

УДК. 577.114.5.088.5—984.1.017.7

© 1994 г. 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

Разработан метод разделения экзополисахаридов (ЭПС) *Acinetobacter* sp. на ацилированный и неацилированный компоненты. Оба полисахарида характеризуются одинаковым молярным соотношением нейтральных моносахаридов (рамнозы, маннозы, галактозы, глюкозы), глюкуроновой и пировиноградной кислот. Предполагается зависимость свойств растворов ЭПС *Acinetobacter* sp. от соотношения в их составе ацилированного и неацилированного полисахаридов.

Ранее было установлено, что в состав экзополисахаридов (ЭПС) *Acinetobacter* sp. входят остатки нейтральных моносахаридов глюкозы, галактозы, маннозы и рамнозы, а также кислые группы, представленные остатками пировиноградной и глюкуроновой кислот. Установлено, что остатки нейтральных моносахаридов этерифицированы жирными кислотами [1, 8]. Следует отметить, что наличие в составе ЭПС жирных кислот, имеющих экзогенную природу, обычно не характерно для микробных экзополисахаридов. Известен полисахарид эмульсан, углеводная цепь которого этерифицирована жирными кислотами [12]. Благодаря этому эмульсан является прекрасным эмульгатором. Наличие жирных кислот в составе ЭПС *Acinetobacter* sp. обуславливает ряд уникальных свойств их растворов: способность к структурированию в присутствии одно- и двухвалентных катионов, увеличению вязкости при низких скоростях сдвига, при понижении pH и др. [1, 2], причем для растворов дезацилированных ЭПС такие свойства не характерны [1].

В связи с этим основное внимание в наших исследованиях было направлено на установление закономерностей образования ЭПС с высоким содержанием в их составе жирных кислот. Результаты предыдущих исследований показали, что в зависимости от условий культивирования продуцента содержание жирных кислот в препаратах может изменяться в пределах 1,5—6,0% [8]. Это явление можно объяснить одной из двух причин: либо степень этерификации молекул полисахарида жирными кислотами определяется условиями роста культуры, либо кислый ЭПС *Acinetobacter* sp. состоит из двух компонентов, один из которых содержит жирные кислоты. Для проверки этих гипотез необходимо было разработать способ выделения из исходного препарата компонента ЭПС, содержащего жирные кислоты, что и явилось главным предметом данного исследования

Материалы и методы исследования

Культивирование продуцента ЭПС. Бактерии *Acinetobacter* sp. выращивали на жидкой среде Кодама [6], содержащий 1 об.% этанола в качестве источника углеродного питания. В среду дополнительно вносили 0,0003% пантотената кальция, 0,5 об.% дрожжевого автолизата и KCl до конечной концентрации K^+ 0,05 М.

Культивирование *Acinetobacter* sp. осуществляли в колбах объемом 750 мл со

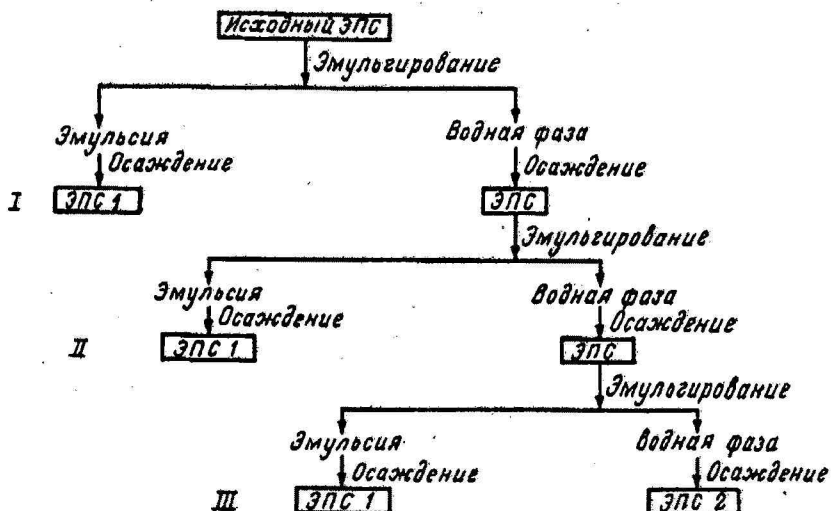


Схема разделения ЭПС *Acinetobacter* sp.

