

УДК 579.841.4.322

Т. П. ПИРОГ, Т. А. ГРИНБЕРГ, В. В. ДЕРЯБИН\*, Ю. Р. МАЛАШЕНКО

Институт микробиологии и вирусологии АН УССР, Киев,

\* ВНИИбиотехнологии, Москва, 117246

## Эмульсан — представитель нового типа промышленно важных внеклеточных биополимеров

Обобщены имеющиеся данные по получению нового типа промышленно важных внеклеточных биополимеров — эмульсанов. Рассмотрены вопросы селекции и усовершенствования штамма-продуцента, особенности роста и образования биополимера на средах, содержащих этанол и углеводородные субстраты, физико-химические свойства биополимера и перспективы применения его в различных отраслях промышленности.

В конце 70-х годов в литературе появились сообщения [1—4] о выделении кислого этерифицированного жирными кислотами экзополисахарида, продуцентом которого служили бактерии *Acinebacter calcoaceticus* шт. RAG-1. Благодаря высокой специфичности при эмульгировании углеводородных субстратов, содержащих алифатические, ароматические и циклические компоненты, экзополисахарид получил название эмульсан. К середине 80-х годов эмульсан получил широкое практическое применение при очистке емкостей от нефти [5] и в ряде областей, связанных с использованием водно-топливных эмульсий [6]. В настоящее время эмульсан — общее название биополимеров, синтезируемых культурой *A. calcoaceticus* и ее мутантами и обладающих эмульгирующими свойствами. Цель настоящего обзора — обобщить данные по получению эмульсана.

### КЛАССИФИКАЦИЯ ЭМУЛЬСАНОВ [7]

Эмульсан ( $\alpha$ -эмульсан или неоэмульсан) — первый экзополисахарид, получаемый в промышленном масштабе на основе этанола в качестве источника углерода. Он представляет собой внеклеточный микробный липополисахарид, ассоциированный с белком.  $\alpha$ -Эмульсан состоит в основном из N- и O-ацилированных остатков галактозамина и аминокислоты. O-Ацильная часть  $\alpha$ -эмульсана содержит от 5 до 19% (чаще 7—14%) остатков жирных кислот, содержащих 10—18 атомов углерода, причем более 50% жирных кислот составляют 2-гидроксидодекановая и 3-гидроксидодекановая кислоты.

$\beta$ -Эмульсан или протоэмульсан получают культивированием *A. calcoaceticus* RAG-1 на среде с сырой нефтью или гексадеканом. Он отличается от  $\alpha$ -эмульсана меньшим содержанием остатков жирных кислот (2—3%), а также и 3-гидроксидодекановой кислоты (менее 50%).

Обработкой горячим фенолом получают депротенизированные апо-эмульсаны (апо- $\alpha$ -эмульсан и апо- $\beta$ -эмульсан). При мягком щелочном гидролизе эмульсанов получают псевдоэмульсаны ( $\chi$ -эмульсаны), представляющие собой N-ацилированные полисахариды, содержащие до 1% остатков жирных кислот. При дальнейшей щелочной обработке получают проэмульсан, в котором остатки жирных кислот полностью удалены.

### БИОСИНТЕЗ ЭМУЛЬСАНА ШТ. A. CALCOACETICUS RAG-1/ATCC 31012

*A. calcoaceticus* RAG-1 (оптимальная температура роста 30—35° [7]) синтезирует внеклеточный полимер при культивировании на среде, содержащей в качестве источника углерода углеводороды, ацетаты, жирные кислоты или этанол. Количество этанола в среде культивирования составляет 1,25—3,0 об.% [7]. Этанол частично может быть заменен уксусной кислотой [1, 8, 9]. При культивировании штамма на среде, содержащей этанол, пальмитат натрия или додекан, образуются  $\alpha$ -эмульсаны, причем на среде с этанолом содержание остатков жирных кислот в полимере максимально. При использовании в качестве источника углерода пентадекана, гексадекана или гептадекана образуются только  $\beta$ -эмульсаны [7].

