

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 579.841.92.017.7:577.114

ВЛИЯНИЕ ОДНОВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ
АЦИЛИРОВАННЫХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ
ACINETOBACTER SP.

© 1996 г. Т. П. Пирог

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев Поступила в редакцию 17.05.95 г.

Образование ацилированных полисахаридов *Acinetobacter* sp. определяется концентрацией одновалентных катионов (K^+ и Na^+) в среде культивирования и не зависит от соотношения катионов калия и натрия, а также от содержания в среде анионов (Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}).

Ранее было показано, что экзополисахарид (ЭПС) *Acinetobacter* sp. состоит из нейтрального и двух кислых ЭПС, один из которых является ацилированным [1-4]. Свойства растворов ЭПС определяются соотношением в их составе ацилированных (АП) и неацилированных (НАП) полисахаридов, а также содержанием жирных кислот в АП [4].

Установлена зависимость образования ацилированных полисахаридов *Acinetobacter* sp. от содержания K^+ в ростовой среде [3, 4]. Так, при выращивании бактерий на средах, содержащих 0.025; 0.050; 0.100 М K^+ , синтезируются ЭПС, в составе которых обнаружено от 40 до 95% АП; содержание жирных кислот в АП составляет от 4.0 до 12.4% [4]. Тем не менее на основании имеющихся экспериментальных данных нельзя сделать однозначный вывод о влиянии катионов K^+ , содержащихся в среде культивирования, на образование ацилированных полисахаридов *Acinetobacter* sp.

При изменении концентрации K^+ в ростовой среде изменяется содержание некоторых анионов, соотношение катионов калия и натрия, которые также могут влиять на образование ацилированных полисахаридов.

В связи с изложенным выше целью настоящей работы являлось исследование влияния одновалентных катионов и анионов, содержащихся в среде культивирования *Acinetobacter* sp., на синтез ацилированных полисахаридов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Периодическое культивирование *Acinetobacter* sp. осуществляли в колбах на качалке и ферментере АК-210, как описано ранее [1, 3, 4].

Бактерии выращивали на минеральной среде 1 следующего состава (г/л): $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ - 7.24;

KH_2PO_4 — 3.54; NH_4NO_3 — 0.6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.4; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0.1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.001. В среду дополнительно вносили пантотенат кальция — 0,0003% и дрожжевой автолизат 0.5 об. %. В качестве источника углерода и энергии использовали этанол - 1 об. %.

Для установления закономерностей образования ацилированных ЭПС осуществляли выращивание бактерий на средах с различным содержанием и соотношением одновалентных катионов K^+ и Na^+ , а также анионов Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} (табл. 1). Следует отметить, что возможности варьирования состава среды, применяемой для культивирования *Acinetobacter* sp., ограничены из-за необходимости использования в среде достаточно емкого буфера с нейтральным значением pH.

Среда 1 является исходной (основной) для культивирования бактерий. Модифицированные

Таблица 1. Варианты сред для культивирования *Acinetobacter* sp.

№ среды	Концентрация, М			Концентрация, мМ	
	K^+	Na^+	PO_4^{3-}	Cl^-	SO_4^{2-}
1*	0.025	0.040	0.100	1.36	1.63
2	0.050	0.040	0.100	26.3	1.63
3	0.050	0.040	0.100	1.36	14.3
4	0.100	0.040	0.100	76.4	1.63
5	0.050	0.022	0.050	1.36	1.63
6	0.050	0.040	0.050	19.3	1.63
7	0.000	0.090	0.100	15.9	1.63
8	0.050	0.040	0.010	76.4	1.63

Примечание. 1) * - исходная среда; 2) компоненты, одинаковые для всех вариантов сред (г/л): NH_4NO_3 — 0.6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.4; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0.1; $FeSO_4 \cdot H_2O$ — 0.001.

