

УДК 579.845.222.3 :

577.114 © 1990 г.

Т. А. ГРИНБЕРГ, Т. П. ПИРОГ, Ю. Р. МАЛАШЕНКО

ВЛИЯНИЕ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА *ACINETOBACTER* SP.

Исследовали относительную вязкость растворов экзополисахаридов (ЭПС) *Acinetobacter* sp. (капиллярный вискозиметр Оствальда, температура 20°) и динамическую вязкость культуральной жидкости (ротационный вискозиметр «Реомат-108»), Установлено, что относительная вязкость растворов ЭПС увеличивается в присутствии одновалентных катионов. В процессе культивирования *Acinetobacter* sp. наблюдается структурирование синтезируемого ЭПС одновалентными катионами, содержащимися в питательной среде. Повышение в среде культивирования концентрации катионов калия до 0,03—0,10 М или аммония до 0,08—0,15 М не влияет на содержание биомассы и ЭПС, но приводит к увеличению в 4—9 раз вязкости культуральной жидкости, что позволяет улучшить реологические свойства ЭПС. При выборе среды для культивирования *Acinetobacter* sp., как и других продуцентов полисахаридов с целью получения высоковязкого и стабильного по свойствам ЭПС следует учитывать не только удельную потребность культуры в определенных компонентах, но и физико-химические свойства ЭПС и предусмотреть наличие в среде культивирования оптимальных для структурирования ЭПС концентраций катионов.

Известно, что ряд микробных экзополисахаридов (ЭПС) могут структурироваться в присутствии одно- и двухвалентных катионов, что сопровождается повышением вязкости их растворов [1—3]. Обычно осуществление таких модификаций ЭПС проводят на очищенных полисахаридных препаратах. Возможность структурирования ЭПС, синтезируемых микроорганизмами в процессе роста продуцента, катионами, являющимися компонентами минеральной среды, и влияние этих катионов на свойства синтезируемых ЭПС не изучено. Исследование этих закономерностей явилось целью нашей работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Методика**

Объектом исследований служил штамм *Acinetobacter* sp., селекционированный и хранящийся в коллекции Института микробиологии и вирусологии АН УССР. Ацинетобактер синтезирует вязкий ЭПС, состоящий из остатков нейтральных сахаров — глюкозы, галактозы, маннозы, рамнозы, замещенных остатками пировиноградной кислоты в виде кетала и этерифицированных жирными кислотами (C₁₂—C₁₈).

Состав среды для культивирования *Acinetobacter* sp. г/л: NH₄Cl — 0,6; MgSO₄ · 7H₂O — 0,4; KCl — 0,1; CaCl₂ · 2H₂O — 0,01; FeSO₄ · 7H₂O — 0,01; KH₂PO₄ — 0,15; Na₂HPO₄ — 0,35; сахароза — 20; дрожжевой автолизат — 0,2%.

В исходную минеральную среду дополнительно вносили KCl (0,03; 0,10 М) или NH₄Cl — 0,15 М, pH среды (6,8—7,0) поддерживали подщелачиванием 1 М раствором NaOH. Выбор NaOH для этой цели обусловлен тем, что присутствие Na⁺ в концентрации до 0,20 М существенно не влияло на вязкость растворов ЭПС ацинетобактера [3].

Культивирование проводили периодическим способом в аппаратах АНКУМ-2, рабочий объем 1 л. Инокулят — суспензия 3-суточной культуры ацинетобактера, выращенной на агаризованной минеральной среде вышеуказанного состава, составлял 10% по объему, что соответствовало 5 · 10⁹ клеток/мл. Время культивирования 48 ч, температура — 30°, число оборотов мешалки — 700 об/мин, расход воздуха — 3,2 л/л среды мин.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии при длине волны 640 нм с последующим пересчетом на сухой вес по калибровочному графику. Выделение полисахаридного препарата, определение содержания ЭПС и вязкости его растворов проводили как описано в работе [3].

Зольность полисахаридных препаратов определяли при сжигании образцов ЭПС в муфельной печи при 800°. Содержание азота определяли по методу Кьельдаля [4].

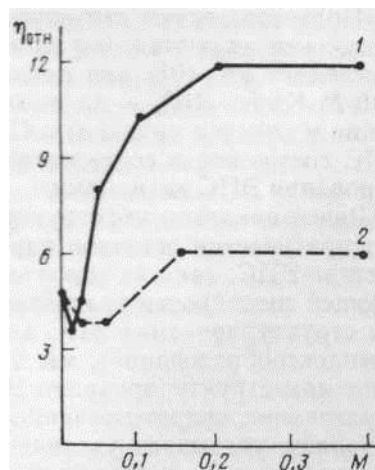
Структурирование растворов очищенных полисахаридных препаратов катионами калия и аммония изучали при добавлении соответствующих концентраций солей KCl и NH₄Cl к 0,1%-ным растворам ЭПС и определением относительной вязкости этих растворов.