100 мл среды на качалке (220 об/мин) при 30° в течение 5 сут. В качестве посевного материала использовали 2-суточную культуру, выращенную на суло-агаре.

Выделение ЭПС. Культуральную жидкость, содержащую ЭПС, диализовали против дистиллированной воды в течение 7 сут, разбавляли дистиллированной водой в 2—3 раза, центрифугировали для отделения клеток. Супернатант концентрировали в вакууме (50°) до первоначального объема, после чего осаждали ЭПС добавлением 1,5 объема изопропанола. Осадок ЭПС промывали в чистом изопропанолe и высушивали при комнатной температуре.

Разделение ЭПС. Для выделения ЭПС, содержащего жирные кислоты, использовали растворы исходного ЭПС с концентрацией углеводов 0,01—0,02%, переводили их в H⁺-форму путем обработки катионитом КУ-2-8 (H⁺) (500 мг смолы на 100 мл раствора ЭПС) до достижения постоянного значения pH. Смола отделяли центрифугированием. 130 мл раствора ЭПС в H⁺-форме помещали в цилиндрическую делительную воронку объемом 500 мл, добавляли 130 мл хлороформа или гексадекана, воронку закрывали шлифованной пробкой и встряхивали (эмульгировали) в течение 1—7 мин. Полученную после эмульгирования смесь оставляли в делительной воронке на 24 ч для разделения фаз, после чего отдельно сливали эмульсию и водную фазу, центрифугировали их при 12 000 g в течение 30 мин для удаления остатков одной фазы из другой. При использовании хлороформа водную фазу упаривали на ротационном испарителе для удаления хлороформа и концентрирования раствора ЭПС; с эмульсией проводили ту же операцию, предварительно добавив к ней три объема дистиллированной воды. В случае использования гексадекана к эмульсии добавляли два объема изопропанола, выпавший осадок ЭПС многократно промывали изопропанолом для удаления остатков гексадекана. Полисахариды из водной фазы, а также из эмульсии хлороформа осаждали добавлением двух объемов изопропанола. Полученные осадки ЭПС промывали чистым изопропанолом и сушили при комнатной температуре (I этап разделения).

Аналогичную операцию с хлороформом повторяли еще 2 раза для растворов полисахаридов, выделенных из водной фазы (II и III этапы разделения). ЭПС, выделенные из эмульсии на трех этапах разделения, объединяли. Из водной фазы ЭПС был выделен на III этапе разделения (рисунок).

Определение химического состава ЭПС. Для определения нейтральных моносахаридов и урсонных кислот, входящих в состав ЭПС *Acinetobacter* sp.,

Таблица 1

Влияние времени эмульгирования на эффективность разделения ЭПС *Acinetobacter* sp.

Время эмульгирования, мин	Содержание углеводов в водной фазе, % от количества углеводов в исходном растворе
1	62,0
2	61,5
3	60,0
4	59,0
5	48,8
6	48,5
7	48,5

Таблица 2

Выход ЭПС I в процессе разделения исходного препарата

Этапы разделения	Содержание углеводов, % *		Выход ЭПС I, % от исходного ЭПС
	в водной фазе	в эмульсии	
I	50,0	50,0	50,0
II	70,0	30,0	15,0
III	82,0	18,0	6,3

* Числа в колонках 2 и 3 показывают проценты от содержания углеводов в водной фазе, полученной на предыдущем этапе.

