

Пирог, Т.П. Образование экзополисахарида этаполана при выращивании *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 на смеси фумарата и глюкозы / Т. П. Пирог, Н. В. Высятецкая, Ю. В. Корж // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 6. – С.790–796.

УДК 579.841: 577.114

ОБРАЗОВАНИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ *ACINETOBACTER* SP. ИМВ В-7005 НА СМЕСИ ФУМАРАТА И ГЛЮКОЗЫ

Пирог Т.П., Высятецкая Н.В., Корж Ю.В.

*Институт микробиологии и вирусологии Национальной академии наук
Украины, Киев*

Установлена возможность интенсификации синтеза микробного экзополисахарида (ЭПС) этаполана (продуцент - *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005) на смеси фумарата (энергетически избыточный субстрат) и глюкозы (энергетически дефицитный субстрат). Введение фумарата натрия (калия) в среду с глюкозой в молярном соотношении 4:1 дало возможность увеличить количество синтезированных ЭПС в 1.3-2.2 раза, их выход по отношению к биомассе – в 1.3-2 раза по сравнению с выращиванием на моносубстратах. Максимальная трансформация углерода обоих субстратов в ЭПС (до 53 %) наблюдалась при соотношении углерод/азот в среде культивирования, равном 70.5, и использовании посевного материала, выращенного на моносубстрате глюкозе.

Ключевые слова: энергетически избыточный субстрат, энергетически дефицитный субстрат, интенсификация биосинтеза, экзополисахариды

В предыдущих работах нами была показана возможность увеличения синтеза микробного экзополисахаридного препарата (ЭПС) этаполана при

выращивании *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 на смеси энергетически неравноценных субстратов (этанол + глюкоза) [1-4]. На основе теоретических расчетов энергетических потребностей синтеза биомассы и ЭПС на энергетически дефицитном субстрате (глюкоза) определена “дополняющая” концентрация энергетически избыточного субстрата (этанол), позволяющая восполнить потери углерода глюкозы при окислении ее до CO_2 с целью получения энергии для процессов конструктивного метаболизма. Введение этанола в среду с глюкозой в молярном соотношении 3,1:1 сопровождалось увеличением количества синтезированных ЭПС, а также их выхода от субстрата по сравнению с выращиванием продуцента на моносубстратах.

На основании изучения особенностей энергетического и конструктивного метаболизма *Acinetobacter* sp. В В-7005 [5] и основных положений энергетической классификации субстратов Бабея [6] мы предположили, что потенциальным энергетически избыточным субстратом для продуцента этаполана может являться фумарат.

В связи с этим целью настоящей работы было исследовать некоторые закономерности синтеза этаполана на смеси фумарата и глюкозы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектом исследований являлся штамм бактерий *Acinetobacter* sp.– продуцент комплексного полисахаридного препарата этаполана [7]. Штамм депонирован в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины под номером В-7005.

Этаполан состоит из ацилированного (АП) и неацилированного (НАП) полисахаридов, которые аналогичны по молярному соотношению D-глюкозы, D-маннозы, D-галактозы, L-рамнозы, D-глюкуроновой и пировиноградной кислот (3:2:1:1:1:1) и структуре повторяющейся единицы углеводной цепи. Различие между этими ЭПС состоит в том, что АП

содержит жирные кислоты (C_{12} - C_{18}): лауриновую, пальмитиновую, пальмитолеиновую, стеариновую и олеиновую [2].

Культивирование *Acinetobacter* sp. B-7005. Культивирование осуществляли в колбах на качалке (220 об/мин) при 30 °С в течение 16 – 96 ч на жидких минеральных средах следующего состава, г/л: (*среда 1*) KH_2PO_4 – 3.4; KOH – 0.9; NH_4Cl – 0.4; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.4; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0.1; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0.001; (*среда 2*) KH_2PO_4 – 3.4; NH_4Cl – 0.4; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.4; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0.1; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0.001; (*среда 3*) KH_2PO_4 – 2.0; NH_4Cl – 0.4; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0.4; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 0.1; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 0.001. В среды дополнительно вносили 0.5 % по объему) дрожжевого автолизата и 0.0009 % пантотената кальция (витамин B_5). Штамм *Acinetobacter* sp. B-7005 является ауксотрофом по этому витамину. В качестве источника углерода и энергии использовали:

- 1) моносубстрат глюкозу в концентрации 1.85 %;
- 2) моносубстраты фумарат натрия и фумарат калия в концентрации 2.5 и 2.9 % соответственно;
- 3) смесь фумарата натрия (0.9; 1.35; 1.8; 2.25; 2.7 %) и глюкозы (0.5 %) в молярном соотношении 2:1; 3:1; 4:1; 5:1; 6:1 соответственно;
- 4) смесь глюкозы (0.5 %) и фумарата калия (2.1 %).