Для получения ЭПС культуральную жидкость разбавляли водой в 4 раза, клетки отделяли последовательно центрифугированием при 9,5 тыс. оборотов в течение 50 мин и фильтрацией при 90° через целит-545. Супернатант диализовали против дистиллированной воды в течение 3—5 сут. О полноте диализа судили по отсутствию одновалентных катионов в промывных водах. Супернатант концентрировали в вакууме при 50° до первоначального объема, полисахарид осаждали четырьмя объемами 95%-ного этилового спирта. Выпавший осадок промывали спиртом и сушили в вакууме. Количество углеводов в ЭПС, полученных на средах с различным содержанием одновалентных катионов, составляло 50—70%, качественный состав моносахаридов исследованных полисахаридов не изменялся. В составе ЭПС белок и нуклеиновые кислоты не обнаружены [4].

Результаты и их обсуждение

Установлено, что *Acinetobacter* sp. при культивировании на исходной минеральной среде вышеприведенного состава синтезирует 2,25 г/л ЭПС, вязкость культуральной жидкости при этом — 140,7 сП. Содержание в среде катионов калия составляет 0,002 М, аммония — 0,01 М.

Исследование структурирования 0,1%-ного раствора очищенного ЭПС, полученного на исходной среде, катионами калия и аммония позволило установить, что степень структурирования ЭПС зависит от концентрации каждого из исследованных катионов. Так, вязкость 0,1%-ного раствора ЭПС увеличивается при внесении калия, начиная с 0,025 до 0,10 М, NH₄⁺ — 0,08—0,15 М (рисунок). Дополнительное внесение в исходную среду культивирования ацинетобактера K⁺ до концентрации 0,03 и 0,10 М привело к повышению как динамической вязкости культуральной жидкости в 5 и 10 раз соответственно, так и относительной вязкости 0,1%-ных растворов ЭПС (таблица). В то же время количество биомассы и ЭПС, синтезируемых культурой, не изменилось. Дополнительное внесение в среду катионов аммония в концентрации 0,15 М привело к аналогичному результату (таблица). Аммоний при содержании его в среде выше 0,01 М не используется на образование биомассы, так как рост культуры лимитирован концентрацией дрожжевого автолизата, содержащегося в среде. Избыток NH₄⁺ расходуется на структурирование синтезируемого ЭПС. При культивировании *Acinetobacter* sp. на среде с 0,15 М NH₄⁺ в 1 г биомассы содержится 100 мг азота. В супернатанте после осаждения и отделения ЭПС и биомассы азот не обнаружен.



Влияние концентрации катионов калия (1) и аммония (2) на вязкость 0,1%-ного раствора экзополисахарида

Влияние различных концентраций катионов калия и аммония в среде на образование и реологические свойства экзополисахарида *Acinetobacter* sp.

Содержание одновалентных катионов в среде		Показатели процесса			Относительная вязкость 0,1%-ных растворов ЭПС
катионы	концентрация, моль	биомасса, г/л	ЭПС, г/л	вязкость культуральной жидкости, сП	
K ⁺ NH ₄ ⁺	0,002* 0,010*	2,25	2,20	140,7	4,10
K ⁺ NH ₄ ⁺	0,030 0,010	2,29	2,24	724,3	8,85
K ⁺ NH ₄ ⁺	0,100 0,010	2,25	2,30	1208,4	14,50
K ⁺ NH ₄ ⁺	0,002 0,150	2,85	2,45	502,4	6,50

* Контроль, содержание K⁺ и NH₄⁺ в исходной среде.

Относительная вязкость 0,1%-ных растворов ЭПС, синтезированных на средах с повышенным содержанием K⁺ и NH₄⁺, существенно превышает вязкость 0,1%-ного раствора ЭПС, полученного на исходной среде. Установленная закономерность указывает, что содержание катионов в этом случае недостаточно для структурирования ЭПС, содержащегося в культуральной жидкости (таблица). Повышение концентрации катионов в среде культивирования ацинетобактера до уровня, достаточного для максимального структурирования полисахарида, позволяет получать высоковязкий продукт с улучшенными реологическими свойствами.