Для образования эмульсана необходимо наличие в среде азотсодержащих компонентов (сульфат аммония, хлорид аммония, нитраты, мочевины) в количестве, превышающем удельную потребность культуры, так как синтезируемый полимер состоит в основном из производных аминокислот [7, 8, 10]. В качестве источника фосфора используют одно- или двухзамещенный фосфат калия [7]. Для приготовления питательной среды может быть использована морская или водопроводная вода. В дистиллированную воду необходимо добавлять соли  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  в концентрации 1—100 мМ [7]. Температура культивирования 30°, pH среды 6,2—6,7. Независимо от используемых источников углерода синтез эмульсана *A. calcoaceticus* RAG-1 начинается с первых часов культивирования, т. е. идет параллельно с ростом и продолжается в стационарной фазе после прекращения роста культуры.

Эмульсан образуется в двух формах: свободный, выделяемый в культуральную среду, и ассоциированный с клетками, соотношение которых зависит от фазы роста культуры [7, 8, 11, 12], от активности эстеразы, способствующей отделению эмульсана от клеточной поверхности. Оно может регулироваться ингибиторами синтеза белка [8, 10, 11, 13]. С помощью иммуносорбентного анализа было показано, что в ранний период экспоненциальной фазы роста *A. calcoaceticus* эмульсан связан с клетками и образует миникапсулы. Количество ассоциированного с клетками эмульсана быстро уменьшается к концу стацио-

нарной фазы роста продуцента [8, 14]. Это сопровождается увеличением его количества в КЖ [8]. Иммуноцитохимическое окрашивание с использованием противоземляниновых антител также показало, что эмульсан — главный компонент миникапсул (125 нм), покрывающий клетки в экспоненциальной фазе их роста [12].

Для отделения эмульсана от клеток необходима активная эстераза — фермент, катализирующий гидролиз ацильных и других ацильных групп [13]. При культивировании *A. calcoaceticus* на среде с этанолом активность эстеразы была обнаружена как в КЖ, так и на поверхности клеток. Летки, с поверхности которых эстераза была удалена, теряли способность выделять эмульсан. Очевидно, процесс отделения эмульсана заключается в разрыве эфирной связи, с помощью которой эмульсан закреплен на поверхности клеток [13].

В ряде работ было показано, что введение в среду культивирования *A. calcoaceticus* ингибиторов синтеза белка (стрептомицин, тетрацилин, хлорамфеникол) увеличивает содержание в среде внеклеточного эмульсана в несколько раз [8, 10, 11]. Для исследования механизма биосинтеза эмульсана в присутствии хлорамфеникола использовали  $^{14}\text{C}$ -этанол. Показано, что около 40 % эмульсана синтезировалось клетками до добавления хлорамфеникола, а 60 % — *de novo*. Относительное количество ассоциированного с клетками внеклеточного эмульсана в присутствии хлорамфеникола оставалось постоянным [8, 11]. По-видимому, он влияет лишь на биосинтетическую активность образования эмульсана, но не на отделение эмульсана с поверхности клетки. Биосинтез эмульсана блокируется в анаэробных условиях и в присутствии ингибиторов дыхания, таких как  $\text{KCN}$ ,  $\text{NaN}_3$  [8, 10, 11].

При использовании этанола в качестве источника углерода количество синтезированного эмульсана составляет 4—5 г/л [7]. При обработке культуры *N*-метил-*N*-нитрозогуанидином были получены мутанты *A. calcoaceticus*, устойчивые к пептилтриметиламмонийбромиду в концентрации 10 мкг/мл и характеризующиеся повышенным образованием эмульсана [15]. Мутанты раньше начинают синтезировать эмульсан и накапливают его с большей скоростью по сравнению с родительским штаммом. В присутствии хлорамфеникола покоящиеся клетки мутантов образуют вдвое больше эмульсана, чем шт. *RAG-1*. По мнению авторов [15], это связано с генетическими изменениями у мутантов.

При исследовании образования эмульсана 16 штаммами *A. calcoaceticus* при росте на среде с 2 %-ным этанолом было обнаружено, что величина эмульгирующей активности (способность образовывать эмульсии с разными углеводородами) изменялась у различных штаммов в широких пределах [15]. У штаммов, хорошо растущих на этаноле (2,4—2,6 мг сухой биомассы на 1 мл), эмульгирующая активность КЖ составляла 88—239 ед/мл, а у штаммов, накапливающих 1,0—1,7 мг сухой биомассы на 1 мл, величина эмульгирующей активности КЖ — 14—52 ед/мл [16].

