

Пирог, Т.П. Особенности синтеза экзополисахарида этаполана на смеси энергетически дефицитных ростовых субстратов / Т. П. Пирог, Н. В. Высятецкая, Ю. В. Корж // Микробиология. – 2007. – Т.76, № 1. – С. 32–38.

УДК 579.841: 577.114

**ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА
ЭТАПОЛАНА НА СМЕСИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИ ДЕФИЦИТНЫХ
РОСТОВЫХ СУБСТРАТОВ**

Пирог Т.П., Высятецкая Н.В., Корж Ю.В.

*Институт микробиологии и вирусологии Национальной академии наук
Украины, Киев*

Показана возможность интенсификации синтеза микробного экзополисахарида этаполана (продуцент - *Acinetobacter* sp. В-7005) на смеси энергетически дефицитных ростовых субстратов (ацетат+глюкоза). При росте бактерий на смешанном субстрате оба субстрата потребляются одновременно, причем ацетат поглощается путем активного транспорта с использованием энергии протондвижущей силы. При наличии ацетата натрия в смешанном субстрате активность ацетил-КоА-синтетазы и ключевого фермента глюконеогенеза фосфоенолпируватсинтетазы были более, чем в 10 раз, а показатели синтеза этаполана почти в 2 раза выше по сравнению с ацетатом калия. Эти результаты могут свидетельствовать об участии Na^+ в создании ионных градиентов на мембране, необходимых для генерации энергии протондвижущей силы. Одновременное функционирование глиоксилатного цикла и пируваткарбоксилазной реакции, повышение активности изоцитратлиазы, малатсинтазы и фосфоенолпируватсинтетазы свидетельствуют об усилении глюконеогенеза и изменении направленности процессов биосинтеза на смеси ацетата и глюкозы в сторону образования углеводов по сравнению с выращиванием *Acinetobacter* sp. В-7005 на соответствующих моносубстратах.

Ключевые слова: энергетически дефицитный субстрат, интенсификация биосинтеза, экзополисахариды, глюконеогенез, активный транспорт.

Ранее нами была показана возможность интенсификации синтеза микробного экзополисахарида (ЭПС) этаполана на смеси энергетически неравноценных ростовых субстратов [1–3]. Комбинация “вспомогательного” энергетически избыточного (этанол) и энергетически дефицитного (глюкоза) субстратов дала возможность избежать непродуктивных потерь углерода и энергии, имеющих место при использовании моносубстратов, и повысить эффективность трансформации углерода субстратов в ЭПС.

Из литературы известно, что эффект “вспомогательного” субстрата может наблюдаться не только при росте микроорганизмов на смеси энергетически неравноценных субстратов, но и в случае использования двух энергетически дефицитных субстратов при условии их одновременной ассимиляции [4–6]. Так, например, при одновременной утилизации метанола и глицерина дрожжами *Pichia pinus* продолжительность lag-фазы сокращается, а скорость роста и концентрация биомассы повышается по сравнению с выращиванием дрожжей на моносубстрате – метаноле [4].

В связи с этим цель данной работы – исследование синтеза микробного полисахарида этаполана при культивировании продуцента на смеси энергетически дефицитных ростовых субстратов (ацетат+глюкоза).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Основным объектом исследований являлся ЭПС-синтезирующий штамм бактерий *Acinetobacter* sp. 12S [7], который депонирован в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины под номером В-7005.

Культивирование продуцента этаполана. Культивирование осуществляли в колбах на качалке (220 об/мин) при 30 °С, рН 6,8...7,8 в течение 16...96 ч на жидкой минеральной среде следующего состава, г/л: KH_2PO_4 – 3,4;

KOH – 0,9; NH₄Cl – 0,4; MgSO₄ × 7H₂O – 0,4; CaCl₂ × 2H₂O – 0,1; FeSO₄ × 7H₂O – 0,001. В среду дополнительно вносили 0,5 % по объему) дрожжевого автолизата и 0,0009 % пантотената кальция (витамин B₅). Штамм *Acinetobacter* sp. B-7005 является ауксотрофом по этому витамину. В одном из вариантов концентрацию катионов магния и калия в среде культивирования бактерий повышали до 5...10 и 100 мМ соответственно. K⁺ и Mg²⁺ вносили в среду в виде 20 %-ного раствора KCl и 10 %-ного раствора MgSO₄ × 7H₂O соответственно.

