

Реологические свойства водных растворов экзополисахаридов *Acinetobacter sp.*, полученных при использовании различных источников углерода

Показано влияние источника углерода на содержание неуглеводных компонентов (остатки пировиноградной кислоты и жирных кислот) в составе кислого экзополисахаридов ЭПС *Acinetobacter sp.* и реологические свойства его растворов. Более высокое содержание пировиноградной кислоты ЭПС, полученном на глюкозе, повлияло на значение характеристической вязкости $[\eta]_{D=0}$, которое было в 2,2 раза выше, чем у ЭПС, полученном на ацетате натрия. При этом структурная прочность растворов при тепловом и механическом воздействии была выше у ЭПС, полученном на ацетате натрия.

В работах многих авторов, касающихся вопросов влияния различных условий культивирования микроорганизмов на состав и строение синтезируемых ими ЭПС, показано, что наиболее лабильными процессами в биосинтезе ЭПС являются сборка и присоединение боковых цепей и неуглеводных заместителей моносахаридных остатков [1]. Изменения в количественном и качественном составе заместителей могут существенно отражаться на реологических свойствах растворов ЭПС [2]. Так, увеличение содержания в ксантане остатков пировиноградной кислоты (ПВК) приводит к увеличению вязкости и значения пределов текучести его растворов [3], в то время как уменьшение содержания ацетильных групп увеличивает прочность гелей ксантана с галактоманнанами [4]. Направленную модификацию полисахаридов с целью изменения реологических свойств осуществляют также с помощью химической обработки [5].

Исследование возможности регуляции процессов биосинтеза с целью получения ЭПС с желаемыми свойствами — важная практическая задача, решение которой снимает необходимость химической модификации ЭПС. Однако такой подход требует тщательной экспериментальной проработки и подбора условий культивирования каждого штамма — продуцента ЭПС.

Ранее мы показали, что бактерии *Acinetobacter sp.* синтезируют кислый гетерополисахарид на среде Кодама, содержащей ацетат натрия в качестве источника углерода. Моносахаридные остатки этого ЭПС — глюкоза, манноза, галактоза и рамноза — замещены остатками ПВК и жирных кислот $C_{10} - C_{18}$. Дезацетилирование ЭПС приводило к потере эффекта повышения вязкости растворов в присутствии различных солей и в кислой среде [6]. В настоящей работе мы исследовали влияние источников углерода — ацетата натрия и глюкозы — на состав и реологические свойства водных растворов ЭПС *Acinetobacter sp.*

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использованы препараты ЭПС, названного симусаном, полученные при культивировании *Acinetobacter sp.* на минеральной среде Кодама, содержащей в качестве источника углерода 2% ацетата натрия (симусан А) и 2% глюкозы (симусан Б). Условия культивирования *Acinetobacter sp.* и выделения ЭПС описаны в работе [6].

Гель-фильтрацию ЭПС проводили на колонке 50×1,0 см сефарозы 4В, прокалброванной стандартными декстранами. Элюент — 0,005 М NaCl.

Кислотный гидролиз дезацетилированных ЭПС выполняли в 2 н. H_2SO_4 при 100° в течение 6 ч.

Моносахариды идентифицировали методами жидкостной хроматографии (БХ) (система растворителей бутанол—пиридин—вода в соотношении 6:4:3) и газожидкостной хроматографии (ГЖХ) в виде ацетатов полиолов на приборе Varian-370 (США) (колонка 2 м×1/3 см с 15% OV-27 220°, газ-носитель — гелий). Подсчет площади пиков и времени удерживания выполнены с помощью интегратора Varian CDS-111.

Жирные кислоты определяли методом ГЖХ в виде метиловых эфиров на хроматографе Py Unicam Series 105 (США), колонка 2 м×3,5 мм хромосорб W-AW, жидкая фаза — диэтиленгликольсукцинат СК-Т4, 190°, газ-носитель — гелий).

Дезацетилирование препаратов ЭПС выполняли в 0,1 М NaOH [4]. Содержание углеводов определяли по реакции с фенолом и серной кислотой [7], содержание ПВК — по модифицированному методу Умбрайта [8]. ИК-спектры снимали на приборе UR-10 в таблетках KBr на вазелиновом масле.