#### ОБРАЗОВАНИЕ ЭМУЛЬСАНА ПРИ РОСТЕ *A. CALCOACETICUS* НА СЫРОЙ НЕФТИ И ГЕКСАДЕКАНЕ

При культивировании *A. calcoaceticus* на сырой нефти образуется эмульсан, ассоциированный

с клетками [14]. Для выяснения роли эмульсана в утилизации нефти была изучена особенность роста двух штаммов *A. calcoaceticus* — *RAG-1* и мутанта, неспособного к образованию эмульсана. Оба штамма одинаково хорошо росли на среде с этанолом. В то же время на сырой нефти мутант, дефектный по эмульсану, рос значительно хуже, чем *RAG-1*, независимо от того, добавляли в среду эмульсан или нет [14]. Ревертант дефектного по эмульсану мутанта, способный к образованию ассоциированного и свободного эмульсана, хорошо рос на сырой нефти. При использовании гексадекана как источника углерода для выращивания *A. calcoaceticus* *RAG-1* был обнаружен только ассоциированный с клетками эмульсан [1, 9].

Известно, что рост микроорганизмов на углеводородах часто сопровождается эмульсификацией нерастворимого источника углерода [17—19]. Изучение способности клеток *A. calcoaceticus* *RAG-1* прикрепляться к углеводородам, в частности к гексадекану с образованием стабильной эмульсии показало, что клетки штамма обладают таким свойством, если они выращены на углеводородном субстрате. Однако это свойство не связано со способностью потребления гексадекана [20, 21]. После культивирования штамма в условиях, при которых на клетках образуется большая капсула из эмульсана (около 20 % массы сухого вещества), клетки теряли способность прикрепляться к углеводородам [20].

Мутант шт. *RAG-1*, лишенный тонких фимбрий (диаметр 35 А), утрачивал способность прикрепляться к гидрофобной поверхности и на среде с гексадеканом рос значительно медленнее исходного штамма. Производные этого мутанта, дефектные по эмульсану, восстанавливали способность прикрепляться к гидрофобной поверхности и росли на среде с гексадеканом со скоростью, близкой к скорости роста *RAG-1*. По-видимому, на поверхности клеток *RAG-1* помимо тонких фимбрий существуют иные, скрытые эмульсаном гидрофобные участки [22—24].

Ассоциированный с клетками эмульсан обуславливает устойчивость шт. *RAG-1* и его мутантов к фагам ар-2 и ар-3, выделенным из сточных вод. По-видимому, благодаря эмульсану фаги не способны адсорбироваться на поверхности клеток [11, 12, 25].

#### СОСТАВ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭМУЛЬСАНА

$\alpha$ -Эмульсан выделяют из КЖ осаждением сульфатом аммония или переводом в водонерастворимую четвертичную аммониевую соль. Благодаря большому количеству остатков жирных кислот в молекуле эмульсана может быть выделен экстракцией органическими растворителями [3, 7]. Содержание белка в  $\alpha$ -эмульсане — 5—15 %. Депротенизацией  $\alpha$ -эмульсана получают апо- $\alpha$ -эмульсан, который фракционным осаждением сульфатом аммония удается разделить на кислый и нейтральный компоненты. Кислый компонент составляет около 85 % от массы суммарной фракции. Он называется апо- $\alpha$ -эмульсан-WA [3, 4, 7]. Титрование карбоксильных групп апо- $\alpha$ -эмульсана-WA дает единственную точку перегиба, соответствующую их содержанию 1,5 мкмоль на 1 мг.

Таблица 3

Стабилизация эмульсии гексадекан—вода промышленными полисахаридами

Полисахарид	Вязкость (концентрация 0,5 мг/мл), сП	Стабильность, % эмульсии* различных концентраций, мг/мл		
		0,02	0,05	0,1
Эмульсан	0,98	13	63	74
Апоэмульсан	1,40	14	62	75
Метилцеллюлоза	1,20	4	13	27
Ксантан	2,47	10	19	21

\* Стабильность эмульсии определяли как отношение оптической плотности эмульсии после 24-часового выдерживания к оптической плотности свежеприготовленной эмульсии, умноженное на 100.

