

**Пирог, Т.П. Физико-химические свойства микробного экзополисахарида этаполана, синтезированного на смеси ростовых субстратов / Т. П. Пирог, М. А. Коваленко, Ю. В. Кузьминская, С. К. Воцелко // Микробиология. – 2004. – 73, № 1. – С. 19–24.**

УДК 579.841.222:577.114

## **ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРОБНОГО ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА, СИНТЕЗИРОВАННОГО НА СМЕСИ РОСТОВЫХ СУБСТРАТОВ**

**Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В., Воцелко С.К.**

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

Изучены физико-химические свойства микробного экзополисахарида (ЭПС) этаполана, синтезированного при выращивании продуцента *Acinetobacter sp.* 12S на смеси этанола и глюкозы, а также на моносубстратах.

Установлено, что независимо от природы источника углеродного питания ЭПС характеризовались одинаковым содержанием в их составе углеводов, пировиноградной, уроновых кислот и минеральных компонентов. Исследуемые ЭПС были идентичны также по моносahаридному составу: молярное соотношение глюкозы, маннозы, галактозы и рамнозы составляло 3:2:1:1. При культивировании продуцента на смеси субстратов синтезировался ЭПС с более высоким содержанием жирных кислот, чем на моносубстратах. Средняя молекулярная масса, а также содержание в ЭПС высокомолекулярных фракций (больше 2 млн.) было выше у этаполана, полученного на смеси этанола и глюкозы. Растворы такого ЭПС характеризовались более высокой вязкостью в присутствии 0,1 М КСl, при переводе в Н<sup>+</sup>-форму и системе Cu<sup>2+</sup>-глицин, чем ЭПС, синтезированные на моносубстратах.

Обсуждаются причины улучшения реологических свойств ЭПС, полученного на смешанном субстрате.

---

**Ключевые слова:** экзополисахариды, условия культивирования, смешанный субстрат, химический состав, молекулярная масса, реологические свойства

Ранее нами была показана возможность увеличения синтеза микробного экзополисахаридного препарата (ЭПС) этаполана при выращивании *Acinetobacter sp.12S* на смеси этанола и глюкозы [1]. Установлены условия культивирования продуцента, позволяющие интенсифицировать синтез ЭПС на смеси двух энергетически-неравноценных субстратов [2]. Показано, что наиболее высокая эффективность трансформации углерода субстратов в ЭПС обеспечивалась при отсутствии в среде катионов натрия, снижении концентрации источника азотного питания до 0,3-0,45 г/л, использовании посевного материала, выращенного на этаноле. Культивирование продуцента в таких условиях сопровождалось также увеличением максимальной удельной скорости роста и смещением времени ее достижения в более раннюю ростовую фазу [2].

Однако известно, что условия культивирования продуцента влияют не только на синтез ЭПС (количество синтезированных полисахаридов, скорость их образования, выход ЭПС от субстрата и др.), но также и на физико-химические свойства конечного продукта [3 - 8]. В различных условиях выращивания может изменяться химический состав ЭПС, их молекулярная масса, соотношение нескольких полисахаридов, что влияет на реологические свойства ЭПС, определяющие практическую значимость этих полимеров.

В связи с этим цель настоящей работы состояла в исследовании химического состава, молекулярной массы и реологических свойств этаполана, синтезированного на этаноле, глюкозе и смеси этих субстратов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объекты исследований.** Объектом исследований являлся штамм *Acinetobacter sp. 12S* - продуцент комплексного полисахаридного препарата

этаполана, описанный нами ранее [5].

**Культивирование *Acinetobacter sp.* 12S.** Бактерии выращивали на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 6,8;  $\text{KOH}$  – 1,8;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 0,3;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,4;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001. В среду дополнительно вносили 0,5% (по объему) дрожжевого автолизата и 0,0006% пантотената кальция. В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 1,0% (по объему), глюкозу в концентрации 1,0% (масс.), а также смесь этих субстратов в соотношении 1:1 (% этанола по объему : масс. % глюкозы). При выращивании бактерий на смешанном субстрате концентрация этанола составляла 1% (по объему), глюкозы - 1% (масс.).