В качестве источника углерода и энергии использовали смесь этанола и глюкозы в соотношении 1:1 (0,75 % по объему : 0,75 мас. %, соответственно), а также смесь ацетата натрия (1,1 мас. %) и глюкозы (0,75 мас. %), ацетата калия (1,3 мас. %) и глюкозы (0,75 мас. %). Концентрации ацетата натрия и ацетата калия были эквимольными по углероду концентрации этанола (0,75 % по объему).

В качестве посевного материала использовали культуру из экспоненциальной фазы роста (18...24 ч), выращенную на среде с такими источниками углерода и энергии: этанол 0,5 % (по объему), глюкоза (0,5 мас. %), ацетат натрия (0,7 мас. %) или ацетат калия (0,8 мас. %).

Концентрацию биомассы и эффективность трансформации углерода субстратов в ЭПС (количество синтезированных ЭПС, выход ЭПС от субстрата, ЭПС-синтезирующая способность) определяли как описано в работе [1]. Концентрацию глюкозы в культуральной жидкости анализировали глюкозооксидазным методом [8], концентрацию ацетата – энзиматическим методом с использованием ацетаткиназы [9].

Получение бесклеточных экстрактов. Культуральную жидкость с клетками (экспоненциальная фаза роста *Acinetobacter* sp. B-7005) обрабатывали УЗ (22 кГц) в течение 60 с, после чего центрифугировали (5000g, 10 мин, 4 °С). Осадок клеток трижды отмывали от остатков среды и ЭПС 0.05 М трис-НСl буфером (рН 7,0). Такая УЗ-обработка культуры приводила к расщеплению высокомолекулярных ЭПС на низкомолекулярные фрагменты. При этом

существенно снижалась вязкость культуральной жидкости, что позволило отделить клетки от фрагментов ЭПС при центрифугировании. Отмытые клетки ресуспендировали в 0.05 М трис-HCl буфере (pH 7,0) и разрушали УЗ (22 кГц) 4 раза по 50 с при 4 °С на аппарате УЗДН-1 (Россия). Гомогенат центрифугировали (12000 g, 30 мин, 4 °С), осадок отбрасывали, а супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Энзиматические анализы. Активность ацетил-КоА-синтетазы (6.2.1.1), изоцитратлиазы (4.1.3.1), малатсинтазы (4.1.3.2), изоцитратдегидрогеназы (1.1.1.42), 2-оксоглутаратдегидрогеназы (1.2.4.2), пируватдегидрогеназы (1.2.2.2), пируваткарбоксилазы (6.4.1.1), фосфоенолпируватсинтетазы (ФЕП-синтетазы) (2.7.9.2) определяли как описано в работе [3].

Определение скорости окисления ацетата интактными клетками *Acinetobacter* sp. В-7005. Скорость окисления ацетата интактными клетками бактерий (скорость дыхания в присутствии ацетата) определяли по скорости поглощения кислорода в реакционной смеси полярографическим методом как описано в работе [3]. Протонофор карбонилцианид-*n*-трифторметокси-фенилгидразон (FCCP) вносили в кювету в виде раствора в изопропанол до конечной концентрации 5 мкМ. Для определения скорости дыхания штамм *Acinetobacter* sp. В-7005 культивировали в течение 16-18 ч (экспоненциальная фаза роста) на среде с ацетатом натрия (0,7 %), а также ацетатом натрия (1,1 %) и глюкозой (0,75 %).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущих исследованиях [1–3] повышение синтеза этаполана на смеси этанола и глюкозы наблюдали при культивировании продуцента на среде с высокой молярностью буфера (0,05 М) и концентрацией солей (до 11 г/л). При снижении молярности буфера в результате уменьшения содержания фосфорных солей в среде имело место лимитирование С₂-метаболизма, обусловленное накоплением ацетата, что сопровождалось снижением синтеза ЭПС [10]. Исследование регуляции метаболизма ацетата при росте бактерий на

смеси этанола и глюкозы позволило реализовать синтез этаполана на среде, в которой молярность буфера (но не концентрация солей) была снижена в 2 раза [10].