Эмульгирующая активность эмульсана зависит также от молекулярной массы полимера. Так, при обработке эмульсана эмульсандеполимеразой образуются фрагменты с молекулярной массой  $3 \cdot 10^3$ , при этом эмульгирующая активность снижается на 75% [26].

Сравнительная оценка эмульгирующей активности различных биополимеров показывает, что эмульсан — наиболее эффективный стабилизатор, причем это свойство сохраняется для различных концентраций эмульгаторов [9] (табл. 3). Очевидно, это связано с его гидрофобностью.

#### ЭМУЛЬСАН КАК СТАБИЛИЗАТОР ВОДНО-ТОПЛИВНЫХ ЭМУЛЬСИЙ

Эмульсан эмульгирует легкие фракции нефти, дизельное топливо, сырую нефть и газойли [2]. Скорость образования эмульсии зависит от концентрации углеводорода и эмульгатора. При pH выше 6,0 для образования стабильных эмульсий необходимы наибольшие концентрации (1—100 мМ) солей  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  [1, 7].

Исследование влияния эмульсана на образование и стабилизацию водно-топливных эмульсий показало, что при добавлении эмульсана стабильность всех эмульсий возрастает (см. табл. 3), однако эффект стабилизации различен для разных углеводородов. Чем выше молекулярная масса жидкого углеводорода, тем эффективнее стабилизирующее действие эмульсана. Ароматические и алифатические углеводороды в отдельности эмульгируются слабо, а их смеси — достаточно хорошо. Так, для получения стабильных эмульсий с керосином и газойлем требуется добавление ароматических углеводородов, таких как 2-метилнафталин. Из большого количества производных алкилбензола и циклогексана только гексил-, гептилбензол, октил- и децилциклогексан образуют стабильные эмульсии в присутствии эмульсана [2].

При центрифугировании эмульсии, содержащей гексадекан, удалось отделить так называемую фазу эмульсан—золь, содержащую капли углеводорода, покрытые эмульсаном и водой. Эмульсан—золь обладает свойствами, не характерными ни для чистого эмульсана, ни для гексадекана, — связывает растворимый в воде краситель родамин В. Диализ показал, что краситель связывается только с фазой эмульсан—золь. Если убрать из системы углеводород или эмульсан или заменить эмульсан метилцеллюлозой, краситель легко удаляется при диализе [9].

Апо- $\alpha$ -эмульсан состоит (в % от сухой массы полимера) из остатков D-галактозамина (30%), аминокротоновой кислоты (33,3%), D-глюкозы (5,2%); жирных кислот (15%); зольность препарата составляет 3,5%, влажность 13% [3].

Молекулярная масса эмульсана, вычисленная на основании характеристической вязкости, составляет  $9,88 \cdot 10^5$ ; молекулярная масса, определенная методом седиментации и диффузии, —  $9,76 \cdot 10^5$  [3, 7]. Величина характеристической вязкости  $\alpha$ -эмульсана, апо- $\alpha$ -эмульсана и апо- $\alpha$ -эмульсана-WA в 0,15 М трис-буфере при pH 7,4 составляет соответственно 470, 505 и 750  $cm^3/g$ . В присутствии 0,03—0,15 М NaCl и в интервале pH 3,0—8,5 вязкость практически не меняется [3, 7]. Для апо- $\alpha$ -эмульсана-WA константа диффузии составляет  $5,25 \cdot 10^{-8} cm^2/s$ , константа седиментации — 6,06 S. Относительно высокая внутренняя вязкость, низкая константа диффузии и седиментации указывают на то, что структура апо- $\alpha$ -эмульсана-WA несимметрична [3, 7].

#### ЭМУЛЬГИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ЭМУЛЬСАНА

$\alpha$ -Эмульсаны отличаются от  $\beta$ -эмульсанов большим содержанием остатков жирных кислот и, соответственно, более высокой эмульгирующей способностью (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика  $\alpha$ - и  $\beta$ -эмульсанов и их депротенизированных производных

Эмульсан	Выход в процессе культивирования, мг/мл	Содержание жирных кислот, %	Соотношение А/В*	Эмульгирующая способность, ед/мл
$\alpha$ -Эмульсан	1,0—5,0	—	—	200—350
Апо- $\alpha$ -эмульсан	—	7—14	0,25—0,5	100—200
$\beta$ -Эмульсан	0,1—0,75	—	—	50—200
Апо- $\beta$ -эмульсан	—	2—3	0,8	27—75

\* А — 2-гидроксидодекановая кислота; В — 3-гидроксидодекановая кислота; — нет данных.

Эмульгирующая активность  $\alpha$ -эмульсанов, содержащих до 1% остатков жирных кислот, составляет 50% первоначальной активности эмульсана; проэмульсаны, лишенные жирных кислот, вообще не обладают эмульгирующей активностью.

В работах [4, 7] показано, что на эмульгирующую активность эмульсанов влияет не только общее количество остатков жирных кислот, но и их соотношение. Жирнокислотный состав эмульсанов представлен в табл. 2.

Таблица 2

Жирнокислотный состав  $\alpha$ - и  $\beta$ -эмульсанов

Жирные кислоты	Содержание жирных кислот, % от массы препарата	
	$\alpha$ -Эмульсан	$\beta$ -Эмульсан
Декановая	0,34	0,39
Додекановая	1,70	0,41
Дбдеценная	0,18	0,08
2-Гидроксидодекановая	0,78	0,44
3-Гидроксидодекановая	2,92	0,54
Гексадекановая	0,05	Следы
Гексадеценная	Следы	То же
Октодекановая	0,02	»
Октодеценная	Следы	»
Неидентифицированные кислоты	0,89	0,53
Всего	7,40	2,40

В настоящее время около 1 % нефти, перевозимой в танкерах, смывается в море [5]. Обычно для удаления нефти используют различные детергенты, большинство из которых являются токсичными для обитателей морей [7]. Применение эмульсана для очистки поверхности воды и берегов от нефти способствует защите окружающей среды. Эмульсанами очищаются остатки нефти, оставшиеся на днищах танкеров, барж, трубопроводов, цистерн [2, 8].

Известно также, что эмульсаны не адсорбируются на известняках. Если эти породы насыщены нефтью, при обработке эмульсанами наблюдается извлечение нефти из песка на 97 % и из известняка на 98 %. Очевидно, эмульсаны могут найти применение для извлечения нефти из песчаных и известняковых пород (7). В то же время эмульсаны адсорбируются на алюмосиликатных глинах (каолин, бентонит), что приводит к флокуляции глинистых частиц. На этой основе возможно применение эмульсанов в качестве флокулирующего агента для глинистых структур, для увеличения пористости твердых пород в процессе структурирования обедненных почв в сельском хозяйстве, для создания покрытий на поверхности содержащих глины [7]. Сорбционные свойства эмульсанов предложено использовать для очистки воды от нефти и углеводородов путем фильтрации загрязненных вод через алюмосиликатные глины в присутствии эмульсана [7]. Эмульсан обладает свойством связывать металлы; предложено использовать эмульсан в качестве добавки к нефти, которая применяется как топливо в смеси с 25 % воды [6].

На сегодняшний день мировой рынок ограничен относительно небольшими объемами полисахаридов, получаемых микробиологическим путем. С этой целью, сдерживающих расширение их промышленного производства, существенное место занимает дефицит углеводсодержащего сырья, лежащего в основе биосинтеза таких экзополисахаридов как хитин, склероглюкан и др. Расширение сырьевой базы — одна из актуальных задач биотехнологии экзополисахаридов. Исследования, проведенные по получению эмульсана с использованием неуглеводных субстратов — этанола и углеводов, показывают возможность успешного решения этой задачи.

Другая важная задача биотехнологии экзополисахаридов — изыскание биополимеров с новыми свойствами, расширяющими возможность их практического использования. Ярким примером такого типа биополимеров является эмульсан.

Получено 21.01.88

ЛИТЕРАТУРА

Rosenberg E., Zuckerberg A., Rubinovitz C. et al. // Appl. and Environ. Microbiol.— 1979.— V. 37.— N 3.— P. 2—408.