В качестве посевного материала использовали культуру из экспоненциальной фазы (16-24 ч роста), выращенную на минеральной среде указанного выше состава, содержащую 0,5% (по объему) этанола. Концентрация посевного материала составляла 5% от объема засеваемой среды. Содержание  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  в среде культивирования бактерий при получении инокулята составляло 0,6 г/л.

Бактерии культивировали в колбах на качалке (220 об/мин) при 30°C, pH 6,8-7,0 в течение 96 ч.

**Выделение нативного этаполана.** Культуральную жидкость, содержащую этаполан, диализовали против дистиллированной воды в течение 5 сут., далее разбавляли дистиллированной водой в 3-5 раз, центрифугировали для отделения клеток продуцента (12000 g, 40 мин.). Супернатант концентрировали в вакууме (50°C) до первоначального объема, после чего осаждали этаполан добавлением 1,5 объемов изопропанола. Осадок ЭПС промывали в чистом изопропанолу и высушивали при комнатной температуре.

**Получение дезацилированного этаполана.** Для дезацилирования к 0,15% раствору нативного этаполана добавляли боргидрид натрия и твердый  $\text{NaOH}$  из расчета 10 мг и 500 мг соответственно на 100 мг ЭПС, выдерживали при периодическом перемешивании в течение 48 ч при комнатной температуре, после

чего нейтрализовали раствор концентрированной соляной кислотой и осуществляли пятикратную экстракцию жирных кислот гексаном.

Для выделения дезацилированного этаполана к водному раствору, полученному после экстракции жирных кислот, добавляли изопропанол, осадок ЭПС растворяли в дистиллированной воде и диализовали против дистиллированной воды в течение 5 сут., после чего концентрировали в вакууме и осаждали дезацилированный ЭПС изопропанолом. Осадок промывали в чистом изопропаноле и высушивали при комнатной температуре.

**Определение химического состава этаполана.** Химический состав нативного и дезацилированного этаполана (содержание углеводов, пировиноградной (ПВК), уроновых (УК) и жирных (ЖК) кислот, а также моносахаридный состав) анализировали как описано в работе [9].

Для определения содержания минеральных компонентов (МК) в составе этаполана навеску ЭПС (около 100 мг), взятую на аналитических весах, растворяли в дистиллированной воде, добавляли к раствору катионит КУ-2-8 ( $H^+$ ) (из расчета 1 г смолы на 100 мг ЭПС). Обработку раствора этаполана катионитом проводили до достижения постоянного значения рН. Катионит отделяли центрифугированием (8000g, 15 мин.), из супернатанта осаждали  $H^+$ -ЭПС добавлением 2-х объемов изопропанола. Осадок  $H^+$ -ЭПС промывали в чистом изопропаноле, высушивали при комнатной температуре, после чего взвешивали на аналитических весах. Содержание минеральных компонентов в составе этаполана определяли как разницу навесок исходного ЭПС и  $H^+$ -ЭПС, отнесенную к навеске исходного ЭПС.

Содержание углеводов, ПВК, УК, ЖК и МК в составе ЭПС выражали в процентах к весу условно сухого вещества. За условно сухое принимали вещество, не теряющее веса при высушивании в вакууме при 40<sup>0</sup>С.

**Определение молекулярной массы ЭПС.** Молекулярно-массовый состав ЭПС определяли при помощи разработанного нами метода аналитического градиентного центрифугирования [10]. В качестве стандартов использовали декстраны фирмы “Fluka” с молекулярной массой 13,5; 20; 40; 70; 110; 500 тыс. и

2 млн. Содержание углеводов в полученных после градиентного центрифугирования фракциях (объем 1 мл) определяли по реакции с фенолом и серной кислотой [11].