Концентрации моносубстратов эквимоллярны по углероду концентрации смешанных субстратов в молярном соотношении фумарата и глюкозы 4:1 (фумарат натрия 1.8 % + глюкоза 0.5 % или фумарат калия 2.1 % + глюкоза 0.5 %). Используемые концентрации фумарата натрия и фумарата калия эквимоллярны по углероду. В одном из экспериментов изменяли концентрацию глюкозы в смешанном субстрате (0.25; 0.75; 1.0 %), оставляя постоянной концентрацию фумарата натрия - 1.8 % (молярное соотношение концентраций фумарата и глюкозы составляло 5:1; 3:1; 2:1 соответственно).

При исследовании зависимости синтеза этаполана от соотношения концентраций фумарата и глюкозы в смешанном субстрате культивирование продуцента осуществляли на среде 3. Поскольку при изменении

концентраций субстратов в среде культивирования меняется соотношение углерод/азот (от 45 до 96), в одном из вариантов опыта этот показатель поддерживали на оптимальном для синтеза этаполана уровне – 70.5.

В качестве посевного материала использовали культуру из экспоненциальной фазы роста (18 – 24 ч роста), выращенную на средах 1, 2 и 3. Как источник углерода при получении посевного материала использовали глюкозу (0.5 %), фумарат калия (0.8 %), фумарат натрия (0.7 %).

Показатели роста и синтеза ЭПС (концентрация биомассы (АСБ) и ЭПС, ЭПС-синтезирующая способность, выход ЭПС от субстрата) определяли как описано в работе [1].

Концентрацию глюкозы в культуральной жидкости определяли глюкозооксидазным методом [8], фумарата – по методу Штотца [9].

Определение энергетических затрат на синтез биомассы и ЭПС. Расчет энергетических затрат на образование биомассы проводили, как описано в работе [6]. Определение энергетических потребностей синтеза ЭПС осуществляли, как описано в работах [2, 10].

Все эксперименты осуществляли в трехкратной повторности, статистическую обработку результатов проводили, используя критерий Стьюдента при 5 %-ном уровне значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Расчет соотношения концентраций фумарата и глюкозы при выращивании *Acinetobacter* sp. B-7005 на их смеси. Для установления соотношения концентраций энергетически неравноценных субстратов в среде культивирования продуцента этаполана необходимо рассчитать энергетические потребности синтеза биомассы и ЭПС на энергетически дефицитном субстрате и определить концентрацию энергетически избыточного субстрата, восполняющую потери углерода энергетически дефицитного субстрата при окислении его до CO_2 с целью получения энергии, необходимой для процессов конструктивного метаболизма [2].

При расчете оптимального соотношения концентраций фумарата и глюкозы при росте штамма В-7005 на их смеси нами были приняты следующие допущения [2]:

- фумарат преимущественно используется в качестве источника энергии, на синтез биомассы и ЭПС расходуется углерод глюкозы;
- 50 % глюкозы катаболизируется по пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса и 50 % - по пути Энтнера-Дудорова;
- соотношение Р/О равно 2;
- ЭПС содержит 50 % АП и 50 % НАП;
- в составе повторяющегося звена АП содержится два остатка жирных кислот - лауриновой ($C_{12}H_{24}O_2$) и пальмитиновой ($C_{16}H_{32}O_2$);
- НАДФН, образующийся при катаболизме фумарата и глюкозы, является источником восстановительных эквивалентов, которые окисляются до воды через дыхательную цепь.

Потребность в АТФ для синтеза этаполана из глюкозы. Расчет энергетических потребностей синтеза этаполана аналогичен представленному в работе [2]. АТФ расходуется на синтез моносахаридов и жирных кислот, а генерируется при синтезе пировиноградной (ПВК), глюкуроновой кислот и ацетил-КоА (предшественника жирных кислот) [2].

Энергетические потребности синтеза звена АП и НАП в пересчете на моль использованной глюкозы представлены в табл. 1.

В соответствии с расчетами, изложенными в работе [2], генерация энергии при синтезе этаполана составляет 1.42 моль АТФ/моль использованной глюкозы.

Энергетические затраты при синтезе биомассы. Синтез биомассы из фосфоглицерата (ФГК) (при использовании аммонийного источника азота) можно представить в виде уравнения [6]:



где $(\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_1)_3$ – формула моля биомассы.

