке (0,9×80 см) с сефарозой 4В. В работе использовали 0,05%-ные растворы ЭПС в количестве 1–2 мл. Элюцию проводили 0,3М NaCl. Содержание углеводов в собираемых фракциях (1 мл) определяли по реакции с фенолом и серной кислотой. Колонку калибровали по стандартным декстранам фирмы «Fluka».

Для определения индивидуальности фракций ЭПС, полученных в результате градиентного центрифугирования, осуществляли фракционирование ксантана фирмы «Sigma» на центрифуге К-32 в комбинированном градиенте NaCl и CsCl, взятых в соотношении 5:1 при  $n = 30\ 000$  об/мин в течение 19 ч (пробирки объемом 38,1 мл). Объединенные из трех опытов объемы соответствующих фракций диализировали против дистиллированной воды в течение 5 сут с последующим концентрированием в вакууме. Полученные фракции анализировали методом гель-хроматографии.

### Результаты и обсуждение

Как следует из данных, представленных на рис. 1–3, изменяя соотношение объемов растворов солей NaCl и CsCl в зависимости от поставленной исследователем задачи, можно четко разделить нативный ЭПС на фракции различной молекулярной массы. Так, увеличение объема растворов NaCl (соотношение NaCl и CsCl 5:1) дает возможность разделения относительно низкомолекулярных составляющих (до 500 тыс.) (рис. 3), в то время как увеличение объемов растворов CsCl (соотношение NaCl и CsCl 2:1,

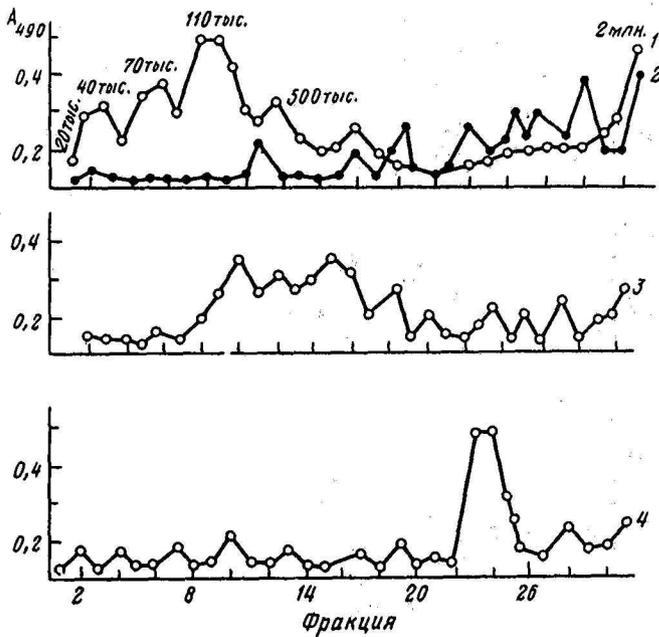


Рис. 1. Молекулярно-массовое распределение декстранов (1), ксантана «Sigma» (2), ЭПС, синтезируемых *X. campestris* 8162 (3), ассоциацией бактерий и дрожжей (4) в комбинированном градиенте плотности солей NaCl и CsCl (соотношение NaCl и CsCl 1:1,  $n = 30\ 000$  об/мин, 19 ч)