Содержание компонентов определенной молекулярной массы устанавливали, определяя количество углеводов в соответствующих фракциях, и выражали в процентах к исходному (общему) количеству углеводов. Зная процентное содержание в составе ЭПС компонентов различной молекулярной массы, рассчитывали среднюю молекулярную массу.

Для определения молекулярной массы использовали упаренные концентраты ЭПС (без осаждения изопропанолом и высушивания).

**Исследование реологических свойств растворов этаполана.** Свойства растворов этаполана определяли по изменению их вязкости в присутствии 0,1 М КСl, при рН 4 – 4,5 (при условии перевода ЭПС в Н<sup>+</sup>-форму), а также в системе Cu<sup>2+</sup>-глицин как описано в работе [12]. Указанные реологические свойства определяют практическую значимость этого ЭПС [5].

Исследовали реологические свойства 0,03%-ных (по углеводам) растворов этаполана, полученных на каждом из 4-х этапов его выделения и очистки (культуральная жидкость до диализа, культуральная жидкость после диализа, упаренный концентрат, после осаждения изопропанолом и высушивания).

При сравнении реологических свойств растворов этаполана, синтезированного в различных условиях культивирования, как критерий оценки использовали относительное увеличение вязкости его растворов, которое определяли по формуле:

$$\text{Относительное увеличение вязкости} = \frac{\eta_1 - \eta_0}{\eta_0} \cdot 100\% ,$$

где:  $\eta_1$  - вязкость раствора ЭПС в исследованных условиях (в присутствии 0,1 М КСl, в Н<sup>+</sup>-форме, в системе Cu<sup>2+</sup>-глицин);  $\eta_0$  - вязкость раствора ЭПС в дистиллированной воде. Вязкость растворов этаполана измеряли на стеклянном капиллярном вискозиметре Оствальда при 20°С.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Лакину [13]. Результаты исследований согласно t-критерия Стьюдента оказались статистически достоверными при 5%-ном уровне значимости.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Химический состав нативного и дезацелированного этаполана, синтезированного на среде с различными источниками углеродного питания, представлен в табл. 1. Независимо от природы субстрата, нативные ЭПС характеризовались практически одинаковым содержанием углеводов, пировиноградной, уроновых кислот и минеральных компонентов. Этаполан, синтезированный на смеси этанола и глюкозы, содержал больше жирных кислот. Содержание УК в составе всех нативных ЭПС было невысоким и составляло всего 7-8%. Предыдущими исследованиями было показано, что уроновые кислоты в нативных ЭПС удается выявить только после дезацелирования полисахаридов [14].

Действительно, в составе дезацелированных ЭПС содержание УК было приблизительно в три раза выше, чем в аналогичных препаратах до дезацелирования (табл. 1). После дезацелирования в составе ЭПС повышалось также содержание углеводов, ПВК и существенно снижалось количество МК (более, чем в 6-7 раз).

По нашему мнению, увеличение содержания УК после дезацелирования ЭПС можно объяснить следующим образом. Наличие жирных кислот в составе этаполана обуславливает способность его растворов к структурированию одновалентными катионами, содержащимися в среде культивирования продуцента [5, 15]. Так, в составе нативных ЭПС выявлено около 24-29% МК (табл.1). Вполне вероятно, что при взаимодействии ЭПС с катионами молекулы полисахарида изменяют свою конформацию так, что уроновые кислоты становятся менее доступными для взаимодействия с различными реагентами.

Очевидно, при дезацилировании происходит диссоциация таких высокомолекулярных конгломератов ЭПС, вследствие чего высвобождаются минеральные компоненты, пространственная структура ЭПС изменяется, “блокировка” остатков урановых кислот снимается. Аналогичным образом можно объяснить более высокое содержание ПВК и углеводов в составе дезацилированных ЭПС.

