

УДК 579.841:577.11.114:57.04

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ И СВОЙСТВА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ *Acinetobacter* sp.

© 1998 г. Т. П. Пирог, Т. А. Гринберг, Ю. Р. Малашенко

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, г. Киев 252627

Поступила в редакцию 17.01.96 г.

Исследовали влияние внешних факторов на образование и физико-химические свойства растворов экзополисахаридов (ЭПС) *Acinetobacter* sp., определяющие их биологическую функцию.

При изменении температуры культивирования, pH среды, концентрации растворенного кислорода (pO_2) синтезировались ЭПС, растворы которых характеризовались различной вязкостью в присутствии одновалентных катионов, в H^+ -форме и системе Cu^{2+} -глицин. Все исследуемые ЭПС способны осаждаться ионами тяжелых металлов (Cr^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} и др.). В ответ на воздействие неблагоприятных факторов внешней среды не отмечалось увеличения выхода ЭПС; при высоких значениях pO_2 (до 80% насыщения) наблюдалось увеличение максимальных удельных скоростей роста бактерий и синтеза ЭПС. Предполагается, что биологическая функция ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в оптимальных и неоптимальных условиях, будет различной.

Известно, что способность к синтезу экзополисахаридов (ЭПС) обеспечивает продуцентам преимущества по сравнению с микроорганизмами, их не образующими [1,2]. В частности, микробные ЭПС выполняют защитные функции по отношению к клеткам, которые попадают в неблагоприятные условия окружающей среды. Мы предполагаем, что не только образование ЭПС, но и способность к изменению состава и физико-химических свойств ЭПС у микроорганизмов является необходимым условием нормального функционирования клеток в различных природных условиях. Физико-химические свойства ЭПС меняются соответственно изменениям условий окружающей среды, что дает возможность ЭПС постоянно выполнять свою биологическую функцию и, таким образом, позволяет микробным популяциям обеспечить возможность существования.

При выборе внешних факторов, которые могут изменяться и оказывать влияние на свойства синтезируемых ЭПС, необходимо учитывать природную эконишу, из которой был выделен микроорганизм. Так как *Acinetobacter* sp. изолирован из сточных вод, то наиболее значимыми внешними факторами, которые могут варьировать в данной эконише и влиять на свойства синтезируемых ЭПС, являются температура, pH, концентрация растворенного кислорода, концентрация катионов, а также токсичных тяжелых металлов, нитро- и хлорорганических соединений, красителей и др.

Мы полагаем, что физико-химические свойства ЭПС *Acinetobacter* sp., такие как вязкость их растворов, увеличение вязкости в области низких значений pH, структурирование в присутствии

катионов, способность осаждаться многими двух- и трехвалентными металлами и др. [3] ответственны за выполнение биологической функции. Следует отметить, что эти свойства растворов определяют также и практическую ценность ЭПС. Таким образом, исследование свойств растворов ЭПС, синтезируемых бактериями *Acinetobacter* sp. при выращивании их в различных условиях культивирования, позволит расширить сферу возможного практического использования этих полимеров.

В связи с этим целью настоящего исследования - изучение влияния некоторых из перечисленных выше факторов внешней среды на образование и физико-химические свойства ЭПС *Acinetobacter* sp.

МЕТОДИКА

Для культивирования *Acinetobacter* sp. использовали минеральную среду Кодама [4], содержащую 1 об. % этанола в качестве источника углерода и энергии. В среду дополнительно вносили 0.0003% пантотената кальция и 0.5 об. % дрожжевого автолизата. Содержание одновалентных катионов (K^+ и Na^+) в среде составляло 0.050 и 0.040 М соответственно. Для достижения необходимой концентрации катионов калия в среду вносили KCl.

Периодическое культивирование *Acinetobacter* sp. осуществляли в колбах на качалке и ферментере АК-210, как описано ранее [5, 6].

Исследовали влияние температуры, pH, концентрации растворенного кислорода (pO_2) на образование и свойства ЭПС *Acinetobacter* sp.

Оптимальными для роста *Acinetobacter* sp. являются следующие условия культивирования:

температура – 28–30°C; pH – 6.8–7.0; pO_2 – 30–40% насыщения.

Культивирование бактерий осуществляли при температуре 24, 30, 37, 42°C; значения pH среды 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; концентрации растворенного кислорода 5–10; 30–40; 50–60 и 70–80% насыщения.

При варьировании одного из исследуемых факторов в процессе культивирования бактерий значения остальных поддерживали на оптимальном уровне.

Для достижения необходимых значений pH при культивировании *Acinetobacter* sp. осуществляли подкисление среды 6%-ной HCl или подщелачивание 6%-ным NaOH.

