

Ю. Р. Малашенко, Т. П. Пирог, Т. А. Гринберг, Г. Э. Пинчук

Ин-т микробиологии и вирусологии АН Украины, Киев

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ *ACINETOBACTER* SP. НА СРЕДЕ С ЭТАНОЛОМ

Изучено влияние C_4 -дикарбоновых кислот на процесс синтеза экзополисахаридов (*ЭПС*) *Acinetobacter* sp. при росте бактерий на среде с этанолом. Внесение в среду культивирования, содержащую этанол, C_4 -дикарбоновых кислот — интермедиатов метаболизма этанола — приводит к усилению глюконеогенеза и увеличению количества синтезированных *ЭПС*. Разработана технология получения *ЭПС* на основе этанола, позволяющая повысить в 4—5 раз продуктивность процесса биосинтеза *ЭПС*. Экзополисахариды, синтезированные на средах с этанолом и этанолом с добавлением C_4 -дикарбоновых кислот, различаются между собой по химическому составу.

Ключевые слова: экзополисахариды, регуляция, синтез, технология, C_4 -дикарбоновые кислоты, этанол, глюконеогенез

Утилизация этанола у гетеротрофных бактерий осуществляется путем его окисления до ацетата через ацетальдегид. Ацетат, образующийся при окислении этанола, включается в метаболизм через ацетил-КоА. Бактерии, использующие этанол в качестве ростового субстрата, расходуют ацетил-КоА главным образом на синтез жирных кислот, α -кетоглутарата, C_4 -дикарбоновых кислот, из которых затем образуются C_3 -интермедиаты, углеводы, аминокислоты, нуклеотиды. Синтез C_4 -дикарбоновых кислот у микроорганизмов, растущих на средах с этанолом, ацетатом, жирными кислотами либо углеводородами, осуществляется обычно в глиоксилатном цикле. В то же время у некоторых фототрофных бактерий, растущих на ацетате, и у бактерий *Pseudomonas* AM1, растущих на этаноле, отсутствует изоцитратлиаза, хотя имеется малат-синтаза. На сегодняшний день неизвестно, каким образом эти микроорганизмы синтезируют глиоксилат, однако показано, что и у этих бактерий C_4 -дикарбоновые кислоты образуются из глиоксилата и ацетил-КоА [1, 7].

Так как для синтеза коэнзима А культуре *Acinetobacter* sp. необходима экзогенная пантотеновая кислота — предшественник коэнзима А, ее метаболизм, очевидно, лимитирован ацетил-КоА [3]. Исходя из этого, мы предположили, что внесение C_4 -дикарбоновых кислот в среду с этанолом приведет к усилению глюконеогенеза и увеличению синтеза экзополисахаридов (*ЭПС*) бактериями *Acinetobacter* sp.

Материал и методы. Культивирование *Acinetobacter* sp. осуществляли на минеральной среде Кодама [3], содержащей 1,0—2,0 % об. этанола в качестве источника углерода. В среду культивирования дополнительно вносили пантотеновую кислоту (0,0003—0,0004 %), дрожжевой автолизат (0,5 % об.) или экстракт нуклеиновых кислот (нуклеизат) из кормового белка эсприна (0,1—5,0 % об.), являющийся для *Acinetobacter* sp. источниками факторов роста. Для получения нуклеизата к 100 г эсприна добавляли 1 л дистиллированной воды, доводили pH до 8,0—9,0 25 %-м раствором КОН, выдерживали в течение 30 мин при перемешивании (220 об/мин) при 30 °С, после чего подкисляли 10 %-м раствором HCl до 7,0 и центрифугировали (4000 об/мин, 20 мин). Супернатант стерилизовали при 0,5 атм (30 мин). C_4 -дикарбоновые кислоты (фумаровую, яблочную, щавелево-уксусную) вносили в среду культивирования бактерий в виде калиевых солей в количестве 0,1—1,0 %. Влияние фумарата, малата и оксалоацетата калия на образование *ЭПС* *Acinetobacter* sp. исследовали при выращивании бактерий на средах с этанолом, этанолом и пантотеновой кислотой, этанолом и пантотеновой кислотой в присутствии нуклеизата.

