

УДК 579.841.82.013:577.114

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ, СИНТЕЗИРУЕМЫХ *ACINETOBACTER SP.* НА СРЕДАХ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ K^+

© 1996 г. Т. П. Пирог, Т. А. Гринберг, С. Н. Сенченкова, Ю. Р. Малащенко

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев

Поступила в редакцию 17.05.95 г.

Экзополисахариды (ЭПС), синтезируемые *Acinetobacter sp.* на средах с различным содержанием K^+ , характеризуются одинаковым молярным соотношением нейтральных моносахаридов (рамнозы, маннозы, галактозы, глюкозы), глюкуроновой и пировиноградной кислот. ЭПС различаются между собой по соотношению в составе ацилированных (АП) и неацилированных (НАП) полисахаридов, а также по содержанию жирных кислот в АП. Свойства растворов ЭПС *Acinetobacter sp.* определяются соотношением АП и НАП и степенью ацилирования АП.

Ранее было показано, что свойства растворов экзополисахаридов (ЭПС) *Acinetobacter sp.* определяются соотношением в их составе ацилированных (АП) и неацилированных (НАП) полисахаридов, которое меняется в процессе периодического культивирования, а также зависит от условий выращивания продуцента (в частности от содержания K^+ в среде) [1,2]. Так, при выращивании бактерий на среде, содержащей 0.025 М K^+ , в стационарной фазе роста отмечается образование НАП, что сопровождается снижением вязкости растворов синтезируемых ЭПС. Кроме того, растворы ЭПС с высоким содержанием НАП не структурируются катионами, не повышают вязкости при понижении рН, в системе Cu^{2+} -глицин и др., т.е. не обладают теми свойствами, которые отличают ЭПС *Acinetobacter sp.* от других микробных ЭПС.

При повышении концентрации K^+ в ростовой среде до 0.050-0.100 М соотношение АП и НАП в составе ЭПС остается практически неизменным на протяжении всего процесса культивирования; содержание АП в ЭПС составляет 70-95%; образование АП продолжается и в стационарной фазе роста продуцента [2].

Установлено, что ЭПС, синтезируемые *Acinetobacter sp.* на средах с различной концентрацией K^+ , отличаются содержанием в их составе жирных кислот [2], причем наблюдаемые различия в содержании жирных кислот у исследуемых ЭПС не могут быть объяснены только различным соотношением в их составе АП и НАП. Вполне вероятно, что содержание жирных кислот в составе ацилированных полисахаридов различно. Следовательно, можно предположить, что свойства растворов ЭПС *Acinetobacter sp.* зависят как от соотношения АП и НАП в составе ЭПС, так и от

содержания жирных кислот в ацилированном полисахариде, т.е. от степени ацилирования АП. Проверка этих предположений определила задачу настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Периодическое культивирование *Acinetobacter sp.* осуществляли в колбах на качалке и ферменте АК-210, как описано ранее [1-3]. Для достижения концентрации K^+ , равной 0.050-0.100 М, в среду дополнительно вносили КСІ.

Выделение и очистку ЭПС, определение химического состава проводили, как описано в ранее [2-3].

1H ЯМР-спектры 1%-ных растворов дезацилированных ЭПС в D_2O снимали на приборе "Bruker WM-250" при температуре 60°C. Дезацилирование растворов ЭПС осуществляли, как описано Пирог с соавт. [3].

Для разделения ЭПС *Acinetobacter sp.* на ацилированный и неацилированный компоненты использовали разработанный нами метод, основанный на том, что растворы ацилированных полисахаридов обладают эмульгирующими свойствами [3]. Следовательно, при эмульгировании растворов ЭПС гексадеканом или хлороформом в эмульсию будут переходить только ацилированные молекулы. Неацилированный полисахарид остается в водной фазе.