образцы гидролизovali в запаянных ампулах с 2N трифторуксусной кислотой в течение 2,5 ч при 121°. Содержание нейтральных моносахаридов и уоновых кислот определяли с помощью углеводного анализатора «Biotronik LC-2000» (колонка 0,38 × 12,5 см, смола Diopex Ax8-11) в 0,5 М Na-боратном буфере (pH 8,0) при 60° и 0,04 М фосфатном буфере (pH 2,4) при 70° соответственно, детектировали при 570 нм после реакции с 2,2'-бицинхонином меди.

Содержание углеводов в ЭПС определяли по реакции с фенолом и серной кислотой [10], пировиноградной кислоты — по описанному методу [11], жирных кислот — весовым методом после дезацилирования растворов ЭПС и выражали в процентах к весу условно сухого вещества. За условно сухое вещество принимали вещество, не теряющее веса при высушивании в вакууме при 40°. Для дезацилирования к 0,15%-ным растворам ЭПС добавляли боргидрид натрия и твердый NaOH из расчета 10 и 500 мг соответственно на 100 мг ЭПС, выдерживали при периодическом перемешивании в течение 48 ч при комнатной температуре, после чего нейтрализовали растворы концентрированной соляной кислотой и осуществляли пятикратную экстракцию жирных кислот гексаном. Для удаления гексана полученный экстракт упаривали на ротаторном испарителе до постоянной массы.

Выделение дезацилированных ЭПС. Для выделения дезацилированных ЭПС к растворам, полученным после экстракции жирных кислот, добавляли изопропанол, осадки ЭПС растворяли в дистиллированной воде, растворы диализовали против дистиллированной воды в течение 5 сут, после чего концентрировали в вакууме и осаждали ЭПС изопропанолом.

Таблица 3

Химический состав ЭПС *Acinetobacter* sp.

ЭПС	Содержание, % к весу условно сухого вещества			Молярное соотношение ПВК и маннозы
	углеводов	ПВК *	жирных кислот	
Исходный:				
до дезацилирования	57,0	3,35	6,5	0,35 : 1
дезацилированный	66,0	4,83	0	0,45 : 1
ЭПС 1:				
до дезацилирования	50,0	2,77	12,4	0,34 : 1
дезацилированный	61,3	4,20	0	0,42 : 1
ЭПС 2:				
до дезацилирования	60,9	3,31	1,0	0,33 : 1
дезацилированный	63,7	4,62	0	0,42 : 1

* ПВК — пировиноградная кислота.

Таблица 4

Молярное соотношение сахаров в ЭПС *Acinetobacter* sp.

ЭПС	Рамноза	Манноза	Галактоза	Глюкоза	Глюкуроновая кислота
Исходный	1	2,3	1	3,6	0,83
ЭПС 1	1	1,9	1	3,5	0,70
ЭПС 2	0,9	2,1	1	3,3	0,80

Результаты

Установлено, что растворы ЭПС *Acinetobacter* sp. эмульгируют минеральные и растительные масла, нефть, пентадекан, гексадекан, значительно хуже бензол, причем более высокой эмульгирующей активностью обладают растворы полисахаридов в Н⁺-форме (Н⁺-ЭПС). Из исследованных соединений в качестве субстрата для эмульгирования при разделении ЭПС *Acinetobacter* sp. нами был выбран гексадекан. Установлено, что если эмульсию гексадекана в растворе Н⁺-ЭПС разделить центрифугированием, то концентрация полисахарида в водной фазе снижается в 2 раза. Мы предположили, что часть полисахарида, имеющая большее сродство к гидрофобным соединениям, чем к воде, переходит в эмульсию. В связи с этим были выделены препараты ЭПС из водной фазы и эмульсии. Полученные препараты различались по свойствам и внешнему виду. ЭПС из эмульсии представлял собой хлопья серого цвета и практически не растворялся в воде и солевых растворах. Подщелачивание или подкисление воды также не способствовало растворению. ЭПС, выделенный из водной фазы, — белого цвета, нитевидный, легко растворим в воде.

Таким образом, при помощи эмульгирования в гексадекане исходный Н⁺-ЭПС можно разделить на два компонента, различающихся по внешнему виду и свойствам. Однако дальнейший анализ гидрофобного компонента оказался невозможным вследствие его нерастворимости в воде.

