

5. Кулагин В. С., Лебедева Н. П., Риль Т. А. Биологические свойства *Bacillus thuringiensis* var. *dendrolitimus* после пребывания на различных растениях. — В кн.: Биология микроорганизмов и их использование в народном хозяйстве. — Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1980, с. 70—74.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1980. — 296 с.
7. Нестерова Р. Н. Биология протей. — Горький: Изд-во Горьков. ун-та, 1972. — 47 с.
8. Рубан Е. Л. Микробиологические липиды и липазы. — М.: Медицина, 1977. — 216 с.
9. Lysenko O. Pathogenicity of *Bacillus cereus* for insects. — *Folia microbiologica*, 1972, 3, N 17, p. 228—231.
10. Toumanoff C. Description de quelques souches entomophytes de *Bac. cereus* Fr. et Fr. avec remarques sur leur action et celle d'autres bacilles sur le jaune d'oeuf. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, N 85, p. 90.

Получено 08.02.83

1985, №6

УДК 579.852.11.222

## ОБРАЗОВАНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ НЕКОТОРЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Т. П. Пирог, А. Т. Слабоспицкая, С. К. Воцелко,  
Мохамед эль Сайд, С. В. Афонская, Т. А. Гринберг

Институт микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев

Установлено, что на интенсивность синтеза экзополисахаридов (ЭПС) культурами *Bacillus polytuxa* и *Bac. oligonitrophilus* влияют как форма, так и концентрация азотного источника питания. При изучении динамики процесса роста и образования ЭПС у *Bac. oligonitrophilus* удалось установить фазы роста культуры, соответствующие максимальной удельной скорости образования ЭПС и максимальной концентрации ЭПС в культуральной жидкости, что позволяет определить продолжительность культивирования продуцента с целью максимального выхода продукта.

По данным седиментационного анализа, ЭПС, синтезируемые *Bac. polytuxa* и *Bac. oligonitrophilus*, гетерогенны. Средняя молекулярная масса ЭПС *Bac. oligonitrophilus* составляет 150 тыс. *Bac. polytuxa* синтезирует комплекс ЭПС с молекулярной массой компонентов от 30 до 100 тыс. В состав кислых ЭПС культур входят глюкоза, галактоза, манноза и фукоза. ИК-спектры ЭПС исследуемых культур свидетельствуют о сходстве химического состава экзополисахаридов.

Бактерии рода *Bacillus* являются продуцентами ряда биологически активных веществ — антибиотиков, ферментов, аминокислот и экзополисахаридов [16]. Однако в литературе имеется мало сведений о полисахаридах микроорганизмов рода *Bacillus*. Описаны структура и физико-химические свойства экзополисахарида, образуемого *Bacillus subtilis* FT-3 [20], изучены внеклеточные полимеры некоторых олигонитрофильных бактерий, принадлежащих к роду *Bacillus* [6, 11—14].

Исследованиями, проведенными ранее в ИМВ АН УССР, показано, что ЭПС, синтезируемые культурами *Bac. oligonitrophilus* и *Bac. polytuxa*, представляют собой биологически активные вещества, которые обладают гемагглютинирующими свойствами, комплементсвязывающей способностью, антивирусными свойствами, оказывают профилактическое действие при экспериментальной стафилококковой инфекции и усиливают лечебное действие антибиотиков, стимулируя факторы неспецифического иммунитета макроорганизма [1—4].

В связи с этим цель наших исследований состояла в изучении интенсивности синтеза ЭПС культурами *Bac. oligonitrophilus* и *Bac. polytuxa*, выделении ЭПС, изучении их некоторых физико-химических свойств.

**Материал и методы.** В работе использованы микроорганизмы *Bac. oligonitrophilus* и *Bac. polytuxa*, выделенные и хранящиеся в музее чистых культур отдела антибиотиков ИМВ АН УССР.

Микроорганизмы выращивали на сусло-агаре, жидком сусле, а также на жидких синтетических средах Кодама [10], Голубева [5], Наофуми [20]. Культивирование на жидких минеральных средах проводили при температуре 30 °С в колбах объемом 750 мл

со 100 мл среды на качалках (220 об/мин). В качестве инокулюма использовали культуру бактерий.