2. Rosenberg E., Perry A., Gibson D. T. et al. // Ibid.— P. 409—413.
3. Zuckerberg A., Divor A., Perry A. et al. // Ibid.— P. 414—420.
4. Belsky I., Gutnik D. L., Rosenberg E. // FFBS Lett.— 1979.— V. 101.— N 1.— P. 175—178.
5. Chemical Marketing Reporter.— 1983.— V. 223.— N 25.— P. 4.
6. Environmental Science Technology.— 1983.— V. 17.— N 3.— P. 116a.
7. Патент США № 4234689, 1980.
8. Goldman S., Shabtai Y., Rubinovitz C. et al. // Appl. and Environ. Microbiol.— 1982.— V. 44.— N 1.— P. 165—170.
9. Zosim Z., Gutnik D. L., Rosenberg E. // Biotechnol. Bioengin.— 1982.— V. 24.— N 2.— P. 281—292.
10. Rubinovitz C., Gutnik D. L., Rosenberg E. // J. Bacteriol.— 1982.— V. 152.— N 1.— P. 126—132.
11. Gutnik D. L., Bayer F. A., Rubinovitz C. et al. Adv. Biotechnol. Proc. 6th Int. Ferment. Symp., London (Canada), 20—25 July 1980. V. 3.— Toronto e. a., 1981.— P. 455—459.
12. Pines O., Bayer F. A., Gutnik D. L. // J. Bacteriol.— 1983.— V. 154.— N 2.— P. 893—905.
13. Shabtai Y., Gutnik D. L. // J. Bacteriol.— 1985.— V. 161.— N 3.— P. 1176—1181.
14. Pines O., Gutnik D. L. // Appl. and Environ. Microbiol.— 1986.— V. 51.— N 3.— P. 661—663.
15. Shabtai Y., Gutnik D. L. // Appl. and Environ. Microbiol.— 1986.— V. 52.— N 1.— P. 146—151.
16. Sar Nechemia, Rosenberg E. // Curr. Microbiol.— 1983.— V. 9.— N 6.— P. 309—313.
17. Hisatsuka K., Nakahara T., Sono N. et al. // Agric. Biol. Chem.— 1971.— V. 35.— P. 686—692.
18. Erickson I. E., Nakahara T. // Proc. Biochem.— 1975.— V. 10.— P. 9—13.
19. Gutnik D. L., Rosenberg E. // Annu. Rev. Microbiol.— 1977.— V. 31.— P. 379—396.
20. Rosenberg E., Kaplan N., Pines O. et al. // FEMS Microbiol. Lett.— 1983.— V. 17.— N 1—3.— P. 157—160.
21. Rosenberg M., Rosenberg E. // Oil and Petrochem. Pollut.— 1985.— V. 2.— N 3.— P. 155—162.
22. Kaplan N., Rosenberg E. // Appl. Environ. Microbiol.— 1982.— V. 44.— N 6.— P. 1335—1341.
23. Rosenberg M., Perry A., Bayer E. A. et al. // Infec. and Immun.— 1981.— V. 33.— N 1.— P. 29—33.
24. Pines O., Gutnik D. L. // FEMS Microbiol. Lett.— 1984.— V. 22.— N 3.— P. 307—311.
25. Pines O., Gutnik D. L. // Arch. Microbiol.— 1981.— V. 130.— P. 129—133.
26. Shoham Y., Rosenberg E. // J. Bacteriol.— 1983.— V. 156.— N 1.— P. 161—167.
27. Патент США № 4395353, 1983.
28. Chemical Marketing Reporter.— 1984.— V. 225.— N 13.— P. 5.

T. P. PIROG, T. A. GRINBERG, V. V. DERYABIN\*,  
YU. P. MALASHENKO  
Institute of Microbiology and Virology, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev  
\*All-Union Research Institute of Biotechnology, Moscow, 117246

Emulsan — a Novel Type of Industrially Important Extracellular Biopolymers

The data of the production of a novel type of industrially important extracellular biopolymers — emulsan — are reviewed. The problems of selection and improvement of the strain-producer, its growth properties and formation of the biopolymer on ethanol and carbohydrate substrates are considered. The physico-chemical properties of the biopolymer and the perspectives of its employment in different branches of industry are also discussed.