Концентрацию растворенного кислорода поддерживали за счет регулирования скорости перемешивания (от 100 до 700 об/мин) и расхода воздуха (от 0.2 до 3.0 л/л среды в мин).

Исследование влияния высоких значений pO_2 на рост и синтез ЭПС *Acinetobacter* sp. проводили в условиях объемно-доливого способа культивирования на ферментере АК-210. На первом этапе осуществляли периодическое культивирование бактерий в оптимальных по pO_2 условиях. При этом в качестве посевного материала использовали культуру, выращенную в колбах на качалке. По окончании процесса культивирования сливали культуральную жидкость (80–85% объема), к оставшейся в ферментере культуральной жидкости добавляли свежую среду. Культивирование бактерий на втором этапе проводили при pO_2 50–60 или 70–80% насыщения.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на абсолютно сухой вес клеток (АСВ) по калибровочному графику.

О количестве синтезированных ЭПС судили по количеству углеводов, определяемых с помощью колориметрического метода в реакции с фенолом и серной кислотой [7]. Для построения калибровочного графика в качестве стандарта использовали глюкозу.

Выход ЭПС определяли и выражали как отношение количества синтезированных ЭПС (г/л) к уровню биомассы (г/л).

Определение максимальных скоростей роста *Acinetobacter* sp. (μ_{max}) и синтеза ЭПС (Q_{max}) проводили, как описано в работе [8].

Выделение и очистку ЭПС, разделение их на ацилированный (АП) и неацилированный (НАП) компоненты проводили, как описано в работе [9].

Кинематическую вязкость растворов ЭПС измеряли на стеклянном капиллярном вискозиметре Оствальда при температуре 20°C в дистиллированной воде, в присутствии катионов (K^+ , Na^+ , NH_4^+), в области низких значений pH (при переводе в H^+ -форму), в системе Cu^{2+} -глицин.

Таблица 1. Влияние факторов внешней среды на образование биомассы и экзополисахаридов *Acinetobacter*

Факторы внешней среды	Содержание, г/л			Выход ЭПС, г/г АСВ
	биомассы	экзополисахаридов		
Температура, °С	24	1.90	1.85	0.97
	30	2.20	2.10	0.95
	37	0.96	1.00	1.04
	42	0.65	0.70	1.08
pH	5.0	1.10	1.00	0.91
	6.0	1.80	1.70	0.94
	7.0	2.20	2.10	0.95
	8.0	1.80	1.75	0.97
Концентрация растворенного кислорода, % насыщения	5–10	1.70	1.80	1.06
	30–40	2.20	2.10	0.95
	50–60	2.00	1.90	0.95
	70–80	2.00	1.90	0.95

Относительное увеличение вязкости определяли как частное от деления разности значений кинематической вязкости растворов ЭПС одинаковой концентрации в исследуемых условиях и в дистиллированной воде на значение вязкости раствора в дистиллированной воде и выражали в процентах.

Подготовку растворов ЭПС для измерения вязкости осуществляли следующим образом. Растворы ЭПС, полученные после диализа культуральной жидкости, отделения клеток и концентрирования в вакууме, разбавляли дистиллированной водой до концентрации 0.03% (по углеводам). К полученным растворам ЭПС добавляли KCl (NaCl) до концентрации 0.1 М; NH_4Cl до концентрации 0.4 М; растворы ЭПС переводили в H^+ -форму обработкой катионитом КУ–2–8 (H^+) (300 мг смолы на 15 мл раствора ЭПС). Для изучения поведения растворов ЭПС в системе Cu^{2+} -глицин к раствору ЭПС добавляли 0.003 М $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, затем 0.015 М глицина; раствор нагревали до 80°C и выдерживали при этой температуре 5 мин, после чего охлаждали до 20°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании *Acinetobacter* sp. в оптимальных условиях уровень биомассы составлял 2.20 мг/л, количество синтезированных ЭПС – 2.10 г/л (табл. 1). ЭПС, синтезируемые *Acinetobacter* sp. в таких условиях на среде с 0.090 М одновалентных катионов, содержат в своем составе 70% ацилированного полисахарида со степенью ацилирования 12.4%; их растворы характеризуются следующими свойствами: относительное увеличение вязкости 0.03% (по углеводам) растворов ЭПС в присутствии 0.1 М K^+ составляет

Таблица 2. Влияние концентрации растворенного кислорода на скорость роста и синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp.

Концентрация растворенного кислорода, % насыщения	μ_{\max} , ч ⁻¹	Q_{\max} , ч ⁻¹	Время достижения, ч	
			μ_{\max} , ч ⁻¹	Q_{\max} , ч ⁻¹
30–40	0.12	0.06	12	16
70–80	0.20	0.10	4	8

350–400%, в Н⁺-форме - 1000–1100%, в системе Cu²⁺-глицин – 900–1000% [10].