В данной работе культивирование продуцента осуществляли на среде с молярностью буфера 0,025 М и общим содержанием солей 5 г/л. В качестве источника азота мы использовали NH_4Cl в эквимолярной по азоту концентрации нитрата натрия, который являлся компонентом среды, применяемой нами ранее [1–3, 10]. Такая замена источника азотного питания была обусловлена тем, что в процессе культивирования бактерий на смеси ацетата и глюкозы потребление ацетата сопровождается повышением рН культуральной жидкости до 9,5...10,0 (ацетат транспортируется в клетки путем симпорта с протоном [11]), а оптимум рН для синтеза этаполана составляет 6,8...8,0. Поскольку в процессе ассимиляции аммонийного азота происходит подкисление культуральной жидкости, то при наличии в среде ацетата и хлорида аммония можно избежать чрезмерного его подщелачивания и поддерживать рН на уровне, необходимом для синтеза этаполана.

Литературные данные свидетельствуют, что при выращивании микроорганизмов на смеси энергетически дефицитных субстратов наблюдается интенсификация их роста, если оба субстрата ассимилируются одновременно, например, метанол и маннит, метанол и глюкоза, оксалат и формиат, ацетат и формиат, метанол и формиат, метан и CO_2 , метанол и CO_2 [5]. В то же время на смеси ацетата и глюкозы может наблюдаться как одновременное, так и последовательное потребление субстратов микроорганизмами [6, 12, 13]. Так, при культивировании *Azotobacter vinelandii* на смеси ацетата и глюкозы вначале ассимилируется ацетат, и только после полного его потребления утилизируется глюкоза [13]. В зависимости от условий выращивания дрожжей *Zygosaccharomyces bailii* на смеси ацетата и глюкозы эти субстраты могут потребляться либо последовательно, либо одновременно [12]. Следует отметить, что только при условии одновременного использования ацетата и глюкозы имеет место интенсификация синтеза биомассы, как это установлено

для *Corynebacterium glutamicum* [6]. Ускорение роста бактерий в этом случае обусловлено тем, что ацетат используется для генерации энергии, а глюкоза – для конструктивного метаболизма.

Наши эксперименты показали, что при выращивании *Acinetobacter* sp. В-7005 на смеси ацетата калия (ацетата натрия) и глюкозы эти субстраты ассимилируются одновременно, однако скорость их потребления несколько ниже, чем при росте на соответствующих моносубстратах. Аналогичное явление было установлено нами ранее при культивировании *Acinetobacter* sp. В-7005 на смеси энергетически неравноценных субстратов (этанол+глюкоза) [1]. Несмотря на одновременную ассимиляцию ацетата калия и глюкозы при выращивании продуцента этаполана на смеси этих субстратов показатели синтеза ЭПС не повышались по сравнению с культивированием бактерий на моносубстратах (табл. 1). Причем увеличения синтеза ЭПС не наблюдали независимо от способа подготовки посевного материала (инокулят, выращенный на этаноле или ацетате) и повышения в среде культивирования концентрации катионов магния (активатора ацетил-КоА-синтетазы – фермента, при участии ацетат вовлекается в метаболизм у *Acinetobacter* sp. В-7005 [14]). Следует отметить, что в предыдущих наших исследованиях было установлено положительное влияние катионов магния и инокулята, выращенного на ацетате, на синтез этаполана на смеси этанола и глюкозы [10].