Клетки отделяли центрифугированием при 68000 *g* в течение 1 ч. После супернатанта трехкратным объемом ацетона осаждали ЭПС, который высушивали при комнатной температуре под вакуумом.

Выделение кислых ЭПС проводили методом обработки цетавлоном [15]. Содержание биомассы в культуральной жидкости определяли весовым методом, скорость образования ЭПС культурами рассчитывали по описанным ранее удельным скоростям роста микроорганизмов определяли по общепринятой формуле.

Содержание углеводов определяли по реакции с фенолом и серной кислотой — по методу Бредфорда [19].

Моносахаридный состав ЭПС устанавливали методом газ-жидкостной хроматографии (ГЖХ). Гидролиз ЭПС проводили 4 N HCl в течение 3 ч при температуре 100 °C. Перевод сахаров в ацетаты полиолов осуществляли по общепринятой методике [8]. ГЖХ выполняли на приборе «Хром-5», колонка — 1,2 м × 3 мм, 3% — н-октилсилил — Chromosorb 60/80 меш, температура — 210 °C, газ-носитель — азот.

Количественное соотношение моносахаров определяли путем подсчета пиков по отношению к глюкозе, принятой за единицу. Внутренний стандарт — сахароза (20% от сухого веса препарата).

Гидродинамические свойства водных растворов ЭПС исследовали на центрифуге МОМ-3170в методом скоростной седиментации (седиментационный анализ). Седиментацию проводили в обычной ячейке при 48000 об/мин, диффузионный коэффициент с искусственной границей при 4000—8000 об/мин. Значения коэффициента диффузии определяли общепринятыми методами [18]. По полученным данным рассчитывали молекулярную массу ЭПС, используя уравнение Сведберга.

Вязкость водных растворов ЭПС определяли на вискозиметре Оствальда при температуре 20 °C.

ИК-спектры снимали в виде твердых пленок на подложках из KRS-5 на приборе UR-10.

**Результаты и их обсуждение.** Многие штаммы микроорганизмов отвергаются в настоящее время в первоначальных отборочных экспериментах, так как они продуцируют экзополисахариды на агарных средах, но не способны к синтезу значительных количеств ЭПС на жидких средах.

Изучение способности к синтезу ЭПС у культур *Vac. polytuxa* и *oligonitrophilus* при росте на сухих средах.

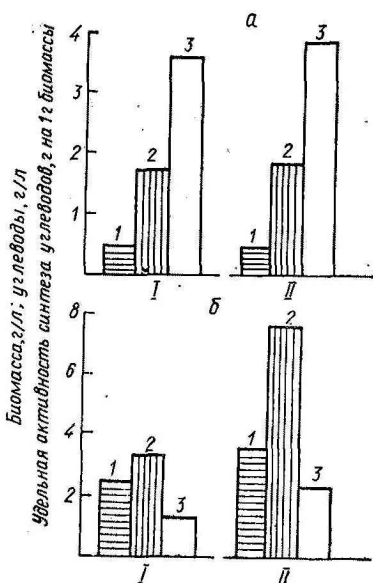


Рис. 1. Накопление биомассы (1), экзополисахаридов (2), удельная активность ЭПС (3) в стационарной фазе роста на сусло-агаре (а) и жидком сусле (б) у *Vac. oligonitrophilus* (I) и *Vac. polytuxa* (II).

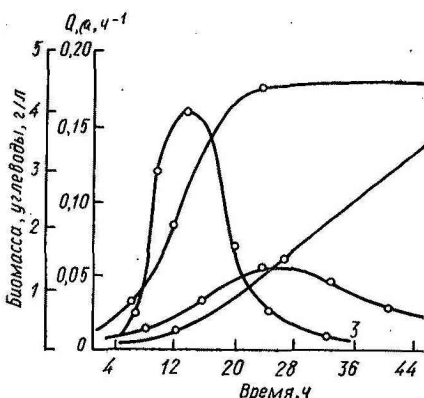


Рис. 2. Динамика накопления биомассы (1), экзополисахаридов (2), удельная скорость роста —  $\mu$  (3), удельная скорость образования ЭПС —  $Q$  (4) у *Vac. oligonitrophilus*.