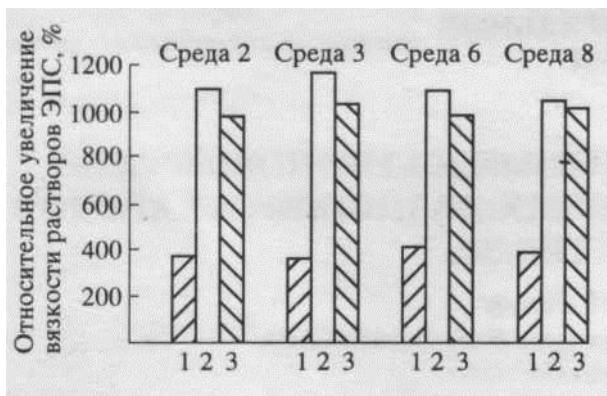


Рис. 1. Относительное увеличение вязкости 0.03% (по углеводам) растворов экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием анионов, в присутствии 0.1 М KCl (1), в H⁺-форме (2), в системе Cu²⁺ - глицин (3). Содержание K⁺ во всех средах составляет 0.050 М. Содержание анионов в средах 2, 3, 6, 8 представлено в табл. 1 ("Материалы и методы").

среды 2-8 составлены на основе среды 1. При этом содержание некоторых минеральных компонентов (NH₄NO₃, MgSO₄ · 7H₂O, CaCl₂ · 2H₂O, FeSO₄ · 7H₂O), а также пантотената кальция, дрожжевого автолизата и этанола было одинаковым для всех используемых сред.

Среды 2, 3 и 4 отличаются от среды 1 содержанием K⁺ (0.050 М в средах 2 и 3, 0.100 в среде 4 против 0.025 М в среде 1). Между собой среды 2 и 3 различаются тем, что для достижения концентрации K⁺, равной 0.050 М, в среду 2 дополнительно вносили KCl (1.86 г/л), а в среду 3 - K₂SO₄ (2.18 г/л). Для достижения концентрации K⁺, равной 0.100 М, в среду 4 вносили KCl - 5.58 г/л.

Среды 5 и 6 отличаются от основной среды 1 составом буфера, необходимого для создания и поддержания нейтрального значения pH. В среде 1 для этой цели используются фосфорные соли KH₂PO₄ (3.54 г/л) и Na₂HPO₄ · 12H₂O (7.24 г/л), в средах 5 и 6 - KH₂PO₄ (6.8 г/л) и NaOH (0.896 г/л). Кроме того, среды 5 и 6 содержат одинаковое количество K⁺ (0.050 М), но отличаются между собой соотношением K⁺ и Na⁺. Соотношение этих катионов в среде 6 аналогично среде 2.3 и 8 (табл. 1). Для достижения необходимого соотношения катионов калия и натрия в среду 6 дополнительно вносили NaCl (1.05 г/л).

В среде 7 буфер состоит из натриевых фосфорных солей NaH₂PO₄ · 2H₂O и Na₂HPO₄ · 12H₂O

в эквимольных по PO₄³⁻ среде 1 концентрациях. Содержание NaH₂PO₄ · 2H₂O и Na₂HPO₄ · 12H₂O в среде 7 составляет соответственно 4.1 и 7.24 г/л. В составе среды 7 отсутствуют калиевые соли; концентрация катионов натрия составляет 0.090 М, что соответствует суммарной концентрации катионов калия и натрия в средах 2,3, 6 и 8 (табл. 1).

Для достижения необходимой концентрации катионов натрия в среду 7 дополнительно вносили NaCl (1.4 г/л).

Среды 2, 6 и 8 характеризуются одинаковой концентрацией катионов калия (0.050 М) и натрия (0.040 М), однако отличаются между собой содержанием фосфатов (0.100; 0.050 и 0.010 М соответственно). Среда 8 содержит фосфорные соли KH₂PO₄ (0.8 г/л) и K₂HPO₄ (0.8 г/л). Для достижения необходимых концентраций катионов калия и натрия в среду 8 дополнительно вносили KCl (2.6 г/л) и NaCl (2.34 г/л).

Выделение и очистку ЭПС, разделение их на ацилированный и неацилированный компоненты, определение химического состава проводили, как описано ранее [2, 3].