Поскольку гексадекан является малолетучим соединением (температура кипения 287°), мы предположили, что часть его необратимо связывается с молекулами гидрофобного компонента H^+ -ЭПС, и это приводит к потере способности последнего растворяться в водных системах. Поэтому далее в качестве субстрата для эмульгирования использовался хлороформ.

При изучении динамики связывания ЭПС хлороформом установлено, что оптимальное время эмульгирования составляет 5 мин. За это время в эмульсию переходит около 50% полисахарида (табл. 1). Проведение трех этапов разделения (рисунок) позволяет выделить из исходного препарата 70% ЭПС. При этом на I этапе его выход составляет 50%, на II — 15, на III — 6,3% (табл. 2). Полисахарид, переходящий после эмульгирования в эмульсию, был назван ЭПС 1, а препарат, полученный из водной фазы после разделения исходного ЭПС, — ЭПС 2.

Следует отметить, что ЭПС 1, выделенный при помощи хлороформа, внешне не отличался от препарата, выделенного из эмульсии с применением гексадекана, однако хорошо растворялся в воде; при этом, в отличие от ЭПС 2, для его растворения необходима была щелочь (1 г NaOH для растворения 1 г ЭПС 1).

Следующий этап работы состоял в сравнительном химическом анализе исходного ЭПС, ЭПС 1 и ЭПС 2. Установлено, что в исходном ЭПС *Acinetobacter* sp. содержится 6,5% жирных кислот, в ЭПС 1 — 12,4% и в ЭПС 2 — 1,0% жирных кислот (табл. 3). Следует отметить, что содержание углеводов в ЭПС 2 на 10—11% выше, чем в ЭПС 1. После дезацилирования для всех исследуемых ЭПС отмечается повышение содержания углеводов в их составе, соответствующее количеству отщепленных жирных кислот: наиболее заметное (11,3%) характерно для ЭПС 1, в случае ЭПС 2 содержание углеводов увеличивается незначительно. После дезацилирования количество углеводов в ЭПС всех типов становится практически одинаковым — 60—63% (табл. 3).

Сравнение моносакхаридного состава исходного ЭПС и выделенных из него ЭПС 1 и ЭПС 2 показало, что исследуемые ЭПС содержат одинаковый набор сахаров (табл. 4). Молярное соотношение рамнозы, маннозы, галактозы, глюкозы и глюкуроновой кислоты в составе всех трех полисахаридов практически одинаковое и составляет 1 : 2 : 1 : 3,5 : 1. Заниженное количество глюкуроновой кислоты объясняется ее деградацией при гидролизе. Содержание уоновых кислот, определяемое по методу Дише, в ЭПС *Acinetobacter* sp. составляет 15—17% [8]. Молярное соотношение ПВК и маннозы в исследуемых ЭПС также одинаковое (табл. 3). Его значения, установленные для дезацилированных ЭПС, несколько выше, чем для ЭПС до дезацилирования ((0,42—0,45) : 1 и (0,33—0,35) : 1 соответственно), что можно объяснить устойчивостью ЭПС, не подвергнутых дезацилированию, в условиях кислотного гидролиза [1].

Таким образом, установлено, что ЭПС *Acinetobacter* sp. состоит из двух кислых полисахаридов. Полученные ЭПС характеризуются одинаковым молярным соотношением нейтральных моносакхаридов (рамнозы, маннозы, галактозы и глюкозы), глюкуроновой и пировиноградной кислот, что свидетельствуют об идентичности их химического состава. Различие между полисахаридами состоит в содержании жирных кислот — в ЭПС 2 их содержание значительно ниже, чем в ЭПС 1 (1,0 и 12,4% соответственно).