Моносахаридный состав полисахаридов, синтезированных на средах с этанолом, глюкозой и на смешанном субстрате, был одинаковым (табл. 2). Соотношение глюкозы, маннозы, галактозы и рамнозы в исследуемых ЭПС составляло 3:2:1:1. Ранее нами было показано, что в различных условиях культивирования продуцента (на средах с различным содержанием одновалентных катионов, а также при внесении в этанолсодержащую среду фумарата калия) моносахаридный состав синтезируемого этаполана не изменялся [12, 15, 16]. Представленные в данной работе и полученные нами ранее результаты согласуются с известными литературными данными о том, что в различных условиях культивирования основная углеводная цепь полисахарида чаще всего остается неизменной, а наибольшие изменения претерпевают боковые цепи – их длина, состав, число разветвлений, а также состав и природа заместителей [3 – 5].

Данные по молекулярной массе этаполана, полученного на средах с этанолом, глюкозой и смешанном субстрате, представлены в табл. 3 и рис. 1. Средняя молекулярная масса этаполана, синтезированного на смеси этанола и глюкозы, была выше, чем на моносубстратах (табл. 3). Более высокое значение средней молекулярной массы для такого ЭПС обусловлено повышенным содержанием в его составе высокомолекулярных компонентов (свыше 2 млн.). ЭПС, полученные на моно- и смешанном субстратах, различались между собой также соотношением фракций с молекулярной массой от 13 до 500 тыс. (рис. 1). ЭПС, синтезированные на смеси этанола и глюкозы характеризовались невысоким содержанием (около 3 - 4,5%) низкомолекулярных фракций (до 110

тыс.). В составе ЭПС, полученных на моносубстратах (особенно на среде с глюкозой) содержание таких фракций было в 1,5 – 2 раза выше (рис. 1).

Изучение реологических свойств этаполана, полученного на средах с различными источниками углеродного питания показало, что растворы ЭПС, синтезируемого на смешанном субстрате, характеризовались более высокой вязкостью в присутствии 0,1 М КСl, при переводе в  $H^+$ -форму и системе  $Cu^{2+}$ -глицин (рис. 2). Следует отметить, что аналогичная закономерность наблюдалась для такого ЭПС на всех этапах его выделения и очистки.

Ранее нами было показано, что реологические свойства растворов этаполана (способность к структурированию катионами, повышению вязкости в области низких значений рН, в системе  $Cu^{2+}$ -глицин и др.) определяются наличием в его составе жирных кислот. Растворы дезацилированных ЭПС не обладают перечисленными свойствами. Кроме того, реологические свойства растворов этаполана зависят от содержания в его составе жирных кислот [5, 9, 12, 14-16]. Следовательно, более высокая вязкость в присутствии 0,1 М КСl, при переводе в  $H^+$ -форму и системе  $Cu^{2+}$ -глицин растворов ЭПС, синтезированного на смеси этанола и глюкозы (рис. 2), обусловлена более высоким содержанием в составе такого ЭПС жирных кислот (табл. 1). Следует отметить, что улучшение реологических свойств этаполана, полученного на смешанном субстрате, по сравнению с ЭПС, синтезированными на моносубстратах может быть объяснено также более высокой молекулярной массой этого ЭПС (табл. 3). Показано, что вязкость растворов этаполана коррелирует с содержанием в его составе высокомолекулярных фракций (свыше 2 млн.) [5, 14, 15]. Одним из факторов, обуславливающих высокую вязкость растворов ЭПС со смешанного субстрата в присутствии КСl,  $H^+$ -форме и системе  $Cu^{2+}$ -глицин, может являться невысокое содержание в его составе низкомолекулярных компонентов (13,5 – 110 тыс., рис. 1)

Предыдущими исследованиями установлено, что этаполан является комплексным полисахаридным препаратом и состоит из нейтрального (минорный компонент) и двух кислых ЭПС, один из которых ацилирован [9, 12, 14-16].