Свойства растворов ЭПС, полученных при культивировании бактерий на средах различного состава, оценивали по изменению вязкости растворов ЭПС в присутствии катионов, в области низких значений pH (при переводе в H⁺-форму), в системе Si²⁺-глицин, как описано Пирог с соавт. [4].

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

Для исследования влияния одновалентных катионов и анионов на образование ацилированных полисахаридов *Acinetobacter* sp. осуществляли культивирование бактерий на средах с различным содержанием K⁺ и Na⁺, а также Cl⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻ (табл. 1).

Сравнение состава и свойств ЭПС, синтезируемых на средах 2 и 3, позволит определить, влияют ли анионы Cl⁻ и SO₄²⁻ на образование ацилированных полисахаридов. Оценка свойств ЭПС, полученных на средах 2, 6 и 8, позволит определить влияние фосфатов на синтез АП.

Анализ ЭПС, полученных при выращивании *Acinetobacter* sp. на средах 2-7, позволит оценить влияние соотношения катионов калия и натрия на синтез ацилированных полисахаридов. Исследование ЭПС, синтезируемых бактериями на среде 7, даст возможность определить роль K⁺ в образовании АП.

На рис. 1 представлены свойства растворов ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах 2 и 3, различающихся по содержанию анионов Cl⁻ и SO₄²⁻. Исследуемые ЭПС характеризуются практически одинаковым поведением их растворов

в присутствии катионов, в H^+ -форме и в системе Cu^{2+} -глицин. Это позволяет утверждать, что образование АП не зависит от концентрации Cl^- и SO_4^{2-} в среде.

Изучение свойств растворов ЭПС, полученных при выращивании бактерий на средах с различным содержанием фосфатов (среды 2, 6 и 8), показало, что растворы исследуемых ЭПС обладают одинаковыми свойствами (рис. 1). Таким образом, содержание PO_4^{3-} в среде не влияет на образование АП.

Приведенные результаты позволяют утверждать, что ацилирование ЭПС *Acinetobacter* sp. не зависит от содержания в среде культивирования анионов Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} . Следовательно, образование ацилированных полисахаридов связано с содержанием одновалентных катионов в среде культивирования.

В табл. 2 приведены данные по содержанию жирных кислот в составе ацилированных полисахаридов, синтезируемых бактериями на средах с различным содержанием и соотношением катионов калия и натрия. При культивировании *Acinetobacter* sp. на средах с одинаковой концентрацией K^+ , равной 0.050 М (среды 2, 5, 6), синтезируются ЭПС с различным содержанием жирных кислот в ацилированном полисахариде, т.е. с различной степенью ацилирования АП. При этом отмечается корреляция между соотношением K^+ и Na^+ в среде и степенью ацилирования АП. Следовательно, можно было бы утверждать, что ацилирование ЭПС определяется соотношением катионов калия и натрия в среде культивирования продуцента. Однако при выращивании бактерий на бескалевой среде (среда 7) синтезируется высокоацилированный полисахарид. Таким образом, образование АП не зависит от соотношения K^+ и Na^+ . Кроме того, наличие K^+ в среде не является необходимым для образования АП.

Приведенные выше результаты можно объяснить следующим образом: образование ацилированных полисахаридов *Acinetobacter* sp. зависит от определенной концентрации в ростовой среде одновалентных катионов (суммарной концентрации K^+ и Na^+ , или концентрации только Na^+ , или только K^+). В частности, при выращивании бактерий на средах 2, 6, 7, содержащих 0.090 М одновалентные катионы (в средах 2 и 6 это суммарная концентрация K^+ и Na^+ , в среде 7 - концентрация только Na^+) синтезируются ЭПС с высокой степенью ацилирования - 12.4-16% (табл. 2).