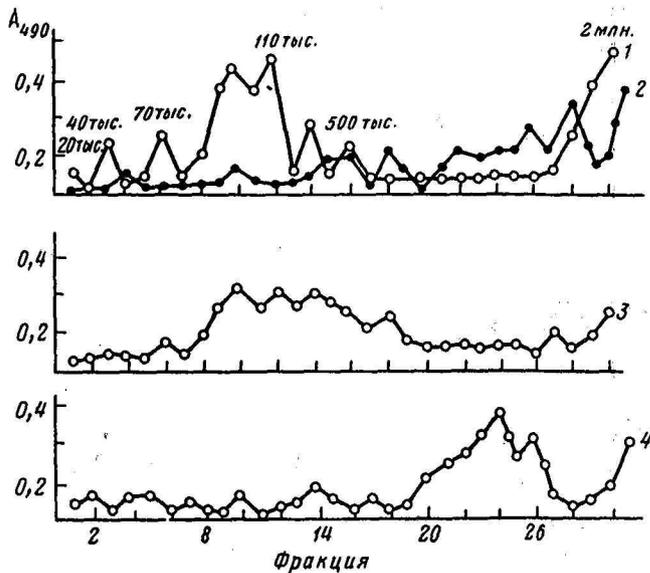


Рис. 2. Молекулярно-массовое распределение декстранов (1), ксантана «Sigma» (2), ЭПС, синтезируемых *X. campestris* 8162 (3), ассоциацией бактерий и дрожжей (4) в комбинированном градиенте плотности солей NaCl и CsCl (соотношение NaCl и CsCl 2:1,  $n = 30\ 000$  об/мин, 19 ч)

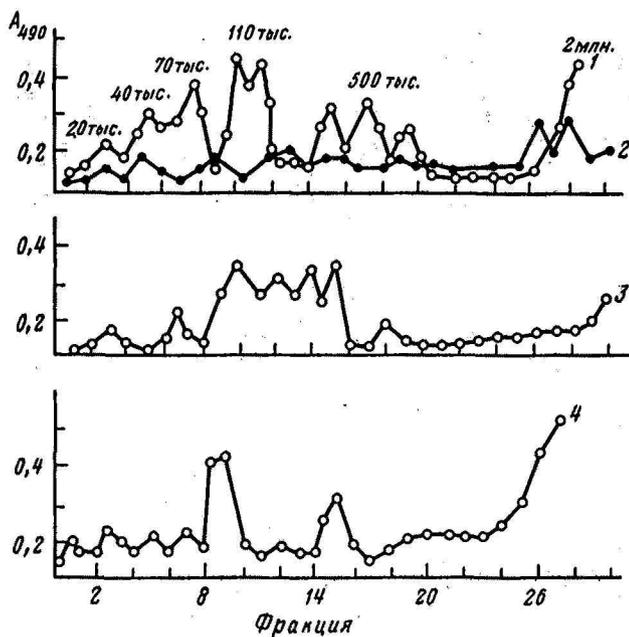


Рис. 3. Молекулярно-массовое распределение декстранов (1), ксантана «Sigma» (2), ЭПС, синтезируемых *X. campestris* 8162 (3), ассоциацией бактерий и дрожжей (4) в комбинированном градиенте плотности солей NaCl и CsCl (соотношение NaCl и CsCl 5:1,  $n = 30\ 000$  об/мин, 19 ч)

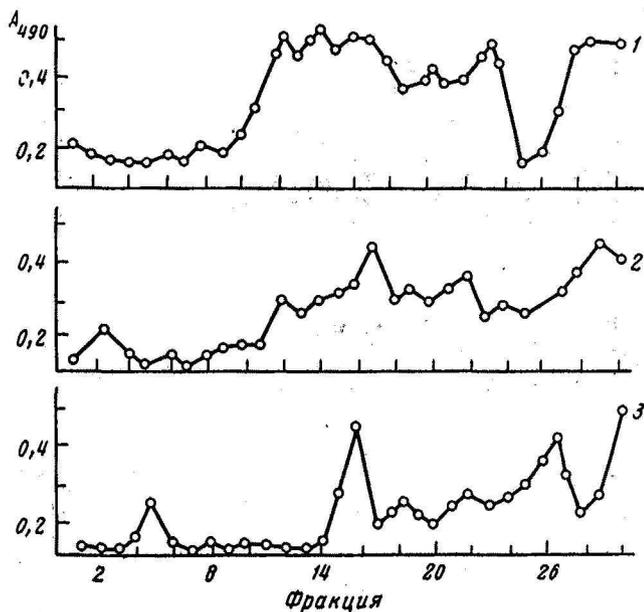


Рис. 4. Молекулярно-массовое распределение ЭПС, синтезируемых *X. campestris* 8162, в комбинированном градиенте плотности солей NaCl и CsCl ( $n = 30\ 000$  об/мин, 19 ч). 1 – соотношение NaCl и CsCl 5:1; 2 – соотношение NaCl и CsCl 2:1; 3 – соотношение NaCl и CsCl 1,4:1