Низкое содержание жирных кислот в ЭПС 2 позволяет предполагать, что этот компонент исходного ЭПС является неацилированным полисахаридом. Присутствие жирных кислот объясняется тем, что описанным выше способом нельзя добиться идеального разделения двух полисахаридов, и в полученных препаратах ЭПС 2 присутствует некоторое количество ЭПС 1. Другая возможность состоит в том, что описанный выше метод разделения полисахаридов представляет собой экстракцию гидрофобного компонента ЭПС хлороформом, поэтому мы не исключаем возможности попадания следовых количеств жировых загрязнений (в том числе обломков клеток) в растворы ЭПС 2.

На сегодняшний день методы разделения кислых полисахаридов, один из которых содержит жирные кислоты, не известны. Существующие методы позволяют разделить полисахариды на компоненты различной молекулярной массы (например методы гель-хроматографии и градиентного центрифугирования [3, 9]); кислый и нейтральный полисахариды можно фракционировать на анионитах целлюлозы (ДЭАЭ и ЭКТЕОЛА) [4, 7] или при обработке цетилтриметиламмонием бромистым (цетавлоном) [5, 7].

Одним из методов, позволяющим разделить вещества, одно из которых обладает гидрофобной частью, является фракционирование на колонке с гидрофобными носителями, однако его применение для препаративного разделения ЭПС ограничено длительностью и трудоемкостью этого метода, а также высокой вязкостью достаточно концентрированных растворов кислых ЭПС.

С другой стороны, известно, что растворы ацилированных полисахаридов обладают эмульгирующими свойствами. Следовательно, если к раствору исходного препарата ЭПС, представляющего собой смесь полисахаридов с жирными кислотами и без них, добавить субстрат для эмульгирования, то в эмульсию будут переходить только ацилированные молекулы. Эмульгирование углеводорода в растворе ЭПС было использовано Gutnick D. L. с соавт. при выделении из культуральной жидкости ацилированного полисахарида эмульсана, синтезируемого *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 [12]. Наши эксперименты показали, что данный подход можно с успехом использовать и для разделения полисахаридов, один из которых несет в своем составе остатки жирных кислот.

Выше было отмечено, что препараты ЭПС 1, выделенные при помощи гексадекана, теряют способность растворяться в воде. Данное явление можно объяснить тем, что часть молекул гексадекана необратимо связывается с молекулами ЭПС 1 благодаря наличию в его составе остатков жирных кислот. Это предположение тем более вероятно, что размеры углеводородных цепей жирных кислот из полисахаридов (C_{10} — C_{18} [1]) близки к размеру цепи гексадекана. Такое гидрофобное взаимодействие должно быть достаточно сильным, поскольку многократная отмывка гексадекановых препаратов ЭПС 1 изопропанолом, способным растворять гексадекан, не способствовала растворению полисахарида в воде. Вероятно, цепь ЭПС 1 при взаимодействии с каплями углеводорода ориентируется таким образом, что гидрофильные группы плотно экранируют гексадекан, связанный с остатками жирных кислот, и это не позволяет молекулам изопропанола проникнуть к гексадекану. Использование хлороформа вместо углеводорода позволяет удалить его остатки из препаратов ЭПС 1 испарением благодаря хорошей летучести этого растворителя. Очевидно также, что сила гидрофобного взаимодействия между остатками жирных кислот, входящих в состав ЭПС 1, недостаточна для того, чтобы сформировать нерастворимые конгломераты макромолекул полисахарида.

В связи с этим интересно отметить, что эффективное разделение полисахаридов возможно только в том случае, если они предварительно были переведены в H^+ -форму. Этот факт, вероятно, объясняется тем, что при замене в составе ЭПС катионов на протоны меняется конформация молекул, и алифатические концы жирных кислот, этерифицирующих ЭПС, ориентируются таким образом, что могут эффективнее контактировать с эмульгируемым соединением. В то же время ранее было показано, что ЭПС *Acinetobacter* sp. в присутствии катионов некоторых металлов выпадает в осадок, т. е. происходит их необратимое связывание [1]. Кроме того, добавление к растворам ЭПС катионов K^+ , Na^+ , NH_4^+ или Ca^{2+} в определенных концентрациях увеличивает их вязкость [1]. Все это позволяет предположить, что связь катионов металлов с карбоксильными группами молекул полисахарида прочнее, чем связь протонов, и поэтому H^+ -форма ЭПС находится в более диссоциированном состоянии. Если данное предположение верно, то тогда легко объясним тот факт, что ЭПС 2 легко растворяется в воде, в то