Таким образом, увеличение вязкости культуральной жидкости объясняется эффектом структурирования ЭПС, синтезируемого в процессе роста культуры, одновалентными катионами, содержащимися в среде в достаточных для структурирования концентрациях.

Подтверждением структурирования полисахарида *Acinetobacter* sp. катионами являются результаты определения зольности ЭПС, которая составляет 30—40% для полисахарида, полученного на среде с 0,03—0,10 М K⁺ и ~ 10% — на исходной среде при одинаковом способе выделения и очистки препарата. Следовательно, K⁺ находится в связанном с ЭПС состоянии, и содержание зольности в ЭПС зависит от степени структурирования ЭПС катионами.

Ранее показано, что структурирование ЭПС *Acinetobacter* sp. происходит при участии остатков пировиноградной кислоты и жирных кислот в составе ЭПС, так как удаление этих групп приводит к потере гелеобразующей способности полисахарида [3]. Анализируя возможные механизмы структурирования ЭПС катионами (адсорбция, реакции замещения, комплексообразование), мы предполагаем, что наиболее вероятным механизмом структурирования ЭПС *Acinetobacter* sp. является комплексообразование, сопровождающееся выделением протонов в среду. На этот механизм указывает увеличение в 1,5—2,0 раза расхода титранта, затрачиваемого на подщелачивание среды в случае культивирования продуцента на среде с повышенным содержанием катионов по сравнению с расходом его на титрование исходной среды.

Таким образом, одной из причин, обуславливающих повышенную вязкость растворов ЭПС *Acinetobacter* sp., является значительное содержание в составе препарата минеральных компонентов (одновалентных катионов), вызывающих структурирование растворов ЭПС.

Известно, что состав минеральной среды влияет на интенсивность синтеза экзополисахаридов микроорганизмами, поэтому при оптимизации среды, применяемой для культивирования продуцентов ЭПС, учитывают, как правило, влияние минеральных компонентов среды на выход ЭПС. Влияние же этих компонентов на качество синтезированных ЭПС, в частности, на их реологические свойства не учитывают [1, 2, 5].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при подборе состава питательной среды для культивирования как ацинетобактера, так и других продуцентов полисахаридов с целью получения высоковязкого и стабильного по свойствам ЭПС следует учитывать не только удельную потребность культуры в определенных компонентах, но и физико-химические свойства ЭПС и предусмотреть наличие в среде культивирования оптимальных для структурирования ЭПС концентраций катионов. Этот подход позволяет без дополнительных затрат источника углеродного питания и увеличения количества синтезированного ЭПС существенно улучшать качественные характеристики целевого продукта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sandford P. A., Cottrell T. W., Pettitt D. J. // Pure Appl. Chem. 1984. V. 56. № 7. P. 879.
2. Sutherland J. W. // Adv. in Microbial Physiology. 1982. V. 23. P. 79.
3. Гринберг Т. А., Дерябин В. В., Краснопецева Н. В. и др. // Микробиол. журн. 1987. Т. 49. № 4. С. 24.
4. Петров К. П. Практикум по биохимии пищевого растительного сырья. М.: Пищ. пром-сть, 1965. 330 с.
5. Семенова Е. В., Максимов В. П., Волокитина М. В. и др. // Микробиология. 1986. Т. 55. № 4. С. 643.

Институт микробиологии и
вирусологии АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
17.05.1988

T. A. GRINBERG, T. P. PIROG, Yu. R. MALASHENKO
EFFECT OF MONOVALENT CATIONS ON THE REOLOGICAL PROPERTIES OF
ACINETOBACTER SP. EXOPOLYSACCHARIDE

*Institute of Microbiology and Virology, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR,
Kiev*

The authors studied the relative viscosity of *Acinetobacter* sp. exopolysaccharide (EPS) solutions by using an Ostwald capillary viscosimeter (20° C) and the dynamic viscosity of the culture liquid by using a rotation viscosimeter Reomat-108 and found that the relative viscosity of the solutions increased in the presence of monovalent cations. During cultivation of *Acinetobacter* sp., the synthesized EPS was structured by monovalent cations present in the culture medium. Increase of the concentration of potassium cations up to 0.03—0.10 M or ammonium ions up to 0.08—0.15 M had no effect on the cell biomass or the EPS content, but caused a 4—9-fold increase of the culture liquid viscosity, which enabled the EPS reological properties to be improved. When choosing a cultivation medium for *Acinetobacter* sp. and for other polysaccharide producers, one should take into account not only the culture specific requirements in some components, but also the physico-chemical properties of ESP, i. e. the culture medium should contain cations at concentrations optimal for EPS structuration.