Для выделения АП из ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter sp.* на среде с 0.025 и 0.050 М K^+ , осуществляли три этапа разделения исходного ЭПС; для полного извлечения АП из ЭПС, полученных на среде с 0.100 М K^+ , проводили девять этапов разделения. На первом этапе разделения

Таблица 1. Содержание жирных кислот в экзополисахаридах, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+

Содержание K^+ в среде, М	Содержание АП в составе ЭПС, %	Содержание жирных кислот в АП, %
0.025	40	4.0
0.050	70	12.4
0.100	90–95	5.3–5.5

осуществляли эмульгирование раствора исходного ЭПС хлороформом, из эмульсии выделяли ацилированный полисахарид. Полисахарид, выделенный из водной фазы, подвергали повторному эмульгированию хлороформом (второй этап разделения) и т.д. Таким образом, на каждом последующем этапе разделения осуществляли эмульгирование растворов ЭПС, выделенных из водной фазы на предыдущем этапе разделения.

Свойства растворов ЭПС, полученных при культивировании бактерий на средах с различным содержанием K^+ , оценивали по изменению вязкости растворов ЭПС в присутствии катионов, в области низких значений рН (при переводе в H^+ -форму), в системе Cu^{2+} -глицин, т.е. исследовали свойства растворов, обусловленные наличием жирных кислот в составе ЭПС.

Растворы ЭПС, полученные после диализа культуральной жидкости, отделения клеток и концентрирования в вакууме, разбавляли дистиллированной водой до концентрации 0.03% (по углеводам). К полученным растворам ЭПС добавляли КС1 до концентрации 0.1 М; для перевода растворов ЭПС в H^+ -форму проводили обработку растворов ЭПС катионитом КУ-2-8 (H^+) (300 мг смолы на 15 мл раствора ЭПС). Для изучения поведения растворов ЭПС в системе Cu^{2+} -глицин к раствору ЭПС добавляли 0.003 М $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, затем 0.015 М глицина; раствор нагревали до 80°C и выдерживали при этой температуре 5 мин, после чего охлаждали. Вязкость растворов ЭПС измеряли на стеклянном капиллярном вискозиметре типа “Оствальд” при 20°C.

При сравнении свойств растворов ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+ , в качестве критерия оценки использовали относительное увеличение вязкости растворов ЭПС в исследуемых условиях (в присутствии катионов, H^+ -форме, системе Cu^{2+} -глицин). Относительное увеличение вязкости определяли как частное от деления разности значений вязкости растворов ЭПС одинаковой концентрации в исследуемых условиях и в дистиллированной воде на значение вязкости раствора в дистиллированной воде и выражали в процентах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При разделении ЭПС, синтезируемых бактериями на среде с 0.050 М K^+ , удалось выделить 70% АП [3]. Содержание жирных кислот в таком АП составляет 12.4%. В полисахариде, выделенном из водной фазы, обнаружено 1% жирных кислот. Низкое содержание жирных кислот в полисахариде позволило предположить, что этот компонент исходного ЭПС является неацилированным полисахаридом. Присутствие жирных кислот мы объясняли тем, что при использовании разработанного способа нельзя добиться идеального разделения двух полисахаридов. С другой стороны, метод разделения полисахаридов представляет собой экстракцию гидрофобного компонента ЭПС хлороформом, поэтому не исключена возможность попадания следовых количеств жировых загрязнений (в том числе и обломков клеток) в растворы полисахарида, содержащегося в водной фазе.

Разделение на ацилированный и неацилированный компоненты ЭПС, полученных при выращивании бактерий на среде с 0.025 и 0.100 М K^+ , проводили в условиях, аналогичных описанным ранее [3].

Проведение трех этапов разделения ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на среде с 0.025 М K^+ , позволило выделить из исходного ЭПС 40% АП. В полисахариде, выделенном из водной фазы, жирные кислоты обнаружены не были. Следовательно, этот компонент исходного ЭПС является неацилированным полисахаридом. Таким образом, наличие 1% жирных кислот в АП, выделенном из ЭПС, синтезируемом на среде с 0.050 М K^+ [3], обусловлено, очевидно, неполным разделением ЭПС на ацилированный и неацилированный компоненты.