Оказалось неожиданным, что при замене ацетата калия в смешанном субстрате на эквимольную по углероду концентрацию ацетата натрия наблюдали существенное повышение показателей синтеза ЭПС (табл. 2). В этом случае количество синтезированных ЭПС было выше не только по сравнению с выращиванием бактерий на моносубстратах, смеси ацетата калия и глюкозы, но и на смеси этанола и глюкозы. Причем при использовании посевного материала, выращенного на ацетате натрия, повышении в среде культивирования концентрации активаторов ацетил-КоА-синтетазы (Mg^{2+} и K^{+}) [14] показатели синтеза этаполана на смеси ацетата натрия и глюкозы существенно повышались (табл. 2).

Данные ростовых экспериментов были подтверждены энзимологическими исследованиями (табл. 3). Из данных, представленных в табл. 3, видно, что активность ацетил-КоА-синтетазы и ключевого фермента глюконеогенеза ФЕП-синтетазы при выращивании *Acinetobacter* sp. В-7005 на смеси ацетата калия и глюкозы были в 10 раз ниже, чем на смеси ацетата натрия и глюкозы. Причем такая закономерность наблюдалась независимо от природы источника углерода в среде при получении посевного материала (глюкоза, ацетат, этанол). Наиболее высокая активность обоих ферментов была выявлена в случае использования инокулята, выращенного на ацетате натрия.

Предыдущие исследования [14] показали, что катионы натрия являются ингибиторами активности ацетил-КоА-синтетазы при культивировании *Acinetobacter* sp. В-7005 на этаноле. Однако в данной работе установлено положительное влияние Na^+ на синтез этаполана при выращивании продуцента на смеси ацетата и глюкозы (табл. 2 и 3). В связи с этим мы предположили, что на смеси ацетата и глюкозы катионы натрия могут принимать участие в транспорте C_2 -субстрата в клетки *Acinetobacter* sp. В-7005. Последующие эксперименты показали, что у продуцента этаполана ацетат поглощается путем активного транспорта с использованием энергии протондвижущей силы, как это установлено для многих бактерий [11]. В пользу такого предположения свидетельствовали данные определения скорости окисления ацетата интактными клетками в присутствии протонофора FCCP (табл. 4).

Под действием протонофоров происходит диссипация протондвижущей силы: эти соединения рассеивают как трансмембранный протонный градиент, так и градиент электрического заряда за счет возникновения в их присутствии проницаемости цитоплазматической мембраны относительно протонов. Поскольку действие протонофоров связано с их свойствами как слабых кислот, эти соединения неэффективны при pH выше 8,5 [11]. Как видно из представленных в табл. 4 данных, FCCP не является ингибитором окисления ацетата, так как при pH 8...9 (в условиях, при которых FCCP депротонируется и не действует как протонофор) угнетения окисления ацетата не наблюдали. Эти

результаты свидетельствуют о том, что поглощение ацетата у *Acinetobacter* sp. B-7005 происходит путем активного транспорта с использованием энергии, генерируемой протондвижущей силой. Так как для генерации протондвижущей силы необходимо наличие ионных градиентов на мембране, можно предположить, что катионы натрия принимают участие в создании таких градиентов у *Acinetobacter* sp. B-7005.