Суммарная реакция превращения глюкозы в ФГК (при P/O=2) выражается следующим уравнением [2, 6] :



На основании энзимологических исследований штамма *Acinetobacter* sp. В-7005 [5] суммарную реакцию превращения фумарата в ФГК (при P/O=2) можно представить в виде уравнения:



Исходя из уравнения синтеза биомассы из ФГК (уравнение 1) и уравнения катаболизма глюкозы до ФГК (уравнение 2) можно рассчитать, что при росте на глюкозе потребность в АТФ для синтеза биомассы (в расчете на моль глюкозы) составляет 17 моль. Мы считаем, что эта энергия может быть получена из фумарата. Учитывая, что при синтезе ЭПС из глюкозы генерируется 1.42 АТФ/моль использованной глюкозы, за счет фумарата должно быть получено $17 - 1.42 = 15.58$ моль АТФ. Из уравнения 3 следует, что для получения такого количества АТФ необходимо 3.9 моль фумарата. Следовательно, молярное соотношение фумарата и глюкозы в среде должно составлять 3.9:1 (4:1). Например, при концентрации глюкозы в среде 0.5 % (5 г/л, или 0.028 молей) концентрация фумарата должна составлять 0.11 молей, что соответствует 17.6 (18) г/л фумарата натрия или 21.1 (21) г/л фумарата калия.

Зависимость синтеза этаполана на смеси фумарата и глюкозы от способа приготовления посевного материала и состава среды. Эксперименты показали, что при выращивании *Acinetobacter* sp. В-7005 на смеси фумарата натрия и глюкозы не наблюдается явления катаболитной репрессии, оба субстрата потребляются одновременно (рис. 1). На рис. 1 представлен характер изменения в процессе роста бактерий концентраций фумарата натрия и глюкозы при теоретически рассчитанном их соотношении (4:1). Установлено, что независимо от исследуемых в данной работе соотношений концентраций этих моносубстратов они ассимилируются штаммом *Acinetobacter* sp. В-7005 одновременно.

В табл. 2 представлены показатели синтеза этаполана на фумарате натрия, глюкозе и смеси этих субстратов. При культивировании продуцента этаполана на смешанном субстрате количество синтезированных ЭПС и ЭПС-синтезирующая способность были существенно (в 1.3-2.2 раза) выше по сравнению с выращиванием на соответствующих моносубстратах. Следует отметить, что такая закономерность наблюдалась независимо от способа подготовки посевного материала.

К концу культивирования *Acinetobacter* sp. В-7005 на среде 1 с фумаратом натрия и глюкозой рН культуральной жидкости повышалось до 9.2-9.4 (фумарат транспортируется в клетки бактерий вместе с протоном), в то время как оптимум для синтеза этаполана составляет 6.8-8.0 [7]. В связи с этим мы предположили, что исключение из состава среды КОН (щелочной составляющей буфера) даст возможность сдвинуть рН к оптимальному для синтеза этаполана уровню и таким образом увеличить количество образуемых ЭПС. Как видно из представленных в табл. 3 данных, при выращивании *Acinetobacter* sp. В-7005 на среде 3, в которой отсутствовал КОН, а содержание K_2HPO_4 снижено до 2 г/л, показатели синтеза ЭПС были максимальными. Следует отметить, что при использовании посевного материала, выращенного на глюкозе, количество синтезированных ЭПС, ЭПС-синтезирующая способность и выход ЭПС от субстрата на среде 3 были выше по сравнению с применением инокулята, выращенного на фумарате натрия (табл. 3). В дальнейших экспериментах культивирование *Acinetobacter* sp. В-7005 осуществляли на среде 3 с использованием посевного материала, выращенного на глюкозе.

Ранее [11] нами было показано, что при выращивании продуцента этаполана на смеси ацетата натрия и глюкозы показатели синтеза ЭПС были почти в два раза выше по сравнению с культивированием бактерий на смеси ацетата калия и глюкозы. В работе [11] мы предположили, что эти результаты могут свидетельствовать об участии катионов натрия в создании ионных градиентов на мембране, необходимых для генерации

протондвижущей силы, которая используется для активного транспорта ацетата в клетки *Acinetobacter* sp. В-7005. Активный транспорт ацетата в клетки данных бактерий был установлен нами полярографическим методом с использованием протонофора карбонилцианид-*n*-трифторметоксифенилгидразона (FCSP).

Результаты, представленные на рис. 2, показывают, что при замене в смешанном субстрате фумарата натрия на фумарат калия показатели синтеза этаполана практически не изменялись. Таким образом, вполне вероятно, что закономерности транспорта ацетата и фумарата в клетки *Acinetobacter* sp. В-7005 различны.