Содержание жирных кислот в АП, синтезируемом *Acinetobacter* sp. на среде с 0.025 М K^+ , составляет 4%, т.е. в 3 раза меньше, чем в составе АП, полученного при выращивании бактерий на среде с 0.050 М K^+ (табл. 1).

Разделение в аналогичных условиях ЭПС, синтезируемых бактериями на среде с 0.100 М K^+ , дало возможность получить около 30% АП с содержанием 5.3% жирных кислот. Эти результаты явились неожиданными, так как ранее было установлено, что содержание АП в составе таких ЭПС достигает 90–95% [2]. Очевидно, трех этапов разделения оказалось недостаточно для полного извлечения АП из исходного ЭПС. Тем более, что в составе ЭПС, выделенного из водной фазы после третьего этапа разделения, также установлено наличие 5.3–5.5% жирных кислот. После проведения еще трех этапов разделения ЭПС результаты были аналогичными: в эмульсию



Рис. 1. ^1H ЯМР-спектры экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на среде с 0.025 M K^+ . а — неацелированный ЭПС; б — ацелированный ЭПС; в — исходный ЭПС. 1 — пировиноградная кислота; 2 — рамноза.

Таблица 2. Химический состав экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+

Концентрация K^+ в среде, М	ЭПС	Молярное соотношение					
		Рамноза	Манноза	Галактоза	Глюкоза	Глюкуроновая кислота	ПВК: рамноза
0.025	Исходный	1.0	2.1	1.0	3.0	0.74	0.9 : 1
	Ацилированный	1.0	2.0	1.0	2.9	0.70	1.0 : 1
	Неацилированный	1.0	2.2	1.0	2.8	0.75	0.85 : 1
0.050	Исходный	1.0	2.3	1.0	3.6	0.83	0.89 : 1
	Ацилированный	1.0	1.9	1.0	3.5	0.70	0.9 : 1
	Неацилированный	0.9	2.1	1.0	3.3	0.80	0.96 : 1
0.100	Исходный	0.9	1.8	1.0	3.1	0.71	0.8 : 1
	Ацилированный	1.0	1.9	1.0	3.3	0.76	0.86 : 1

Примечание. ПВК - пировиноградная кислота.

переходило не более 30% АП (от количества исходного ЭПС), содержание жирных кислот в АП, а также в ЭПС, выделенном из водной фазы, было одинаковым и составляло 5.3-5.5%. После проведения девяти этапов разделения ЭПС удалось выделить около 90-95% АП, содержащего 5.3-5.5% жирных кислот (табл. 1).

Таким образом, ЭПС, синтезируемый *Acinetobacter* sp. на среде с 0.100 М K^+ , является практически полностью ацилированным полисахаридом. Трудности перевода такого АП в эмульсию при экстракции хлороформом связаны, очевидно, с тем, что растворы исходного ЭПС представляют собой достаточно прочную структурированную систему (по типу "жесткой сетки"), образование которой может быть обусловлено равномерным ацилированием молекул полисахарида.

Это предположение может быть подтверждено следующими данными: проведение каждого из девяти этапов разделения такого ЭПС позволяло выделить около 10% АП (от количества исходного ЭПС). Для сравнения: уже на первом этапе разделения ЭПС, полученного на среде с 0.050 М K^+ , в эмульсию переходило 50% АП [3]. Проведение второго и третьего этапов разделения дало возможность выделить еще 15 и 6% АП соответственно.

Таким образом, ЭПС, синтезируемые *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+ , различаются по соотношению АП и НАП, а также по содержанию жирных кислот в составе АП. Очевидно, эти отличия в составе обуславливают различную конформацию, которую приобретают молекулы ЭПС в растворе и, как следствие, различную структуру образуемых ими растворов.

Мы предполагаем, что именно различия в структуре растворов исследуемых ЭПС явились основной причиной различного их поведения при разделении ЭПС на ацилированный и неацилированный компоненты.