Культивирование бактерий осуществляли периодическим способом в колбах со 100—200 мл среды на качалке (220 об/мин) в течение 72—

96 ч при 30 °С. В качестве посевного материала использовали двухсуточную культуру, выращенную на сусло-агаре. При культивировании бактерий в ферментере АК-210 (рабочий объем 4 л) в качестве инокулянта использовали выращенную в колбах на качалке культуру из стационарной фазы роста в количестве 5 % от объема среды. Начальный расход воздуха составлял 0,05—0,1 л на 1 л среды в минуту, скорость перемешивания — 150—200 об/мин. В процессе культивирования концентрацию растворенного кислорода в среде поддерживали на уровне 20—40 % от насыщения воздухом регулированием расхода воздуха и скорости перемешивания.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспен-

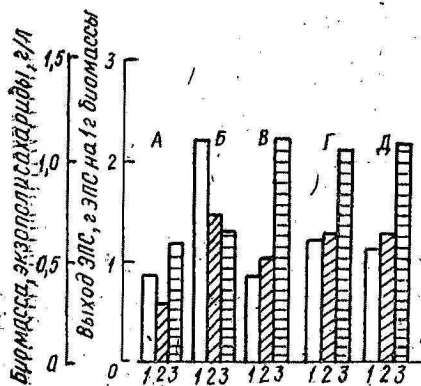


Рис. 1. Накопление биомассы (1) и ЭПС (2), а также выход ЭПС (3) при культивировании *Acinetobacter* sp. на средах с этанолом (А), этанолом и пантотеновой кислотой (Б), этанолом и оксалоацетатом (В), этанолом и фумаратом (Г), этанолом и малатом (Д). Концентрация C₄-дикарбоновых кислот составляет 0,1 %.

зии с последующим пересчетом на абсолютно сухую массу клеток по калибровочному графику. Количество синтезированных ЭПС устанавливали по концентрации углеводов, определяемых с помощью колориметрического метода по реакции с фенолом и серной кислотой [9]. Выход ЭПС $Y_{P/X}$, отнесенный к единице образовавшейся биомассы, и выход ЭПС от субстрата $Y_{P/S}$ рассчитывали по формулам:

$$Y_{P/X} = \frac{P_1 - P_0}{X_1 - X_0};$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1};$$

где P_1 и P_0 — концентрация ЭПС; X_1 и X_0 — концентрация биомассы; S_1 и S_0 — концентрация субстрата в момент времени t_1 и t_0 .

Этанол определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Цвет-4» с пламенно-ионизационным детектором (колонка 2 м, твердый носитель целит-545, неподвижная жидкая фаза — полиэтиленгликоль ПЭГ-400 (20 %), газ-носитель — гелий, температура — 150 °С).

Определение фумаровой кислоты осуществляли по методу Шотта [4].

Выделение и очистку ЭПС проводили, как описано ранее [2]. Содержание углеводов в препаратах ЭПС определяли по реакции с фенолом и серной кислотой [9], урсонных кислот — в дезацелированных образцах ЭПС по методу Dische [8], пировиноградной кислоты — по методу, описанному в работе Филлиповича с соавт. [5], содержание жирных кислот — весовым методом после дезацелирования ЭПС и выражали в процентах от массы условно сухого вещества. За условно сухое вещество принимали вещество, не теряющее массы при высушивании в вакууме при 40 °С.

Результаты и их обсуждение. Результаты проведенных экспериментов показали, что исследуемые C₄-дикарбоновые кислоты могут служить источником углеродного питания для *Acinetobacter* sp. При выращивании бактерий на среде с C₄-дикарбоновыми кислотами без факторов роста уровень биомассы и ЭПС на 20—25 % выше, чем при использовании этанола в аналогичных условиях культивирования, и составляет 0,5—0,6 г/л.