Реологические свойства растворов этаполана определяются соотношением в его составе ацилированного и неацилированного ЭПС, а также от содержанием жирных кислот в ацилированном полисахариде [12, 14-16]. В настоящей работе исследовали химический состав и реологические свойства суммарных препаратов этаполана, без разделения их на ацилированный и неацилированный компоненты. Проведение таких исследований будет являться предметом нашей дальнейшей работы. Можно ожидать, что ЭПС, синтезированные на смешанном и моносубстратах будут отличаться между собой также соотношением ацилированного и неацилированного полисахаридов и содержанием жирных кислот в ацилированном ЭПС. В пользу такого предположения свидетельствуют данные определения молекулярной массы ЭПС, синтезированных на смешанном и моносубстратах. Так, ранее нами было показано, что этаполан с более высоким содержанием ацилированного компонента имеет более высокую молекулярную массу [15]. Кроме того, одной из задач дальнейших исследований будет выяснение причин, обуславливающих повышенное содержание жирных кислот в составе этаполана при выращивании продуцента на смешанном субстрате.

Таким образом, в процессе проведенной работы установлено, что ЭПС, синтезированные на этаноле, глюкозе и смеси этих субстратов, идентичны по содержанию углеводов, пировиноградной и уроновых кислот, минеральных компонентов, а также по моносакхаридному составу. Этаполан, полученный на смешанном субстрате, характеризовался более высоким содержанием жирных кислот и более высокой средней молекулярной массой, что сопровождалось улучшением реологических свойств его растворов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter sp.* на смеси этанола и глюкозы // Микробиология. 2002. № (В печати).
2. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В., Криштаб Т.П. Интенсификация синтеза микробного экзополисахарида этаполана на смеси ростовых субстратов // Микробиология. 2002. № (В печати).

3. Sutherland I.W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides // *Annu. Rev. Microbiol.* 1985. 39. P. 243-270.

4. Margaritis A., Pace G.W. Microbial polysaccharides // *Comprehens. Biotechnol.*, Oxford. etc. Pergamon press, 1985. Vol.3. P. 1005-1044.

5. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на  $C_1 - C_2$  -соединениях. Киев: Наук.думка, 1992. 212 с.

6. Bejar V., Calvo C., Moliz J., Diazmartinez F., Quesada E. Effect of growth conditions on the rheological properties and chemical composition of *Volcaniella eurihalina* exopolysaccharide // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1996. 59. N 1. P. 77-86.

7. Degeest B., De Vuyst L. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. 65. N 7. P. 2863-2870.

8. Becker A., Ruberg S., Baumgarth B., Bertram-Drogatz P.A., Quester L., Puhler A. Regulation of succinoglucan and galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2002. 4. N 3. P. 187-190.

9. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э., Сенченкова С.Н., Малашенко Ю.Р. Разделение экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter sp.*, на ацилированный и неацилированный компоненты // *Микробиология.* 1994. 63, N 5. С.840-846.

10. Votselko S.K., Pirog T.P., Malashenko Y.R., Grinberg T.A. A method for determining the mass-molecular composition of microbial exopolysaccharides // *Journal of Microbiological Methods.* 1993. 18. P. 349-356.

11. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal.Chem.* 1956. 28. N 3. P.350-356.

12. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Сенченкова С.Н., Малашенко Ю.Р. Химический состав экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter sp.* на средах с различным содержанием  $K^+$  // *Микробиология.* 1995. 65. N 4. С.527-532.

13. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.

14. Пирог Т.П., Краснопевцева Н.В., Гринберг Т.А., Власов С.А., Воцелко С.К., Малашенко Ю.Р. Изменение некоторых свойств экзополисахаридов *Acinetobacter sp.* в процессе периодического культивирования // *Биотехнология.* 1991. N 4. С. 67-70.

15. Пирог Т.П. Принципы регуляции состава и физико-химических свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter sp.* Дисс..... докт. биол. наук. Киев, Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1999. 450 с.

16. Пирог Т.П. Образование ацилированных экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter sp.* // *Микробиология.* 1996. 65, N 5. С.644-648.