Предыдущие исследования показали, что ЭПС, синтезируемые *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+ , отличаются только по содержанию жирных кислот; содержание углеводов, пировиноградной и уроновых кислот в составе ЭПС не меняется [2].

Изучение химического состава исходных ЭПС, синтезированных на средах с 0.025, 0.050 и 0.100 М K^+ , а также выделенных из них АП и НАП, показало, что все исследуемые полисахариды идентичны по молярному соотношению нейтральных моносахаридов, глюкуроновой и пировиноградной кислот (табл. 2). Так, молярное соотношение рамнозы, маннозы, галактозы, глюкозы, глюкуроновой и пировиноградной кислот в составе исследуемых ЭПС составляет 1:2:1:3:1:1. Заниженное количество глюкуроновой кислоты объясняется ее деградацией при гидролизе. Содержание уроновых кислот в ЭПС, определяемое по методу Дише, составляет 15-16% [2].

На рис. 1 приведены 1H ЯМР-спектры исходного и выделенных из него ацилированного и неацилированного полисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на среде с 0.025 М K^+ . Представленные данные (рис. 1), как и результаты, приведенные в табл. 2, свидетельствуют об идентичности химического состава исследуемых ЭПС. Из данных интегральных интенсивностей спектра следует, что количество пирувата и рамнозы в составе ЭПС одинаково (рис. 1).

Очевидно, растворы ЭПС, различающихся между собой по соотношению в их составе АП и НАП и по содержанию жирных кислот в АП, должны обладать различными свойствами. На рис. 2 представлено относительное увеличение вязкости растворов исследуемых ЭПС в присутствии катионов, H^+ -форме и системе Cu^{2+} -глицин. Полученные результаты свидетельствуют о том, что свойства растворов ЭПС *Acinetobacter* sp. зависят от соотношения НАП и АП в составе ЭПС, а также от содержания жирных кислот в ацилированном полисахариде.

Следует отметить, что наличие в составе ЭПС жирных кислот, имеющих экзогенную природу, обычно не характерно для микробных полисахаридов. Известен полисахарид эмульсан, углеводная цепь которого этерифицирована жирными кислотами [4]. Благодаря наличию жирных кислот эмульсан является прекрасным эмульгатором. Эмульгирующая активность эмульсанов определяется как общим количеством остатков жирных кислот в их составе, так и их соотношением [4—6]. Содержание жирных кислот в эмульсане зависит от природы используемого источника углеродного питания в среде культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 [4]. При культивировании штамма на среде, содержащей этанол, пальмитат натрия или додекан, образуются α -эмульсаны, содержащие 5-19% жирных кислот. На среде с этанолом синтезируется эмульсан с максимальным содержанием жирных кислот. При использовании в качестве источника углерода пентадекана, гексадекана, гептадекана синтезируются только β -эмульсаны, содержащие 2-3% жирных кислот [4].

В литературе отмечается, что в отличие от структурных полисахаридов клеточной стенки состав экзополисахаридов может различаться у одного и того же продуцента в зависимости от условий культивирования. При этом основная цепь полисахарида чаще всего остается неизменной, а наибольшие изменения претерпевают боковые цепочки полисахарида – их длина, состав, число разветвлений, а также состав и природа заместителей – ацетильных остатков, O-метильных групп, остатков пировиноградной и других оксикислот, сульфатов и фосфатов. Сведения о влиянии условий культивирования на состав и свойства ЭПС достаточно подробно изложены Гринбергом с соавт. [7].