Проведенные исследования показали, что при изменении температуры, рН, рО₂ в среде культивирования *Acinetobacter* sp. не наблюдалось увеличения количества синтезируемых ЭПС; выход ЭПС во всех случаях оставался неизменным и составлял 1 г ЭПС на 1 г АСВ (табл. 1). При низких значениях рО₂ и рН, а также при повышенной температуре длительность лаг-фазы увеличивалась на 3–5 ч. Ранее было установлено, что при культивировании *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием одновалентных катионов (0.065–0.140 М) выход биомассы и ЭПС не менялся [6].

При выращивании бактерий в условиях высоких значений рО₂ (70–80% насыщения) отмечалось увеличение максимальной удельной скорости роста бактерий и синтеза ЭПС, а также смещение времени их достижения в более раннюю ростовую фазу (табл. 2). Следует отметить, что в начале процесса культивирования *Acinetobacter* sp. чувствительна к высоким концентрациям растворенного кислорода [3]. Так, при осуществлении периодического культивирования бактерий в

ферментере (с использованием инокулята из колб) в условиях рО₂ свыше 50% отмечалось ингибирование роста культуры. При реализации объемно-доливного способа культивирования подавления роста бактерий не наблюдали и при более высоких значениях рО₂ (до 80% насыщения). Вероятно, в этом случае защита клеток от токсического действия кислорода обусловлена высокой вязкостью культуральной жидкости, используемой в качестве посевного материала, и большим количеством инокулята (15–20%), содержащего ЭПС. По нашему мнению, наблюдаемое явление можно рассматривать как проявление адаптивных механизмов, позволяющих популяции выжить в неблагоприятных условиях.

Экспериментальные данные, приведенные в табл. 1, позволили предположить, что в исследуемых неоптимальных условиях культивирования продуцента ответом клеток на воздействие неблагоприятных факторов будет изменение свойств синтезируемых ЭПС.

Ранее было установлено, что свойства растворов ЭПС *Acinetobacter* sp. (способность к структурированию в присутствии катионов, повышению вязкости при низких значениях рН, в системе Cu²⁺-глицин и др.) определяются соотношением в составе ЭПС ацилированных и неацилированных полисахаридов, а также степенью ацилирования АП [5, 10–12]. Растворы ЭПС *Acinetobacter* sp. с высоким содержанием неацилированного компонента (более 50%) не обладают перечисленными свойствами. Образование ацилированных полисахаридов зависит от содержания одновалентных катионов (K⁺ и Na⁺) в среде культивирования бактерий [10–12]. В частности, ЭПС, синтезируемые *Acinetobacter* sp. на среде с 0.065 М одновалент-

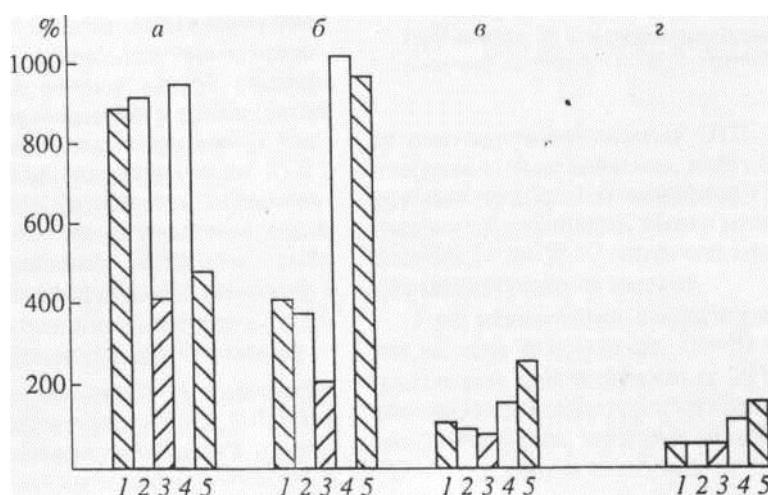


Рис. 1. Влияние температуры культивирования *Acinetobacter* sp. на относительное увеличение вязкости растворов (%) синтезируемых экзополисахаридов в присутствии 0.1 М KCl (1); 0.1 М NaCl (2); 0.4 М NH₄Cl (3); Н⁺-форме (4); системе Cu²⁺-глицин (5). Температура культивирования (°C): а - 24; б - 30; в - 37; з - 42.

ных катионов, содержат в своем составе лишь 40% АП с низкой степенью ацилирования (4.0%); при увеличении концентрации одновалентных катионов в среде до 0.090–0.140 М содержание АП в составе ЭПС повышается до 70–95% [10].