Представленные данные (рис. 1) показывают, что в присутствии оксалоацетата, малата и фумарата калия выход ЭПС увеличивается почти вдвое, при этом количество ЭПС в культуральной жидкости сравнимо с их количеством, накапливающимся при выращивании *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом и пантотеновой кислотой. Для дальнейших экспериментов был выбран фумарат калия.

Установлено, что для синтеза ЭПС бактериями *Acinetobacter* sp. оптимальная концентрация фумарата калия, вносимая в среду в нача-

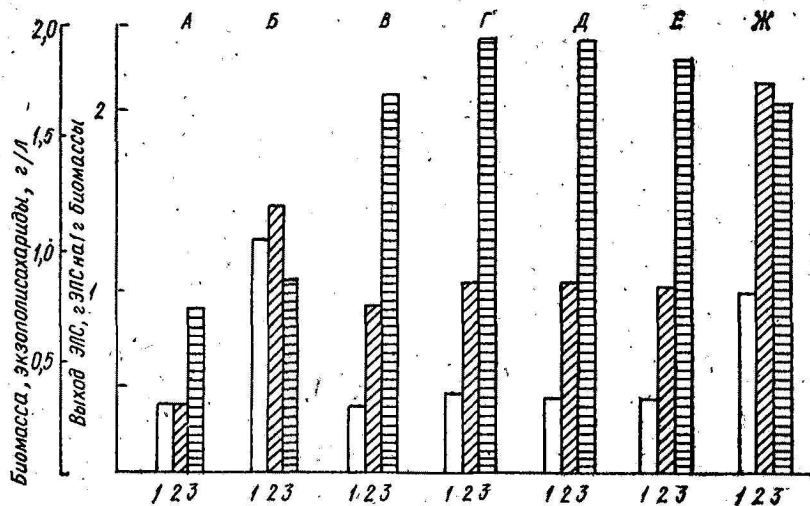


Рис. 2. Накопление биомассы (1) и ЭПС (2), а также выход ЭПС (3) при культивировании *Acinetobacter* sp. на средах с этанолом (А), этанолом и пантотеновой кислотой (Б), этанолом и фумаратом (В, Г, Д, Е), этанолом и фумаратом в присутствии пантотеновой кислоты (Ж). Концентрация фумарата: 0,1 % (В); 0,2 % (Г, Ж), 0,5% (Д), 1,0 % (Е).

ле культивирования, составляет 0,2 % (рис. 2). Внесение фумарата калия в среду, содержащую этанол и пантотеновую кислоту, в два раза увеличивает выход ЭПС, при этом количество синтезированных полисахаридов повышается на 30 % (см. рис. 2).

Поскольку этанол и фумарат калия могут использоваться культурой *Acinetobacter* sp. в качестве ростового субстрата, исследовали характер и очередность использования этих соединений при росте бактерий на среде с их смесью. Установлено, что оба субстрата потребляются культурой одновременно (рис. 3). Так как при росте бактерий на среде с этанолом или ацетатом C_4 -дикарбоновые кислоты являются предшественниками C_3 -интермедиатов глюконогена, представляло интерес проверить, как повлияет на синтез ЭПС добавление фумарата калия к клеткам *Acinetobacter* sp., находящимся в экспоненциальной фазе роста. Оказалось, что внесение этого соединения полностью подавляет рост клеток и значительно усиливает синтез ими ЭПС (рис. 4). Полученные результаты свидетельствуют о том, что экзогенный фумарат калия при росте *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом расходуется в основном на образование ЭПС, и, следовательно, введение в среду этого соединения позволяет направленно регулировать биосинтетические процессы в клетках *Acinetobacter* sp.