Данные определения активности некоторых ключевых ферментов метаболизма ацетата и глюкозы при культивировании *Acinetobacter* sp. B-7005 на моно- и смешанном субстратах (табл. 5) подтверждают полученные нами ранее результаты о том, что независимо от природы источника углеродного питания клетки штамма характеризуются высокой активностью ферментов C₂-C₆-метаболизма [1, 3, 15]. Обращает на себя внимание существенное повышение активности ферментов глиоксилатного цикла (в 2 раза – малатсинтазы и 10 раз – изоцитратлиазы) и снижение в 1,2-1,4 раза активности пируваткарбоксилазы при выращивании продуцента этаполана на смеси ацетата и глюкозы по сравнению с культивированием на соответствующих моносубстратах, а также некоторое снижение активности изоцитратдегидрогеназы и 2-оксоглутаратдегидрогеназы на смешанном субстрате по сравнению с культивированием на ацетате. Ранее [3] нами было установлено, что на смеси этанола и глюкозы активность изоцитратлиазы и малатсинтазы была в 3-6 раз ниже, а активность ферментов цикла трикарбоновых кислот - в 2-3 раза выше, чем на этаноле. При этом на смеси этанола и глюкозы наблюдали незначительное увеличение (по сравнению с моносубстратами) активности пируваткарбоксилазы [3]. Таким образом, роль глиоксилатного цикла (в отличие от цикла трикарбоновых кислот) в метаболизме *Acinetobacter* sp. B-7005 на смеси ацетата и глюкозы является более существенной, чем на смеси этанола и глюкозы. Следует отметить, что при культивировании продуцента этаполана на смеси ацетата и глюкозы активность пируваткарбоксилазы, хотя и снижалась по сравнению с выращиванием на моносубстратах, тем не менее оставалась достаточно

высокой - 3314,8 нмоль/(мин мг белка) (табл. 5). Таким образом, повышение активности изоцитратлиазы и малатсинтазы, а также одновременное функционирование двух анаплеротических путей (глиоксилатного цикла и пируваткарбоксилазной реакции) могут свидетельствовать об усилении глюконеогенеза при культивировании *Acinetobacter* sp. В-7005 на смеси ацетата и глюкозы. Действительно, активность ФЕП-синтазы – ключевого фермента глюконеогенеза – при выращивании продуцента этаполана на смешанном субстрате была почти в 2 раза выше, чем на ацетате (табл. 5). Полученные результаты свидетельствуют об изменении направленности процессов биосинтеза у *Acinetobacter* sp. В-7005 на смешанном субстрате в сторону образования углеводов по сравнению с выращиванием на соответствующих моносубстратах.

Приведенные в данной работе результаты изучения особенностей C₂-C₆-метаболизма при росте *Acinetobacter* sp. В-7005 на смеси ацетата и глюкозы отличаются от установленных для *Corynebacterium glutamicum* [6]. Так, при культивировании этих бактерий на смеси ацетата и глюкозы ацетил-КоА образовывался преимущественно из ацетата, и только незначительная его часть – в пируватдегидрогеназной реакции; глюкоза расходовалась в основном для генерации предшественников биосинтеза клеточного материала [6]. При росте *Corynebacterium glutamicum* на смешанном субстрате анаплеротической последовательностью реакций, восполняющих пул C₄-дикарбоновых кислот, являлся глиоксилатный цикл, а ФЕП-карбоксилазная и пируваткарбоксилазная реакции не функционировали.

Интересно отметить, что активность ФЕП-карбоксилазы и пируваткарбоксилазы – анаплеротических ферментов, обеспечивающих синтез оксалоацетата при росте на углеводах, была выявлена не только при культивировании *Corynebacterium glutamicum* на глюкозе, но и на ацетате, несмотря на функционирование реакций глиоксилатного цикла [6]. Наши предыдущие исследования [3, 16] и результаты данной работы также показали, что при росте *Acinetobacter* sp. В-7005 на этаноле и ацетате наблюдается

высокая активность как ферментов глиоксилатного цикла, так и пируваткарбоксилазы. Следует отметить, что на сегодняшний день в литературе имеются лишь немногочисленные сведения о способности этого фермента осуществлять декарбоксилирование оксалоацетата [17, 18]. Вполне вероятно, что при росте *Acinetobacter* sp. В-7005 и *Corynebacterium glutamicum* на С₂-субстратах пируваткарбоксилаза может принимать участие в образовании пирувата (наряду с оксалоацетатдекарбоксилазной реакцией).