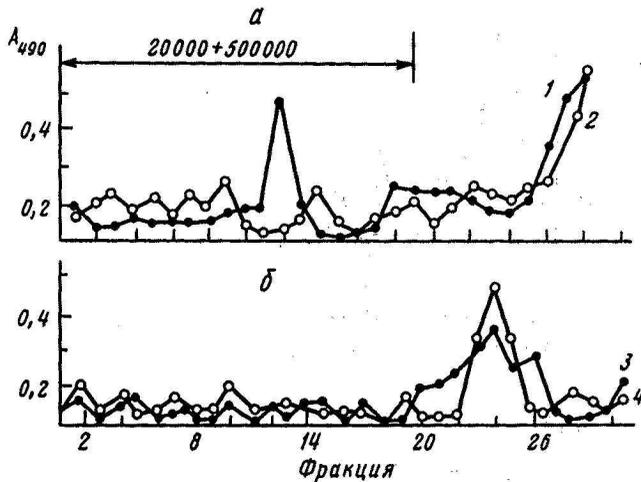


Рис. 5. Молекулярно-массовое распределение ЭПС, синтезируемых ассоциацией бактерий и дрожжей, в градиенте плотности NaCl (а),  $n = 30\ 000$  об/мин, 4 ч (1), 19 ч (2) и в комбинированном градиенте плотности солей NaCl и CsCl (б), соотношение солей NaCl и CsCl 2:1 (3), 1:1 (4),  $n = 30\ 000$  об/мин, 19 ч

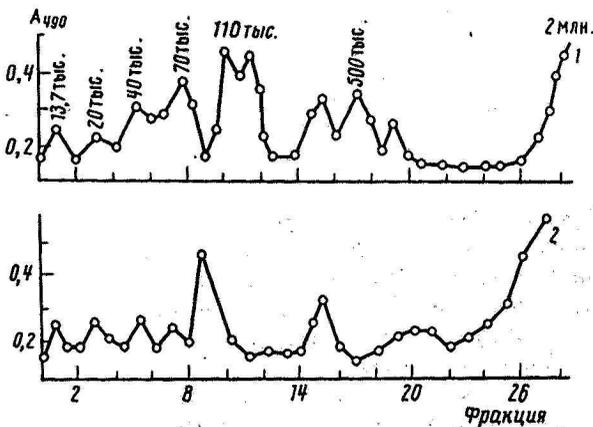


Рис. 6. Молекулярно-массовое распределение декстранов (1) и ЭПС, синтезируемых ассоциацией бактерий и дрожжей (2), в комбинированном градиенте плотности солей NaCl и CsCl (соотношение солей NaCl и CsCl 5:1,  $n = 30\ 000$  об/мин, 19 ч)

1:1), обладающих более высокой плотностью, позволяет успешно разделить высокомолекулярные фракции от 500 тыс. до 2 млн. (рис. 1, 2). Аналогичные выводы можно сделать, анализируя данные молекулярно-массового распределения, представленные на рис. 4.

Увеличение плотности растворов NaCl до  $1,20\ \text{г/см}^3$  позволяет получить молекулярно-массовое распределение компонентов ЭПС с молекулярной массой 20–500 тыс., т.е. в этом случае удается расширить нижнюю границу определяемых молекулярных масс от 180 тыс. до 20 тыс. (рис. 5) по сравнению с методом, описанным в литературе [7]. Время центрифугирования, равное 4 ч, является недостаточным для разделения компонентов различных молекулярных масс по сравнению с центрифугированием в течение 19 ч (рис. 5). Следует отметить, что время центрифугирования может составлять 6–19 ч в зависимости от степени неоднородности по молекулярной массе исследуемых ЭПС.