В присутствии фумарата калия выход ЭПС у культуры *Acinetobacter* sp. снижается при оптимальной для роста концентрации нуклеизата и возрастает при лимитировании или ингибировании роста бактерий его избытком (рис. 5). Внесение C_4 -дикарбоновых кислот в ростовую среду, содержащую этанол, пантотеновую кислоту и нуклеизат, приводит к значительному снижению уровня биомассы. Угнетение роста бактерий C_4 -дикарбоновыми кислотами позволяет нам выдвинуть следующую гипотезу регуляции метаболизма этанола у этих бактерий. В условиях, оптимальных для роста *Acinetobacter* sp., избыток C_4 -ди-

карбоновых кислот в среде подавляет их образование в глиоксилатном цикле. Однако при этом экзогенные С₄-дикарбоновые кислоты не вовлекаются в конструктивный метаболизм, что свидетельствует, очевидно, о функционировании у культуры неполного цикла трикарбоновых кислот либо слабой его активности, в результате чего избыток ацетил-КоА приводит к блокированию энергодающих реакций окисления этанола. Аналогичным образом можно объяснить подавление синтеза биомассы при внесении в среду фумарата в экспоненциальной фазе роста культуры.

Исходя из вышеизложенного мы предположили, что в условиях, оптимальных для роста *Acinetobacter* sp., можно добиться увеличения

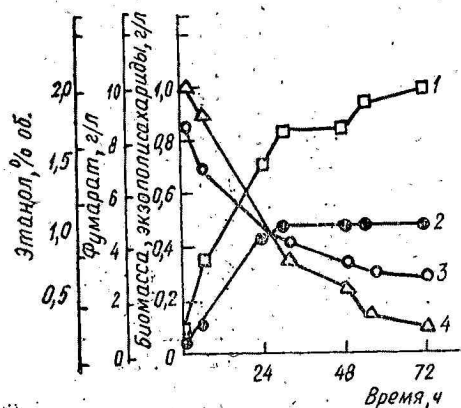


Рис. 3. Накопление биомассы и ЭПС при культивировании *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом и фумаратом. 1 — ЭПС, 2 — биомасса, 3 — этанол, 4 — фумарат.

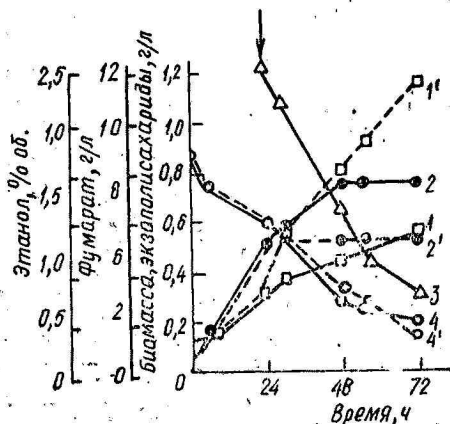


Рис. 4. Накопление биомассы и ЭПС при культивировании *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом при добавлении фумарата. 1, 1' — ЭПС; 2, 2' — биомасса; 3 — фумарат; 4, 4' — этанол; 1, 2, 4 — опыт без внесения фумарата; ↓ — внесение фумарата.

конечной концентрации ЭПС в среде за счет внесения С₄-дикарбоновых кислот не в начале процесса культивирования, а при входе культуры в стационарную фазу роста. Установлено, что в этом случае количество синтезированных ЭПС возрастает почти в два раза по сравнению с выращиванием бактерий без внесения фумарата калия и составляет 4,5—5 г/л. При этом экзогенный фумарат калия стехиометрически вовлекается в образование ЭПС, т. е. в метаболизме культуры преобладающим процессом становится синтез полисахаридов (рис. 6).

Следует отметить, что по мере использования фумарата калия pH среды повышается, достигает максимального значения после полного его потребления и затем постепенно снижается до исходного уровня (рис. 6). Это может свидетельствовать о том, что фумарат проникает в клетки бактерий вместе с протоном. Достижение нейтрального значения pH служило «сигналом» о введении следующей порции С₄-дикарбоновой кислоты. После повторного внесения фумарата калия (0,2 %) количество синтезированных ЭПС достигает 7,0 г/л.