показало, что интенсивность синтеза ЭПС у обеих культур одинакова, удельная активность образования ЭПС составляет 3,69 г на 1 г биомассы (рис. 1, а). При росте на жидком сусле удельная активность синтеза ЭПС более низкая — 2,2—1,3 г на 1 г биомассы, однако содержание экзополисахаридов в культуральной жидкости достаточно высокое и составляет 8—4 г/л (рис. 1, б).

Таким образом, исследуемые культуры способны к синтезу ЭПС как на агаризованных, так и на жидких средах, однако удельная активность образования ЭПС на жидких средах ниже.

На жидких минеральных средах, содержащих 4 % сахарозы в качестве единственного источника углерода и различающихся по форме источника азотного питания и содержанию азота, *Vac. oligonitrophilus* продуцирует ЭПС с различной интенсивностью (табл. 1). Исследуемая культура ассимилирует как органический, так и неорганический азот; уровень бактериальной массы при росте бактерий на средах Наофуми и Голубева, характеризующихся более высоким содержанием азота, на 25 % выше. Максимальное накопление ЭПС наблюдалось в условиях лимита по источнику азотного питания, т. е. при росте культуры на среде Кодама. При этом снижалось количество биомассы, а удельная активность синтеза экзополисахаридов у *Vac. oligonitrophilus* повышалась почти в два раза.

Неорганические формы азота являются более благоприятными для образования ЭПС по сравнению с органической формой азота. Так, при культивировании *Vac. oligonitrophilus* на среде Наофуми, содержащей нитратный азот в количестве, которое в 1,7—1,8 раза превышает количество азота в среде Голубева, содержащей гидролизат казеина в качестве источника азотного питания, удельная активность синтеза ЭПС такая же, как и на среде Голубева.

Таким образом, наиболее благоприятной минеральной средой для синтеза ЭПС культурой *Vac. oligonitrophilus* является среда Кодама.

Полученные данные свидетельствуют, что процесс образования ЭПС у исследуемых микроорганизмов зависит как от формы, так и от концентрации источника азотного питания.

Исследование возможности применения метанола и этанола в качестве источника углеродного питания показало, что исследуемые культуры не ассимилируют метанол, а при росте на этаноле синтезируют невысокие количества экзополисахаридов (до 0,4 г/л).

Для определения периода максимального накопления ЭПС у *Vac. oligonitrophilus* исследовали динамику этого процесса (рис. 2).

Образование экзополисахарида наблюдается на всех фазах роста культуры, начиная с логарифмической, но максимальные удельные скорости роста и синтеза ЭПС по времени не совпадают. Максимальная удельная скорость образования ЭПС культурой составляет 0,05 ч<sup>-1</sup> и приходится на конец логарифмической фазы роста. Накопление ЭПС у *Vac. oligonitrophilus* продолжается как в стационарной, так и в фазе отмирания клеток, о чем свидетельствует увеличение абсолютной концентрации его в культуральной жидкости.

Для получения максимального выхода ЭПС процесс культивирования следует вести до начала наступления стационарной фазы роста культуры. Это определяет возможность проведения непрерывного хемостатного процесса, в котором лимитирующим фактором является источник азотного питания.

Экзополисахариды, синтезируемые изучаемыми микроорганизмами, легко растворимы в воде (при этом достигается 2,5 %-ная концентрация раствора ЭПС), образуют слабвязкие растворы (вязкость 0,35 %-

Таблица 1. Образование экзополисахаридов *Vac. oligonitrophilus* на разных средах

Среда	Источник азотного питания	Концентрация азота (N) в среде, мг/л	Содержание в культуральной жидкости, г/л		Удельная активность синтеза углеводов, г на 1 г биомассы
			Биомасса	Углеводы	
Среда Кодама	NH <sub>4</sub> Cl	156	4,29	6,13	1,43
Среда Голубева	Гидролизат казеина	280	5,96	4,60	0,77
Среда Наофуми	NaNO <sub>3</sub>	494	6,02	4,91	0,81

ного раствора ЭПС, синтезированного *Bac. oligonitrophilus* 9,39 мм<sup>2</sup>/с). Содержание углеводов в экзополисахаридах кул *oligonitrophilus* и *Bac. polymyxa* составляет соответственно 65, белок не обнаружен.