Для вискозиметрических определений разбавленных растворов ЭПС использовали капиллярные вискозиметры Оствальда с диаметром капилляров 0,55 мм; 0,71; 0,99; 1,31 и 1,77 мм. Время истечения растворов через капилляр измеряли с точностью ±0,2 с. Температуру измерения поддерживали с точностью ±1°.

Характеристическую вязкость $[\eta]$ определяли графически, экстраполяционным методом Хауга [9].

Вискозиметрические определения концентрированных растворов ЭПС выполняли на ротационном вискозиметре Rheomat-108 (Швейцария) с цилиндрической измерительной системой. Диаметр внутреннего цилиндра — 25 мм, диаметр внешнего цилиндра — 33 мм, длина — 36 мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние условий культивирования на состав ЭПС достаточно подробно было изучено на примере ксантана, коммерческие препараты которого состоят из остатков глюкозы, маннозы, глюкуроновой кислоты, ацетата и пирувата в различном соотношении. Так, было показано, что соотношение моносахаридных компонентов в ксантане не зависит от лимитирования процесса питательными веществами, однако степень их замещения остатками уксусной и особенно ПВК резко меняется. Это указывает на наличие у штамма-продуцента регулярных механизмов включения остатков кислот в ЭПС, зависящих от тех или иных компонентов питательной среды [10].

Состав препаратов ЭПС *Acinetobacter sp. шт. 12*, полученных при культивировании на среде с ацетатом натрия (симусан А) и глюкозой (симусан Б) в качестве источника углерода

Препарат	Углеводы, % АСВ	Белок (по Лоури), % АСВ	Моносахаридный состав по отношению к содержанию глюкозы				ПВК, % АСВ	Жирные кислоты, % АСВ
			Глюкоза	Манноза	Галактоза	Рамноза		
Симусан А	47,8±3,5*	3,6±0,8	1	0,87	0,42	0,19	4,5±1,1	4,7±0,9
Симусан Б	49,1±3,2*	3,3±0,5	1	0,70	0,40	0,15	7,4±0,8	3,5±0,9

* Приведено значение $M \pm m$, где M — средне-арифметическое значение параметра при числе повторов $n=5$, m — ошибка среднего.

В таблице приведен состав препаратов ЭПС *Acinetobacter sp.*, полученных на среде с ацетатом натрия (симусан А) и глюкозой (симусан Б).

Очевидно, что моносахаридный состав препаратов ЭПС практически не зависит от природы двух источников углерода, используемых для культивирования продуцента. Не наблюдается также существенных различий в содержании жирных кислот. Однако замена ацетата натрия глюкозой привела к увеличению содержания ПВК почти вдвое. По-видимому, это может быть вызвано различиями метаболических путей ассимиляции ацетата и глюкозы и связано с видом потребляемого субстрата; как для ксантана, так и для симусана синтез и присоединение ПВК является более лабильным процессом, чем процесс сборки их углеводных цепей.

Ранее было показано [6], что симусан этерифицирован только монокарбоновыми кислотами, поэтому можно полагать, что некоторое изменение их содержания окажет незначительное влияние на свойства симусанов как полиэлектролитов. Электролитические свойства обусловлены остатками пировиноградной кислоты.

Влияние содержания ПВК на реологические свойства препаратов симусана А и Б оценивали по значениям характеристической вязкости $[\eta]_{D=0}$, кинематической вязкости $[\eta]_{кин}$, пределов текучести θ , разбавленных и концентрированных растворов.

Характеристическая вязкость $[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{уд}}{C}$ определяет объем и конформацию отдельной макромолекулы полимера в предельно разбавленном растворе в отсутствие межмолекулярных взаимодействий и характеризует вклад макромолекул с различной структурой в повышение вязкости растворителя.