Результаты дальнейших экспериментов показали, что дробное внесение фумарата калия позволяет повысить концентрацию ЭПС в куль-

Влияние фумарата калия на состав ЭПС *Acinetobacter* sp.

Источник углерода	Содержание в ЭПС (% от массы условно сухого вещества)			
	углеводов	пировиноградной кислоты	уроновых кислот	жирных кислот
Этанол	42,0	3,02	17,7	3,62
Этанол+фумарат	45,5	3,90	22,5	1,82

туральной жидкости до 10—15 г/л, выход конечного продукта составляет при этом 60—80 % от использованного субстрата (этанол+фумарат).

Экзополисахариды, синтезируемые *Acinetobacter* sp. на средах с этанолом и этанолом с добавлением фумарата калия, различаются между собой по содержанию пировиноградной, уроновых и жирных кислот (таблица). /

Поскольку уроновые кислоты входят в состав углеводной цепи полисахаридов и их синтез, как и синтез углеводов, осуществляется в глюконеогенезе, изменение содержания уроновых кислот в составе ЭПС мы можем объяснить только влиянием C_4 -дикарбоновых кислот на ре-

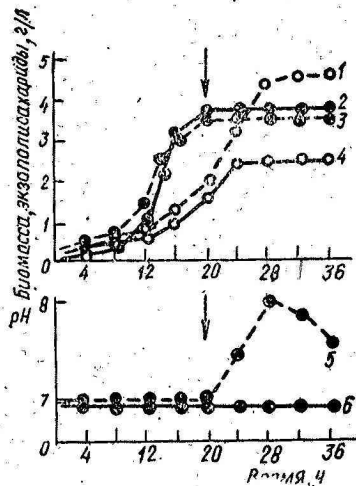
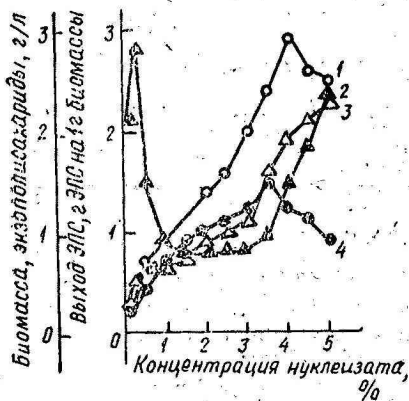


Рис. 5. Зависимость образования биомассы (4) и ЭПС (3), а также выхода ЭПС (2) от концентрации нуклеозата при выращивании *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом, пантотеновой кислотой (0,0003 %) и фумаратом (0,2 %). 1 — образование биомассы на среде без фумарата.

Рис. 6. Влияние фумарата на рост и образование ЭПС *Acinetobacter* sp. при периодическом культивировании. 1, 4 — ЭПС; 2, 3 — биомасса; 5, 6 — pH; ↓ — внесение фумарата; 2, 4, 6 — без внесения фумарата.

гуляцию синтеза полисахаридов. По-видимому, аналогично можно объяснить и более высокое содержание в таких ЭПС остатков пировиноградной кислоты. Однако не исключено, что *Acinetobacter* sp. синтезирует два или несколько полисахаридов, один из которых содержит уроновые кислоты. В таком случае возможно, что при внесении в среду культивирования бактерий C_4 -дикарбоновых кислот происходит увеличение синтеза ЭПС, содержащего уроновые кислоты.

Таким образом, разработана принципиально новая технология получения микробных полисахаридов на основе этанола, позволяющая в 4—5 раз повысить продуктивность процесса биосинтеза ЭПС и получать препарат определенного состава за счет внесения в среду культивирования C_4 -дикарбоновых кислот — интермедиатов метаболизма этанола.