Результаты седиментационного анализа и рассчитанные намические параметры ЭПС приведены в табл. 2 и рис. 3.

Экзополисахариды, синтезируемые *Bac. oligonitrophilus* и *лутуха*, являются гетерогенными — состоят из нескольких кон

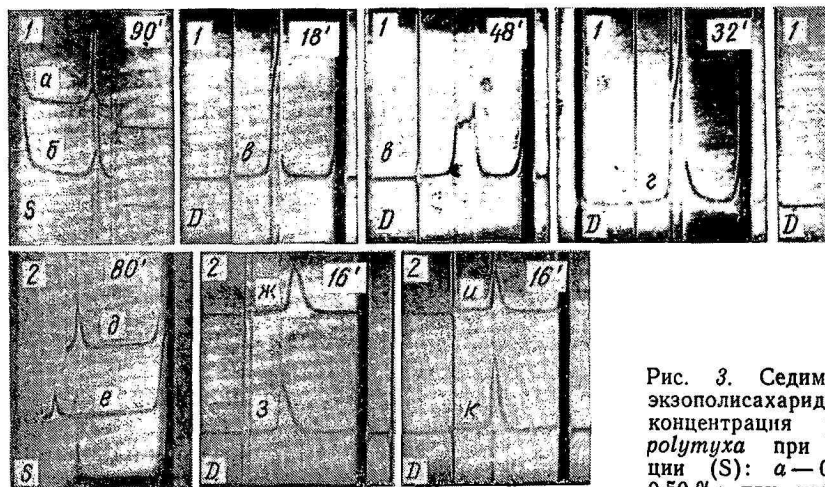


Рис. 3. Седим экзополисахарид концентрации *полмутуха* при ции (S): а—0,50 %; при диффузии (D): б—0,50 %; в—1,00 %; г—1,00 %; ж—0,400 %; з—0,300 %; к—0,350 %.

а — 0,50 %, г — 1,00 %. 2 — концентрация ЭПС *Bac. oligonitrophilus* при с (S): д — 0,350 %, е — 0,175 %; при диффузии (D): ж — 0,400 %, з — 0,300 %, к — 0,350 %.

На неоднородность препаратов указывают результаты диффузии в случае ЭПС *Bac. oligonitrophilus* наблюдается кривая не типа. ЭПС *Bac. polymyxa* в опытах по диффузии делится на три компонента с мол. массами 100000, 70000, 31000, содержание которых составляет 25, 30 и 45 % соответственно.

Таким образом, ЭПС культур *Bac. oligonitrophilus* и *Bac. polymyxa*, представляют комплекс нескольких полисахаридов, что согласуется с имеющимися данными литературы [6, 12, 14].

Таблица 2. Гидродинамические свойства экзополисахаридов *Bacillus oligonitrophilus* и *Bacillus polymyxa*

Продукт ЭПС	$S_{20w}^0 \times 10^{-13}$ , с <sup>-1</sup>	$D_{20w}^0 \times 10^{-7}$ , см <sup>2</sup> /с	Молярная масса
<i>Bacillus oligonitrophilus</i>	2,5	1,0	150
<i>Bac. polymyxa</i>	3,6	2,3	100
	3,6	3,3	70
	3,6	7,4	31

Примечание:  $S_{20w}^0$  — константа седиментации;  $D_{20w}^0$  — константа диффузии; \* Средняя молекулярная масса гетерогенного препарата.

Таблица 3. Соотношение моносахаридов в экзополисахаридах, синтезированных культурами *Bac. oligonitrophilus* и *Bac. polymyxa*

Продукт	Глюкоза	Галактоза	Манноза
<i>Bacillus oligonitrophilus</i>	1,0	1,6	2,3
<i>Bac. polymyxa</i>	1,0	1,5	2,2

Кислые ЭПС, синтезируемые исследуемыми культурами, не отличаются друг от друга по моносахаридному составу. Препараты содержат маннозу, галактозу, глюкозу и фукозу (табл. 3). Наблюдаются лишь некоторые различия в количественном содержании фукозы в составе экзополисахаридов.