Таким образом, в результате проведенной работы впервые показана возможность повышения синтеза микробного полисахарида этаполана при выращивании продуцента на смеси энергетически дефицитных субстратов (ацетат натрия + глюкоза), которые потребляются одновременно. Более высокие показатели синтеза этаполана на смеси ацетата натрия и глюкозы (по сравнению с ацетатом калия и глюкозой) могут быть обусловлены участием катионов натрия в создании ионных градиентов на мембране, необходимых для генерации энергии протондвижущей силы, которая используется для активного транспорта ацетата в клетки *Acinetobacter* sp. В-7005. Повышение синтеза ЭПС на смеси ацетата и глюкозы обусловлено усилением глюконеогенеза, о чем свидетельствовало одновременное функционирование пируваткарбоксилазной реакции и глиоксилатного цикла, увеличение активности изоцитратлиазы, малатсинтазы и ФЕП-синтетазы по сравнению с выращиванием продуцента на моносубстратах

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В., Криштаб Т.П. Интенсификация синтеза экзополисахарида этаполана на смеси ростовых субстратов // Микробиология. 2003. 72, № 1. С. 26–32.
2. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на смеси этанола и глюкозы // Микробиология. 2003. Т.72, № 3. С.348–355.
3. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В., Коваленко М.О. Метаболизм C₂-C₆-субстратов в условиях миксотрофного роста штаммов *Acinetobacter* sp. В-7005 и В-7005 (1НГ) // Украинский биохимический журнал. 2004. 76, №1. С. 33-38.
4. Тэугас Х.Х. Совместное использование мэтанола и глицерина у мэтанолаcваивающих дрожжей *Pichia pinus* // Матер. конф. "Физиология, генетика и биохимия метилотрофных микроорганизмов". – К.: СОПС УССР АН УССР. 1986. С. 55–58.
5. Babel W., Müller R.H. Mixed substrate utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics // J. Gen. Microbiol. 1985. 131, № 1P. 39–45.
6. Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose / V.F. Wendish, A.A. de Graaf, H. Sahm, B.J. Eikmanns // J. Bacteriol. 2000. 182, № 11. P. 3088–3096.
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.
8. Лукомская И.С., Городецкий В.К. Применение микроцида (глюкозооксидазы) для определения глюкозы крови в норме и при диабете // Биохимия. 1961. 26, № 3. С. 477-482.

9. Криштаб Т.П., Соколов И.Г. Энзиматический метод количественного определения уксусной кислоты в культуральной жидкости // Микробиол. журнал. 1985. 47, N 1. С. 86-88.

10. Пирог Т.П., Лащук Н.В., Корж Ю.В. Регуляция C_2 -метаболизма в условиях миксотрофного роста *Acinetobacter* sp. В-7005 на смеси этанола и глюкозы. Микробиологический журнал. 2006. Т. 68. № 1. С.

11. Ивановский Р.Н. Биоэнергетика и транспорт субстратов у бактерий. – М.: МАКСПресс, 2001. 46 с.

12. *Mechanisms* underlying the transport and intracellular metabolism of acetic acid in the presence of glucose in the yeast *Zygosaccharomyces bailii* / M.J. Sousa, F. Rodrigues, M. Corte-Real, C. Leao // *Microbiology* . 1998. 144. P. 665–670.

13. Tauchert K., Jahn A., Oelze J. Control of diauxic growth of *Azotobacter vinelandii* on acetate and glucose // *J. Bacteriol.* 1990. 172, № 11. P. 6447–6451.

14. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Регуляция метаболизма ацетата у штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т.39, № 2. С. 180–188.

15. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Образование экзополисахаридов на углеводных субстратах штаммом *Acinetobacter* sp. и особенности его C_6 -метаболизма // Микробиология. 2002. 71, № 2. С. 215-221.

16. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter* sp, растущего на этаноле // Микробиология. 2003. 72, № 4. С. 459-465.

17. Scrutton M.C., Utter M.F. Pyruvate carboxylase. III. Some physical and chemical properties of the highly purified enzyme // *J. Biol. Chem.* 1965. V. 240. N 1. P. 1-9.

18. Attwood P.V., Cleland W.W. Decarboxylation of oxaloacetate by pyruvate carboxylase // *Biochemistry.* 1986. V. 25. N 25. P. 8191-8196.