Из литературы известно о применении питательной среды, содержащей фумаровую кислоту, для выращивания *Xanthomonas campestris* 8162, которое позволяет увеличить количество синтезированного ксантана до 9 г/л [6]. По нашему мнению, в данном случае фумаровая кислота не является стимулятором биосинтеза ЭПС, поскольку при росте на средах с углеводами она, как и другие C_4 -дикарбоновые кислоты, не участвует в глюконеогенезе, т. е. биосинтезе ЭПС [1]. Увеличение количества ЭПС получено, вероятно, вследствие повышения pH до оптимального для синтеза ксантана уровня за счет внесения в среду одновременно с фумаровой кислотой калия фосфорнокислого двухзамещенного. Стимулирующее действие органических кислот цикла Креб-

са на образование ксантана культурой *Xanthomonas campestris* отмечается и в работе Souw [10]. Автор также предполагает, что действие органических кислот связано с установлением благоприятного для синтеза ЭПС значения рН.

При получении ЭПС на основе этанола C_4 -дикарбоновые кислоты являются интермедиатами метаболизма этанола, непосредственно участвующими в глюконеогенезе. Следовательно, механизмы действия экзогенных C_4 -дикарбоновых кислот, при использовании в качестве источника углерода углеводов и этанола неодинаковы, так как пути биосинтеза ЭПС различны.

В заключение следует отметить, что представленные результаты свидетельствуют о гибкости метаболизма этанола у исследованных бактерий, а также о возможности регулирования направленности процессов синтеза биомассы и ЭПС на C_2 -соединениях при помощи интермедиатов их трансформации.

Ю. Р. Малашенко, Т. П. Пирог, Т. О. Гринберг, Г. Е. Пинчук

Ин-т мікробіології і вірусології АН України, Київ

РЕГУЛЯЦІЯ СИНТЕЗУ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ *ACINETOBACTER SP.* НА СЕРЕДОВИЩІ З ЕТАНОЛОМ

Резюме

Вивчено вплив C_4 -дикарбонових кислот на процес синтезу екзополісахаридів (ЕПС) *Acinetobacter sp.* при рості бактерій на середовищі з етанолом. Внесення в середовище культивування з етанолом C_4 -дикарбонових кислот — інтермедиатів метаболізму етанолу — призводить до посилення глюконеогенезу та зростання кількості синтезованих ЕПС. Розроблена технологія одержання ЕПС на основі етанолу, що дозволяє збільшити в 4—5 разів продуктивність процесу біосинтезу ЕПС.

Екзополісахариди, синтезовані на середовищі з етанолом і етанолом з додаванням C_4 -дикарбонових кислот, різняться між собою за хімічним складом.

Yu. R. Malashenko, T. P. Pirog, T. A. Grinberg, G. E. Pinchuk

Institute of Microbiology and Virology,
Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

REGULATION OF SYNTHESIS OF EXOPOLYSACCHARIDES BY *ACINETOBACTER SP.* ON THE MEDIUM WITH ETHANOL

Summary

C_4 -dicarbonic acids have been studied for their effect on synthesis of exopolysaccharides (EPS) by *Acinetobacter sp.*, while growing bacteria on the medium with ethanol. Introduction of C_4 -dicarbonic acids, intermediates of ethanol metabolism, into the ethanol-containing cultivation medium intensifies gluconeogenesis and increases the amount of synthesized EPS. Developed technology of EPS production from ethanol permits making the productivity of the EPS biosynthesis process 4-5 times higher. Exopolysaccharides synthesized on the medium with ethanol or ethanol with addition of C_4 -dicarbonic acids differ in their chemical composition.