Согласно уравнению Марка-Куна-Хаувинка величина $[\eta] = KM^\alpha$ (K — константа для данного гомологического ряда полимеров; M — молекулярная масса; α — коэффициент, учитывающий конформацию и объем макромолекулы полимера в предельно разбавленном растворе) зависит как от молекулярной массы полимера, так и от структурно-механических свойств макромолекул — жесткости цепи, степени разветвленности, наличия ионогенных групп, — отраженных в значении коэффициента α .

Значения $[\eta]_{D=0}$ для препаратов А и Б равны соответственно 4880 и 10 800 мл/г. При этом препараты симусана имеют близкое распределение по молекулярной массе $8 \cdot 10^5$ — $2 \cdot 10^6$ и являются полидисперсными. Однако характер зависимости $(\eta_{уд}/C)_{D=0}$ их растворов от C существенно различен (рис. 1). Для растворов симусана Б наблюдается более выраженный эффект увеличения при-

веденной вязкости $(\eta_{уд}/C)_{D=0}$ при разбавлении, характерной для полиэлектролитов.

Приведенная вязкость увеличивается в результате повышения степени диссоциации ионогенных групп (-COOH) с разбавлением за счет возрастания электростатического отталкивания одноименно заряженных участков полимера. При этом макромолекулы полиэлектролитов приобретают дополнительную жесткость; объем, занимаемый ими в растворе, увеличивается [11], увеличивается и значение коэффициента α .

Таким образом, можно полагать, что высокое значение $[\eta]_{D=0}$ для симусана Б обусловлено большим содержанием остатков ПВК, определяющим электролитические свойства полисахарида.

Для ксантана (Sigma, США) относящегося к жесткоцепным полимерам (коэффициент $\alpha = 1,8$), значение $[\eta] = 5000$ — 7000 мл/г [11]. По значениям $[\eta]$ для симусана А и Б их с большей вероятностью можно относить к жесткоцепным полимерам.

Растворы препаратов симусана А и Б, ксантана (Sigma) характеризуются неньютоновским течением. Однако отклонения от линейности в зависимости кинематической вязкости $\eta_{кин}$ от концентрации начинаются при различных значениях C_k : для симусана А $C_k = 0,07$ %, для симусана Б — $0,05$ %; для ксантана $C_k = 0,08$ %.

Структурная прочность растворов полисахаридов может быть нарушена при их нагревании и оценена по значениям температуры T_c , при которой вязкость раствора падает вдвое после нагревания в данном интервале температур. Значение T_c может зависеть от соотношения остатков ПВК и жирных кислот [12].

При нагревании растворов исследуемых препаратов ЭПС от 20 до 80° значения T_c для симусана А, Б и ксантана были равны соответственно 40 , 34 и 29° , что свидетельствует о большей устойчивости растворов симусана А к тепловым воздействиям.

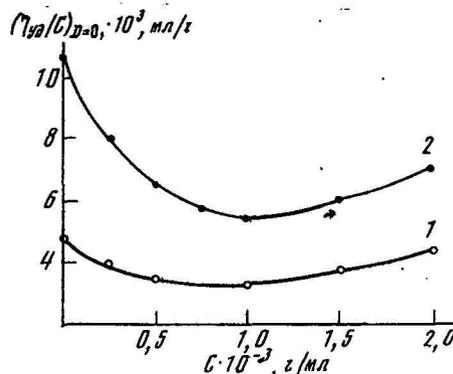


Рис. 1. Зависимость приведенной вязкости $(\eta_{уд}/C)_{D=0}$ растворов симусанов А и Б от их концентрации: 1 — симусан А; 2 — симусан Б

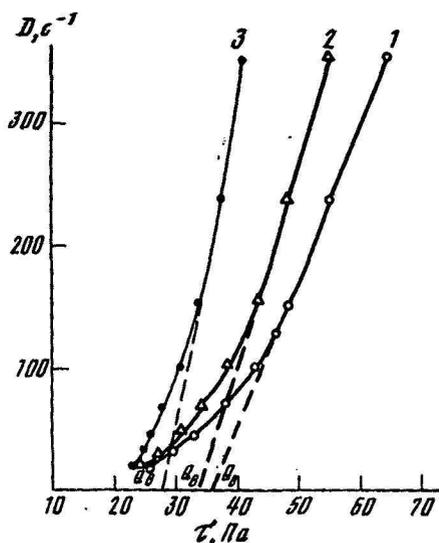


Рис. 2. Кривые течения 1%-ных растворов симусанов А, Б и ксантана:
1 — симусан А; 2 — симусан Б; 3 — ксантан

Реологические свойства растворов полисахаридов могут быть также охарактеризованы по кривым течения — зависимости скорости сдвига D (s^{-1}) от напряжения сдвига τ (Па) (рис. 2).