Результаты по изучению моносахаридного состава ЭПС *Bac. polymyxa* и *Bac. oligonitrophilus* находятся в соответствии с данными ли-

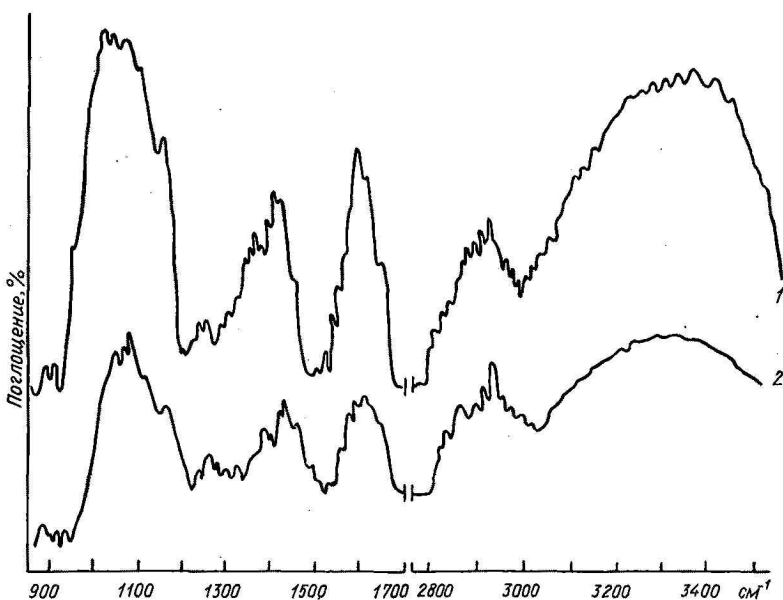


Рис. 4. ИК-спектры экзополисахаридов, синтезируемых культурами *Bac. oligonitrophilus* (1) и *Bac. polymyxa* (2).

тратуры [11] и подтверждают вывод о взаимосвязи таксономического положения микроорганизмов и химическими особенностями их экзополисахаридов [11].

Результаты ИК-спектроскопии ЭПС изучаемых культур (рис. 4) также указывают на сходство химического состава препаратов, так как спектрограммы ЭПС обоих микроорганизмов имеют одинаковый контур кривой. Максимумы поглощения на ИК-спектрах изученных ЭПС свидетельствуют о наличии в молекулах ЭПС двойных связей C=C, C=O, N=O, аминогрупп, гидроксильных групп, групп CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> и β-связей.

Таким образом, изучаемые бактерии *Bac. oligonitrophilus* и *Bac. polymyxa* при культивировании их на жидких минеральных средах продуцируют ЭПС сходного химического состава. По данным седиментации и диффузии, ЭПС культур гетерогенны, и их фракции различаются между собой по молекулярной массе. Результаты проведенных исследований позволяют прогнозировать возможность использования культур рода *Bacillus* с целью получения биологически активных ЭПС.

#### FORMATION AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF EXOPOLYSACCHARIDES OF CERTAIN BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS*

T. P. Pirog, A. T. Slabospitskaya, S. K. Votselko,  
Mokhamed et Said, S. V. Afonskaya, T. A. Grinberg

#### Summary

The intensity of exopolysaccharides (EPS) synthesis of the *Bacillus polymyxa* and *Bac. oligonitrophilus* cultures is established to be affected both by the form and concentration of the nitrogen source of nutrition. The studies in dynamics of the growth process and formation of EPS in *Bac. oligonitrophilus* permit establishing the culture growth stages corresponding to the maximal specific rate of the EPS formation and maximal

concentration of EPS in the culture fluid, that makes it possible to determine on of the producer cultivation for the maximal yield of the product.

The data of the EPS sedimentation analysis showed that *Bac. polymyxa oligonitrophilus* are heterogeneous. The mean molecular weight of the *Bac. oligonitrophilus* EPS is 150000. *Bac. polymyxa* synthesizes the complex of EPS with the weight of components from 30000 to 100000. The acidic EPS cultures consist galactose, mannose and fucose. IR-spectra of the studied EPS cultures evidence clarity of the chemical composition of exopolysaccharides.