Для объяснения участия одновалентных катионов в синтезе АП мы можем предложить следующие гипотезы:

- влияние катионов на активность ферментов, осуществляющих этерификацию углеводной це-

Таблица 2. Влияние содержания одновалентных катионов в среде культивирования *Acinetobacter* sp. на образование ацилированных полисахаридов

Варианты среды*	Содержание в среде, М		Содержание жирных кислот в ацилированных полисахаридах, %
	K^+	Na^+	
1	0.025	0.040	4.0
2	0.050	0.040	12.4
4	0.100	0.040	5.3
5	0.050	0.022	4.2
6	0.050	0.040	14.0
7	0	0.090	16.0

* Варианты среды, соответствующие представленным в табл. 1 ("Материалы и методы").

пи ЭПС. Катионы могут входить в состав активных центров ферментов (при этом K^+ и Na^+ могут быть взаимозаменяемыми), либо участвовать в создании определенной ионной силы, необходимой для достижения оптимальной активности фермента и др.;

- если фермент, ответственный за присоединения жирно-кислотных остатков к углеводной цепи ЭПС, находится снаружи цитоплазматической мембраны, то одновалентные катионы могут участвовать в процессах экскреции жирных кислот через цитоплазматическую мембрану.

Следует отметить, что концентрация одновалентных катионов в среде меняется в течение процесса периодического культивирования бактерий. Незначительное их количество (по сравнению с начальным содержанием в среде) используется при синтезе биомассы; основное же количество расходуется для структурирования синтезированных ЭПС [5]. Процесс структурирования растворов ЭПС катионами зависит от концентрации катионов и ЭПС [5], при структурировании ЭПС одновалентные катионы связываются с молекулами ЭПС и, следовательно, не могут участвовать в процессах ацилирования полисахаридов. Ацилирование синтезируемых ЭПС происходит, очевидно, при участии так называемых "свободных" катионов, не задействованных в синтезе биомассы и структурировании растворов синтезируемых ЭПС.

На следующем этапе исследований мы предприняли попытку определить количество свободных одновалентных катионов в среде, необходимое для образования высокоацилированных ЭПС *Acinetobacter* sp.

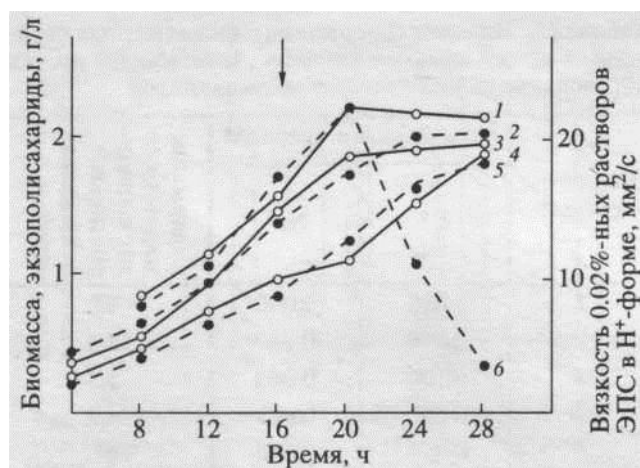


Рис. 2. Накопление биомассы (2, 3), экзополисахаридов (4, 5), изменение вязкости 0.02% (по углеводам) растворов ЭПС в H⁺-форме (1, 6) в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. 2, 4, 6 - без внесения KCl; ↓ - внесение KCl.

Для этого было необходимо:

- определить количество K⁺ и Na⁺ в культуральной жидкости, отобранной в процессе периодического культивирования бактерий;
- отделить клетки и определить содержание одновалентных катионов в биомассе;
- из неотдиализованной культуральной жидкости (после отделения клеток) выделить структурированный ЭПС и установить содержание одновалентных катионов в полисахаридах.

Зная суммарное количество катионов K⁺ и Na⁺ в культуральной жидкости до отделения клеток и выделения ЭПС, а также содержание их в биомассе и ЭПС, можно определить концентрацию свободных одновалентных катионов, участвующих в ацилировании ЭПС. Параллельно предполагалось проводить выделение АП из данной пробы культуральной жидкости и определять в АП содержание жирных кислот.