Key words: exopolysaccharides, regulation, synthesis, technology, C_4 -dicarbonic acids, ethanol, gluconeogenesis

The author's address: Yu. R. Malashenko,
Institute of Microbiology and Virology, Academy of
Sciences of Ukraine, 154 Zabolotny St., Kiev, 252143,
Ukraine

1. Готтшальк Г. Метаболизм бактерий.— М.: Мир, 1982.— 310 с.
2. Гринберг Т. А., Дерябин В. В., Краснопецева Н. В. и др. Некоторые свойства полисахарида, синтезируемого культурой *Acinetobacter species* // Микробиол. журн.— 1987.— 49, № 4.— С. 24—30.
3. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Буклова В. Н., Малащенко Ю. Р. Взаимоотношения микроорганизмов в экзополисахаридобразующей смешанной культуре // Микробиология.— 1990.— 59, № 5.— С. 797—805.
4. Пятницкий М. П., Юрьева А. Ф. Фумаратный метод определения яблочной кислоты // Биохимия.— 1949.— 14, № 3.— С. 196—200.
5. Филипович Ю. Б., Егорова Т. А., Себастьянова Т. А. Практикум по общей биохимии.— М.: Просвещение, 1975.— 252 с.
6. А. с. 811844 СССР, МКИ³ С 12 N 1/20. Питательная среда для выращивания штамма *Xanthomonas campestris* 8162 — продуцента экзополисахарида / М. С. Матышевская, Р. И. Гвоздяк, И. И. Майко и др.— Оpubл. 10.01.82; Бюл. № 4.
7. Anthony C. The biochemistry of methylotrophs.— New York; London: Acad. press, 1982.— 431 p.
8. Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acid // J. Biol. Chem.— 1947.— 167, N 1.— P. 189—198.
9. Dubois M., Gilles K., Hamilton J. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem.— 1956.— 28, N 3.— P. 350—356.
10. Souw P. The effect of citrate and other organic acids in xanthan production // Adv. Biotechnol. proc. 6 th Int. Ferment. Symp. (London (Canada); 20—25 July 1980).— Toronto etc.— 1981.— Vol. 3.— P. 447—453.

Рецензент С. К. Воцелко
Член редсовета Р. И. Гвоздяк

Получено 08.05.92

УДК 582.282:579.22

Е. Н. Громозова, И. С. Блажчук, В. В. Тесленко, Н. Н. Жданова

Ин-т микробиологии и вирусологии АН Украины, Киев

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И ОБРАЗОВАНИЯ МЕЛАНИНА *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* В ГЛУБИННЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ pH СРЕДЫ

Установлено, что кислотность среды не влияет на форму мицелия *C. cladosporioides*. При изменении pH в широком диапазоне (от 2 до 9) наблюдали развитие лишь пеллетной структуры. Однако при этом отмечали различную степень ветвления гиф и плотность их «упаковки».

Выявлена зависимость содержания парамагнитных центров меланина от степени протонированности среды.

Ключевые слова: влияние pH, структура мицелия, биомасса, масса и плотность пеллета, меланин

Известно, что концентрация ионов водорода в среде оказывает влияние на морфологию погруженного мицелия [16]. Так, Pirt и Callow [17] на примере *Penicillium chrysogenum* показали, как в зависимости от pH среды изменяется длина гиф и частота их ветвления (200 нм — при pH 6,0 и 20 нм при pH 7,4). При pH 7,4 они наблюдали значительное количество раздутых дрожжеподобных клеток, образование которых свидетельствовало о начале пеллетообразования. Снижение pH приводило к нормализации ростовых процессов и развитию диффузного мицелия. Другими словами, морфологические изменения мицелия под действием pH были обратимыми.

Trinci и др. [16] установили действие pH на длину и диаметр гиф *P. chrysogenum*, растущих в условиях хемостата при 25 °C и $D = 0,09 \text{ ч}^{-1}$. Показано, что pH 6,0 оптимально для апикального роста *P. chrysogenum*. Четкая зависимость формы мицелия (пеллеты, гифаль-

© Е. Н. ГРОМОЗОВА, И. С. БЛАЖЧУК, В. В. ТЕСЛЕНКО, Н. Н. ЖДАНОВА, 1993