Влияние соотношения концентраций фумарата и глюкозы на синтез этаполана. Результаты исследований зависимости синтеза этаполана от соотношений концентраций фумарата натрия и глюкозы в смешанном субстрате представлены в табл. 4. Необходимого молярного соотношения концентраций субстратов достигали, изменяя концентрацию фумарата натрия при неизменной концентрации глюкозы, или изменяя содержание глюкозы в смешанном субстрате при постоянной концентрации фумарата. Эксперименты показали, что максимальные показатели синтеза ЭПС наблюдаются при теоретически рассчитанном соотношении фумарата и глюкозы, равном 4:1 (табл. 4). Следует однако отметить, что результаты, представленные в табл. 4, нельзя трактовать однозначно, поскольку в среде изменяли не только молярное соотношение субстратов, но и концентрацию источников углеродного питания, а также соотношение C/N в среде культивирования, которое варьировало от 45 до 96 (табл. 4). Как известно из литературы, соотношение углерод/азот оказывает существенное влияние на биосинтез микробных полисахаридов [7]. Для исключения влияния этого фактора на синтез этаполана в дальнейших экспериментах мы изменяли соотношение фумарата и глюкозы в среде, поддерживая соотношение C/N на постоянном уровне, равном 70.5. Такое соотношение углерод/азот было нами выбрано по двум причинам: это значение обеспечивало наиболее

высокие показатели синтеза этаполана на смеси энергетически неравноценных C₂-C₆-субстратов, как было показано нами ранее [1], а также при соотношении C/N, равном 70.5, наблюдали максимальный синтез ЭПС на смеси фумарата и глюкозы (табл. 4). Результаты экспериментов по зависимости образования этаполана от соотношения концентраций субстратов при постоянном значении C/N представлены в табл. 5. Максимальная концентрация ЭПС (9.5 г/л) и максимальный выход ЭПС от субстрата (53 %) наблюдались при теоретически рассчитанном молярном соотношении фумарата и глюкозы, равном 4:1.

Ранее [7] нами было показано, что в процессе выращивания продуцента этаполана на среде с этанолом внесение в стационарной фазе фумарата натрия (или калия) порциями по 0.2 % сопровождалось стехиометрическим превращением его в ЭПС. Роль экзогенного фумарата при культивировании *Acinetobacter* sp. В-7005 на этаноле состоит в усилении глюконеогенеза, что было подтверждено нашими энзимологическими исследованиями [5]. Так, в работе [5] показано, что при наличии в среде с этанолом фумарата существенно повышается активность как ферментов глиоксилатного цикла, так и глюконеогенеза.

Роль фумарата в повышении синтеза этаполана на среде с глюкозой, установленная в данной работе, заключается в том, что являясь энергетически избыточным субстратом, он компенсирует потери углерода глюкозы при окислении ее до CO₂ с целью получения энергии для конструктивного метаболизма, повышая тем самым эффективность трансформации углерода обоих субстратов в ЭПС. Вместе с тем, нельзя исключать и возможности усиления глюконеогенеза при культивировании продуцента этаполана на среде с фумаратом и глюкозой.

Таким образом, в результате проведенной работы показана возможность интенсификации синтеза микробного полисахарида этаполана на смеси энергетически неравноценных субстратов (глюкоза + фумарат). Установлены условия культивирования (способ приготовления посевного

материала, соотношение концентраций субстратов и соотношение углерод/азот), обеспечивающие максимальную конверсию углерода субстратов в ЭПС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В., Криштаб Т.П. Интенсификация синтеза экзополисахарида этаполана на смеси ростовых субстратов // Микробиология. 2003. 72, № 1. С. 26–32.
2. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на смеси этанола и глюкозы // Микробиология. 2003. 72, № 3. С.348–355.
3. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В., Коваленко М.О. Метаболизм C₂-C₆-субстратов в условиях миксотрофного роста штаммов *Acinetobacter* sp. В-7005 и В-7005 (1НГ) // Украинский биохимический журнал. 2004. 76, №1. С. 33-38.
4. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В., Воцелко С.К. Физико-химические свойства микробного экзополисахарида этаполана, синтезированного на смеси ростовых субстратов // Микробиология. 2004. 73, № 1. С. 19 – 24.
5. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter* sp, растущего на этаноле // Микробиология. 2003. 72, № 4. С. 459-465.
6. Babel W., Müller R.H. Mixed substrate utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics // J. Gen. Microbiol. 1985. 131, № 1. P. 39–45.
7. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C₁-C₂-соединениях. Киев: Наук.думка, 1992. 212 с.
8. Лукомская И.С., Городецкий В.К. Применение микроцида (глюкозооксидазы) для определения глюкозы крови в норме и при диабете // Биохимия. 1961. 26, № 3. С. 477-482.

9. *Пятницкий М.П., Юрьева А.Ф.* Фумаратный метод определения яблочной кислоты // Биохимия. 1949. Т. 14. № 3. С. 196–200.
10. *Jarman T.R., Pace G.W.* Energy requirements for microbial exopolysaccharide synthesis // Arch. Microbiol. 1984. 137. P. 231-235.
11. *Пирог Т.П., Высятецкая Н.В., Корж Ю.В.* Особенности синтеза экзополисахарида этаполана на смеси энергетически дефицитных ростовых субстратов // Микробиология. 2007. 76, № 1. С.