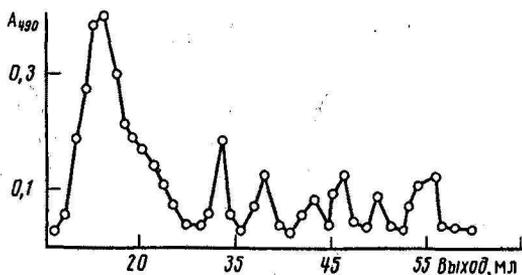


Рис. 7. Элюционный профиль ксантана «Sigma» при гель-хроматографии на колонке с сепарозой 4В (0,9×80 см)

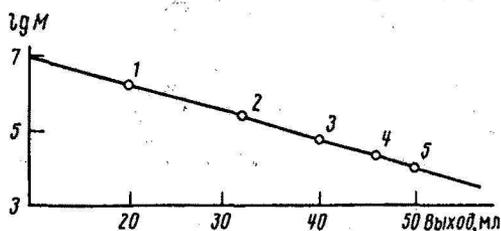


Рис. 8. Зависимость объема выхода декстранов от их молекулярных масс на колонке с сепарозой 4В (0,9×80 см). 1 – 2 млн., 2 – 520 тыс., 3 – 110 тыс., 4 – 70 тыс., 5 – 40 тыс.

Для разделения фракций ЭПС с молекулярной массой более 500 тыс. использовали растворы CsCl плотностью 1,20–1,60 г/см<sup>3</sup> (рис. 5). Применение растворов CsCl более высокой плотности при создании комбинированного градиента, равно как и увеличение числа оборотов центрифуги свыше 30 000 об/мин, ограничено техническими возможностями отечественных и зарубежных центрифуг.

Использование комбинированного градиента плотности NaCl (1,03–1,20 г/см<sup>3</sup>) и CsCl (1,20–1,60 г/см<sup>3</sup>) дает возможность одновременного расширения нижнего и верхнего пределов диапазона определяемых молекулярных масс (рис. 6) (менее 20 тыс. по сравнению с использованием градиента плотности только NaCl; 500 тыс. – 2 млн. в результате введения в градиент растворов CsCl плотностью до 1,6 г/см<sup>3</sup>).

Результаты, полученные при использовании разработанного метода определения молекулярно-массовой неоднородности микробных ЭПС, соответствуют данным гель-хроматографии (рис. 3 и 7 для ксантана фирмы «Sigma»).

Следует отметить, что кривые молекулярно-массового распределения, полученные при градиентном центрифугировании, являются «зеркальным отражением» элюционных профилей ЭПС при гель-хроматографии, так как при гель-хроматографии высокомолекулярные фракции элюируются ранее низкомолекулярных, а при градиентном центрифугировании наоборот, т.е. высокомолекулярные компоненты содержатся в последних фракциях. Значения молекулярных масс отдельных компонентов ксантана «Sigma», определенные методом гель-хроматографии (рис. 7 и 8) и разработанным нами методом (рис. 3), совпадают.

Определение индивидуальности фракции ксантана «Sigma», полученных при градиентном центрифугировании, показало, что каждый «пик», соответствующий положению компонента ЭПС определенной молекулярной массы в градиенте, элюируется отдельным пиком и при гель-хроматографии (рис. 3 и 9). Кроме того, молекулярная масса отдельных фракций ксантана, полученных в результате фракционирования на центрифуге К-32 и определенная методом гель-хроматографии, точно соответствует