1. *Афонская С. В., Мильченко К. П.* Антивирусные свойства полисахаридных комплексов, выделенных из некоторых видов *Bacillus* и *Candida*. — В кн.: съезда микробиологов Украины. Киев : Наук. думка, 1975, с. 217.
2. *Афонская С. В., Колесова Э. А.* Профилактическое действие экстрацеллюлярных полисахаридов некоторых видов рода *Bacillus* при стафилококковом сепсисе. — В кн.: V съезд Укр. микробиол. о-ва: Тез. докл. (Днепропетровск, 29 мая 1980 г.). Киев : Наук. думка, 1980, с. 156.
3. *Афонская С. В., Семерников В. А.* Серологическая активность микробных полисахаридов. — В кн.: Труды VI съезда Всесоюз. микробиол. о-ва (Рига, май 1980, с. 23).
4. *Афонская С. В., Орищук Л. Я.* Сочетанное применение бактериальных полисахаридов и антибиотиков при экспериментальном стафилококковом сепсисе V съезд Укр. микробиол. о-ва: Тез. докл. (Днепропетровск, 26—28 февраля 1980 г.). Киев : Наук. думка, 1980, с. 123.
5. *Бабьева И. П., Голубев В. И.* Методы выделения и идентификации дрожжей. Пищ. пром-сть, 1978. — 120 с.
6. *Воцелко С. К.* Гидродинамические свойства экзополисахаридов олигонитрофильных бактерий. — Микробиол. журн., 1985, 47, № 1, с. 43—48.
7. *Гринберг Т. А., Щурова Э. П., Романовская В. А., Малодетко Ю. Р.* Синтез экзополисахарида у облигатного метилотрофа *Methylococcus* sp. биол. журн., 1983, 45, № 4, с. 44—47.
8. *Захарова И. Я., Косенко Л. В.* Методы изучения микробных полисахаридов. Наук. думка, 1982. — 192 с.
9. *Иерусалимский Н. Д.* Основы физиологии микробов. — М. : Изд-во АН СССР, 1977, 244 с.
10. *Кодама Т., Накахара Т., Омори Т. и др.* Образование внеклеточных полисахаридов и метаниспользующими бактериями. — В кн.: Рост микробов на C<sub>1</sub>-соединениях: Тез. докл. симп. Пушино: ИЦБИ АН СССР, 1977, с. 10—11.
11. *Косенко Л. В.* Моносахаридный состав фракций экзополисахаридов олигонитрофильных бактерий. — Микробиол. журн., 1984, 46, № 1, с. 9—13.
12. *Косенко Л. В.* Разделение экзополисахаридов олигонитрофильных бактерий и определение их молекулярных масс. — Микробиол. журн., 1983, 45, № 8, с. 8—12.
13. *Мальцева Н. М., Косенко Л. В., Иванюк Л. М.* Вивчення позаклітинних речовин олігонітрофілних бактерій. — Микробиол. журн., 1977, 39, № 5, с. 10—11.
14. *Мальцева Н. Н., Воцелко С. К., Иванюк Л. М., Кигель Н. Ф.* Изучение физических свойств экзополисахаридов олигонитрофильных бактерий. биол. журн., 1977, 39, № 6, с. 706—712.
15. *Методы химии углеводов* / Под ред. Н. К. Кочеткова. — М. : Мир, 1967. — 280 с.
16. *Смирнов В. В., Резник С. Р., Василевская И. А.* Спорообразующие аэробы — продуценты биологически активных веществ. — Киев : Наук. думка, 1980, с. 280.
17. *Dubois M., Gille K., Hamilton J. et al.* Colorimetric method for determining carbohydrates. — Anal. Chem., 1956, 28, N 3, p. 350.
18. *Elias H. G.* Ultracentrifugen methoden. — München : Beckman Instrumente, 1968. — 272 S.
19. *Marion M. Bredford.* A rapid sensitive method for the quantitation of microproteins of protein utilizing the principle of protein-dye binding. — Anal. Biochem., 1976, 72, N 2, p. 248—254.
20. *Morita Naofumi, Takagi Masanosuke, Murao Sawao.* A new gel-forming polysaccharide produced by *Bacillus subtilis* FT-3, its structure and its physical and chemical characteristics. — Bull. Univ. Asaka Prefect. B, 1979, 31, N 1, p. 27—41.