Однако оказалось, что при осаждении ЭПС из культуральной жидкости органическими растворителями (например, спиртами) большая часть одновалентных катионов из ЭПС переходит в водно-спиртовую смесь. Очевидно, наблюдаемое явление обусловлено тем, что при структурировании растворов ЭПС *Acinetobacter* sp. катионами происходит непрочное связывание их с молекулами полисахарида.

В связи с этим выделение структурированного ЭПС проводили следующим образом: осуществляли центрифугирование культуральной жидкости в условиях, позволяющих осадить и клетки, и ЭПС (90 000 g, 4 ч). Предполагали, что при этом свободные катионы будут содержаться в надосадочной жидкости. Однако при центрифугировании также наблюдали высвобождение катионов

из ЭПС и переход их в надосадочную жидкость. Вероятно, это связано с разрушением структуры растворов ЭПС в жестких условиях центрифугирования.

Таким образом, нам не удалось установить концентрацию свободных одновалентных катионов в ростовой среде, необходимую для образования высокоацилированных ЭПС *Acinetobacter* sp.

На основании экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что для синтеза АП с высокой степенью ацилирования начальная концентрация одновалентных катионов в среде культивирования бактерий должна быть не менее 0.090 М (табл. 2).

Для доказательства того, что образование ацилированных полисахаридов *Acinetobacter* sp. определяется содержанием одновалентных катионов в среде и не зависит от соотношения K⁺ и Na⁺, провели следующий опыт: осуществляли выращивание бактерий на среде 1, содержащей 0.025 М K⁺ и 0.040 М Na⁺, т.е. в условиях, при которых в стационарной фазе роста синтезируется НАП [1]. При этом вязкость растворов в H⁺-форме таких ЭПС снижается (рис. 2). В конце логарифмической фазы роста продуцента в среду вносили KCl до концентрации 0.050 М. После внесения KCl вязкость растворов ЭПС в H⁺-форме не снижалась еще на протяжении 8 ч культивирования. Таким образом, при дополнительном внесении в среду K⁺ не наблюдали "остановки" синтеза ацилированного полисахарида. Аналогичные результаты были получены при замене KCl и NaCl.

Приведенные результаты показывают, что образование ацилированных ЭПС *Acinetobacter* sp. не связано с содержанием в ростовой среде анионов (Cl⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻); синтез АП определяется концентрацией одновалентных катионов (K⁺ и Na⁺) в среде культивирования и не зависит от соотношения катионов калия и натрия.

В заключение следует отметить, что поскольку в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. в среде может наблюдаться изменение содержания одновалентных катионов, участвующих в ацилировании ЭПС, можно предположить, что в течение процесса будет меняться не только количество синтезируемых ацилированных полисахаридов (т.е. соотношение АП и НАП в составе ЭПС, как было установлено ранее [1, 3]), но и степень ацилирования АП, т.е. содержание жирных кислот в ацилированном полисахаридах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Пинчук Г.Э., Букло-ва В.Н., Малашенко Ю.Р. 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., Пинчук Г.Э., Сенченко-ва С.Н., Малащенко Ю.Р. Разделение экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp., на ацилированный и неацилированный компоненты // Микробиология. 1994. Т. 63. Вып. 5. С. 840-846.
3. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Буклова В.Н., Воцел-ко С.К., Малащенко Ю.Р. Образование экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+ // Микробиология. 1995. Т. 64. № 1. С. 51-54.
4. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Сенченкова С.Н., Малащенко Ю.Р. Химический состав экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+ // Микробиология. 1996. Т. 65. №4.
5. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C_1 - C_2 -соединениях. Киев: Наук, думка, 1992. 212 с.

Рецензент Л.О. Северина

Effect of Monovalent Cations on the Production of Acylated Exopolysaccharides by *Acinetobacter* sp.

T. P. Pirog

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

Abstract—Production of acylated polysaccharides by *Acinetobacter* sp. depends on the concentration of monovalent cations (K^+ and Na^+) in the growth medium and does not depend on their ratio or the content of such anions as Cl^- , SO_4^{2-} , and PO_4^{3-} .