Кривые течения растворов исследуемых ЭПС имеют вид, характерный для неньютоновских псевдопластичных систем. Экстраполяция прямолинейного участка кривых (соответствующего высоким значениям D) на ось абсцисс дает значение динамического предела текучести по Бингаму Θ_0 — напряжения, при котором происходит полная ориентация макромолекул полимеров в потоке. Значения Θ_0 для 1%-ных водных растворов симусана А, Б и ксантана равны соответственно 36, 33 и 28 Па, что указывает на большую прочность растворов симусана А.

Таким образом, замена ацетата натрия, используемого при культивировании *Acinetobacter sp.* в качестве источника углерода, на глюкозу привела к увеличению содержания в ЭПС остатков ПВК почти вдвое. При этом увеличились значения характеристической и эффективной вязкости

разбавленных растворов. Наибольшую структурную прочность при сдвиге в механическом действии имеют растворы препаратов ЭПС, полученные на среде, содержащей ацетат натрия.

Получено 06

ЛИТЕРАТУРА

1. Sutherland I. W. // Adv. Microb. Physiol.— 1974. — V. 23.— P. 79—90.
2. Sutherland I. W. // Microbiol. Sci.— 1986.— V. 3.— P. 5—8.
3. Pace G. W. Microbiol Polysaccharides // Adv. Biotechnol. Proc. 6th Ferment. Symp., London, 20—25 July.— L., 1974. — V. 3. P. 433—439.
4. Tako M., Nakamura S. // Agric. Biol. Chem.— 1974. — V. 48.— P. 2987—2993.
5. Yalpani M. // Tetrahedron.— 1985.— V. 41.— P. 2957—3020.
6. Гринберг Т. А., Дерябин В. В., Краснопевцева Н. В. и др. // Микробиол. журнал.— 1987.— Т. 49.— № 4.— С. 24—28.
7. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K. et al. // Anal. Chem.— 1956.— V. 28.— P. 350—356.
8. Филипович Ю. Б., Егорова Т. А., Себастьянова Т. А. // Практикум по общей биохимии.— М.: Просвещение.— 1975.— 252 с.
9. Haug A., Smidsrod O. // Acta Chem. Scand.— 1966.— V. 16.— P. 1569—1578.
10. Davidson I. W. // Federat. of Eur. Biochem. Letters.— 1979.— V. 3.— P. 347—352.
11. Mitchell J. R. Polysaccharides in Food/Eds J. M. Blanshard, J. R. Mitchell.— London-Boston: Butterworth.— 1979.— P. 51—71.
12. Smith J. H., Pace G. W. // J. Chem. Tech. Biotechnol.— 1982.— V. 32.— P. 119—129.

V. V. DERYABIN, T. A. GRINBERG, L. A. STARUKHIN,
T. P. PIROG, Yu. P. MALASHENKO, I. N. IGNATIYEV,
NPO «Biotekhnologiya», Moscow, 117246

Rheological properties of aqueous solutions of exopolysaccharide of *Acinetobacter sp.* produced on different carbon sources

The influence of carbon source on the content of non-carbohydrate components (pyruvate and fatty acid residues) in aqueous exopolysaccharide (EPS) of *Acinetobacter sp. Str. 12* and its rheological properties of its solutions was demonstrated. The values of intrinsic viscosity were influenced by the nature of non-carbohydrate components in EPS: values of pyruvic acid residues for EPS produced on glucose were 2.2 times higher than those for EPS produced on acetate. However, the latter solutions were more stable mechanically and thermally.