Экспериментальные данные, приведенные в настоящей работе, показывают, что при изменении условий культивирования *Acinetobacter* sp. (в частности на средах с различным содержанием K^+) соотношение нейтральных моносахаридов, глюкуроновой и пировиноградной кислот в составе синтезируемых ЭПС остается неизменным. При этом меняется соотношение ацилированных

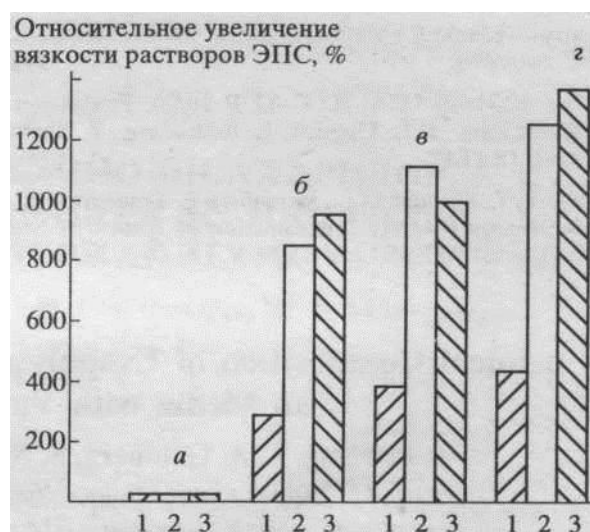


Рис. 2. Относительное увеличение вязкости 0.03% (по углеводам) растворов ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+ , в присутствии 0.1 М K^+ (1), в H^+ -форме (2), системе Cu^{2+} -глицин (3). Содержание K^+ в среде (М): а, б – 0.025; в – 0.050; з – 0.100. а – ЭПС, синтезируемый в стационарной фазе роста (содержание АП 40%); б – ЭПС, синтезируемый в логарифмической фазе роста (содержание АП 65%).

и неацилированных полисахаридов в их составе, а также содержание жирных кислот в АП. Свойства растворов ЭПС *Acinetobacter* sp. (вязкость растворов в присутствии катионов, при понижении рН, в системе Cu^{2+} -глицин) определяется соотношением АП и НАП в составе ЭПС и степенью ацилирования АП.

Представленные данные свидетельствуют о зависимости образования ацилированных полисахаридов от содержания K^+ в ростовой среде. Тем не менее требуется проведение дальнейших исследований для определения условий культивирования *Acinetobacter* sp., обуславливающих как синтез ацилированных полисахаридов, так и степень их ацилирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Пинчук Г.Э. и др. Изменение состава и свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования // Микробиология. 1994. Т. 63. Вып. 6. С. 1015-1019.
2. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Буклова В.Н. и др. Образование экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+ // Микробиология. 1995. Т. 64. № 1. С. 51-54.
3. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э. и др. Разделение экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp., на ацилированный и неацилированный

- компоненты // Микробиология. 1994. Т. 63. Вып. 5. С. 840-846.
4. Pat. 4234689 USA, 1C C 12 P 19/04. Production of α -emulsans (D.L. Gutnick, E. Rozenberg, Y. Shabtai) Publ. 18.11.80.
 5. Belsky /., Gutnick D.L., Rosenberg E. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: determination of emulsifier-bound fatty acids//FEBS Letts. 1979. V. 101. № 1. P. 175-178.
 6. Kaplan K., Zosim Z., Rosenberg E. Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein // Appl. Environ. Microbiol. 1987. V. 53. № 2. P. 440-446.
 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.

Рецензент Л.О. Северина

Chemical Composition of Exopolysaccharides Produced by *Acinetobacter* sp. on Media with Various K⁺ Concentrations

T. P. Pirog, T. A. Grinberg, S. N. Senchenkova, and Yu. R. Malashenko

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

Abstract—Exopolysaccharides produced by *Acinetobacter* sp. grown on media with various contents of K⁺ had the same molar proportion of neutral monosaccharides (rhamnose, mannose, galactose, and glucose) as well as of glucuronic and pyruvic acids. At the same time, they differed in their molar proportion of acylated and nonacylated polysaccharides and the content of fatty acids in their acylated polysaccharides. The properties of the exopolysaccharide solutions of *Acinetobacter* sp. are determined by the relative contents of acylated and nonacylated polysaccharides and the content of fatty acids in acylated polysaccharides.