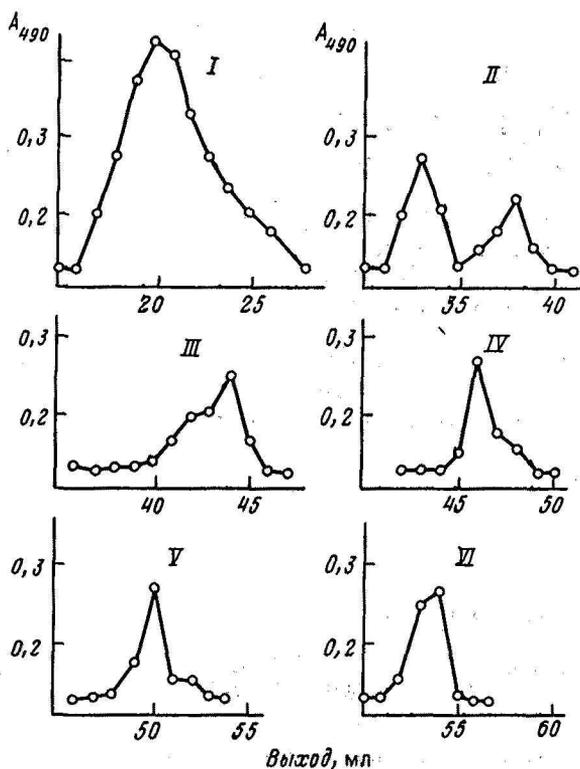


Рис. 9. Элюционные профили фракций I-IV ксантана «Sigma» при геле-хроматографии на колонке с сефарозой 4В (0,9×80 см). I - 2 млн., II - 500 тыс., III - 110 тыс., IV - 70 тыс., V - 40 тыс., VI - 20 тыс.

значениям, полученным при центрифугировании в комбинированном градиенте плотности растворов NaCl и CsCl нативного ксантана, не разделенного на фракции, что является подтверждением индивидуальности отдельных фракций ЭПС и доказательством того, что использование разработанного метода не снижает качества анализа ЭПС.

Таким образом, предложенный метод определения молекулярно-массовой неоднородности микробных ЭПС по сравнению с описанным в литературе имеет ряд преимуществ:

1. Исследование растворов нативных микробных ЭПС исключает необходимость предварительного фракционирования ЭПС и их отдельного градиентного центрифугирования.

2. Применение имеющих стандартную молекулярную массу декстранов значительно упрощает определение молекулярных масс анализируемых образцов, не требует расчетов гидродинамических параметров.

3. Использование комбинированного градиента плотности растворов NaCl и CsCl позволяет определить молекулярную массу ЭПС в интервале от 13,7 тыс. до 2 млн.

4. Метод позволяет одновременно анализировать несколько нативных микробных полисахаридов (от 4 до 9 проб) в зависимости от возможностей центрифуги.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Воцелко С.К., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р. и др.* Способ определения молекулярно-массовой неоднородности микробных полисахаридов. А.с. 1451166 СССР, МКИ<sup>4</sup> С 12 Р 19/00: С 01 № 11/10. БИ. 1989. № 2. С. 85.
2. *Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Буклова В.Н., Малащенко Ю.Р.* // Микробиология. 1990. Т. 59. Вып. 5. С. 797.
3. *Гвоздяк Р.И., Матышевская М.С., Григорьев Е.Ф., Литвинчук О.А.* Микробный полисахарид ксантан. Киев: Наук. думка, 1989. С. 211.
4. *Дяченко Н.С., Воцелко С.К., Ванцак Н.П.* // Микробиол. журн. 1972. Т. 34. № 2. С. 206.
5. *Остерман Л.А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1974. 286 с.
6. *Dubois M., Gilles K., Hamilton J. et al.* // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350.
7. *Holzwarth G.* // Carb. Research. 1978. V. 66. P. 173.
8. *Martin R.G., Ames B.N.* // J. Biol. Chem. 1961. V. 236. № 5. P. 1372.

Институт микробиологии и  
вирусологии АН Украины,  
Киев

Поступила в редакцию  
2.IV.1991  
Рецензент Л.О. Северина

VOTSELKO S.K., PIROG T.P., MALASHENKO Yu.R., GRINBERG T.A.

### METHOD OF DETERMINATION OF THE EXOPOLYSACCHARIDES MOLECULAR MASS DISTRIBUTION

An express-method of the determination of the microbial exopolysaccharides (EPS) molecular mass distribution by NaCl and KCl combined density gradient centrifugation was developed. Dextrans with various molecular masses were used as standards.

The simultaneous gradient centrifugation of dextrans and EPS studied allows to simplify and accelerate considerably the determination of molecular masses of EPS fractions under investigation.

This method allows to analyze native EPS molecular masses within a range from 13,700 to 2,000,000.

It can be applied both for scientific researches and for industrial production of EPS.