время как для растворения ЭПС 1 необходим перевод из H^+ -формы в солевую форму путем подщелачивания. Действительно, в H^+ -форме на конформацию молекулы ЭПС 1 большое влияние будет оказывать отталкивание отрицательно заряженных карбоксильных групп, облегчающее и усиливающее гидрофобное взаимодействие остатков жирных кислот, в результате чего формируются крупные конгломераты молекул полисахарида, что затрудняет их растворение. Перевод H^+ -формы ЭПС 1 в солевую уменьшает количество заряженных карбоксильных групп и соответственно ослабляет их взаимное отталкивание, что делает полисахаридную цепь более подвижной и облегчает растворение. Отсутствие в составе молекул ЭПС 2 остатков жирных кислот делает полисахаридную цепь достаточно подвижной в любой форме и способствует хорошей растворимости препаратов этого полисахарида.

В заключение следует отметить, что полученные нами данные позволяют предположить зависимость свойств растворов препаратов полисахаридов *Acinetobacter* sp. от соотношения в них ЭПС 1 : ЭПС 2. Изучению этого вопроса будут посвящены наши дальнейшие исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гринберг Т. А., Дерябин В. В., Краснопецева Н. В. и др. // Микробиол. журн. 1987. Т. 49. № 4. С. 24.
2. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Полищук А. М., Краснопецева Н. В. // Микробиол. журн. 1990. Т. 52. № 2. С. 100.
3. Детерман Г. Гель-хроматография. М.: Мир, 1970. 252 с.
4. Елинов Н. П. Химия микробных полисахаридов. М.: Высш. шк., 1984. 254 с.
5. Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов. Киев: Наук. думка, 1982. 192 с.
6. Кодама Т., Накахара Т., Омори Т. и др. // Рост микроорганизмов на C_1 -соединениях: Тез. докл. симп. (12—16 сентября 1977 г., Пушкино). Пушкино: НЦБИ АН СССР, 1977. С. 213.
7. Методы химии углеводов / Под ред. Кочеткова Н. К. М.: Мир, 1967. 512 с.
8. Пирог Т. П., Краснопецева Н. В., Гринберг Т. А. и др. // Биотехнология. 1991. № 4. С. 67.
9. Способ определения молекулярно-массовой неоднородности микробных полисахаридов: А. с. 1451166 СССР. С 12 Р 19/00, С 01 11/10. // Б. И. 1989. № 2.
10. Dubois M., Gilles K., Hamilton J. et al. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350.
11. Sloneker J. N., Orentas D. G. // Nature. 1962. V. 194. № 4827. P. 478.
12. Pat. 4234689 USA, IC C 12 P 19/04. Production of α -emulsans (Gutnick D. L., Rosenberg E., Shabtai Y.) Publ. 18.11.80.

Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного
АН Украины, Киев

Поступила в редакцию
30.I.1994

Рецензент Л. О. Северина

PIROG T. P., GRINBERG T. A., PINCHUK G. E.,
SENCHENKOVA S. N., MALASHENKO Y. R.

SEPARATION OF EXOPOLYSACCHARIDES SYNTHESIZED BY *ACINETOBACTER* SP. INTO ACETYLATED AND NONACETYLATED COMPONENTS

The method of *Acinetobacter* sp. exopolysaccharides (EPS) division into acetylated and nonacetylated components has been elaborated. Both polysaccharides are characterized by the equal molar ratio of neutral monosaccharides (rhamnose, mannose, galactose, glucose), glucuronic and piruvic acids. The dependence of the properties of EPS solutions on the ratio of the acetylated and nonacetylated polysaccharides in its composition is supposed.