При повышении температуры культивирования до 37 и 42°C синтезировались ЭПС, растворы которых практически не структурировались катионами, незначительно повышали вязкость в Н⁺-форме и системе Cu²⁺-глицин (рис. 1). Установлено, что в таких условиях синтезировались, в основном, неацилированные полисахариды. Их содержание в составе ЭПС достигало 90–95%. Это может быть связано с нарушениями при повышенных температурах роста бактерий ферментных систем, ответственных за синтез жирных кислот, либо за их экскрецию из клеток.

При понижении температуры культивирования до 24°C синтезировались ЭПС, растворы которых характеризовались высокой степенью увеличения вязкости в присутствии одновалентных катионов K⁺ и Na⁺ (800–900% против 350–400% у растворов ЭПС, образуемых при 30°C) (рис. 1). Аналогичными свойствами обладали растворы ЭПС, образуемые *Acinetobacter* sp. при рН 5.0; 6.0; 8.0, а также яри низких значениях рО₂ (рис. 2 и рис. 3). Следует отметить, что растворы исследуемых ЭПС характеризовались менее выраженной способностью к повышению вязкости в присутствии МН₄ (рис. 1, 2, 3).

В отличие от ЭПС, полученных в оптимальных условиях, вязкость растворов ЭПС, синтезируемых при 24°C, рН 5.0; 6.0; 8.0 и низких значениях рО₂, в системе Cu²⁺-глицин была ниже по сравнению с их вязкостью в присутствии катионов калия и натрия (рис. 1-3). Это явление можно объяснить следующим образом. В реакции с Cu²⁺, а также в процессах структурирования растворов ЭПС одновалентными катионами принимают участие кислые группы ЭПС, представленные остатками глюкуроновой и пировиноградной кислот. Структурирование ЭПС происходит в процессе их синтеза [3]. Вероятно, при культивировании бактерий в указанных условиях синтезируются ЭПС, обладающие высокой способностью к образованию структурированных систем с участием одновалентных катионов. Очевидно, растворы таких ЭПС будут незначительно увеличивать вязкость в системе Cu²⁺-глицин, так как кислые группы в составе ЭПС заняты одновалентными катионами.

Растворы ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. при пониженной температуре, рН 5.0; 6.0; 8.0 и низких значениях рО₂, характеризовались одинаковым относительным увеличением вязкости в присутствии одновалентных катионов (рис. 1, 2, 3). Однако вязкость растворов ЭПС, образуемых при рН 5.0 и 6.0, в системе Cu²⁺-глицин была ниже по сравнению с вязкостью в аналогичных услови

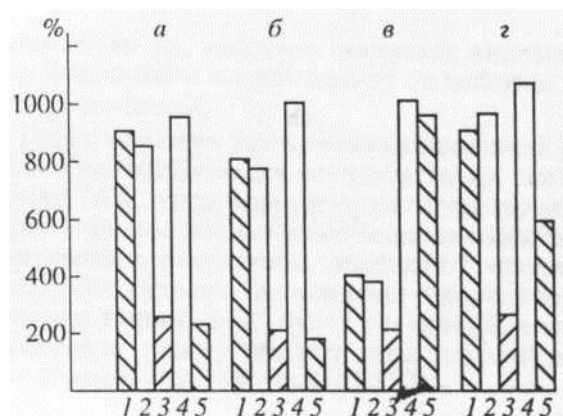


Рис. 2. Влияние pH среды культивирования *Acinetobacter* sp. на относительное увеличение вязкости растворов (%) синтезируемых экзополисахаридов в присутствии 0.1 М KCl (1); 0.1 М NaCl (2); 0.4 М NH₄Cl (3);

Н⁺-форме (4); системе Cu²⁺-глицин (5). pH среды: а - 5.0; б - 6.0; в - 7.0; г - 8.0.

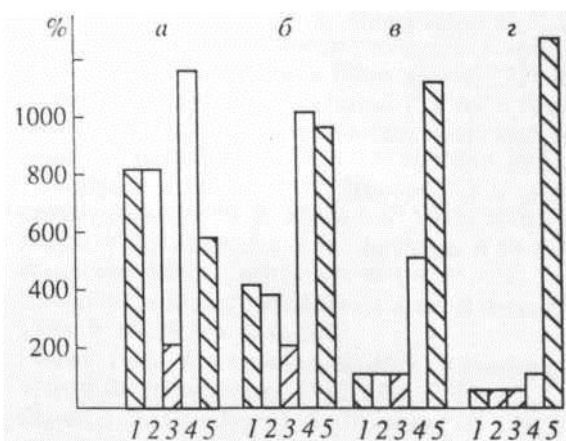


Рис. 3. Влияние концентрации растворенного кислорода в среде культивирования *Acinetobacter* sp. на относительное увеличение вязкости растворов (%) синтезируемых экзополисахаридов в присутствии 0.1 М KCl (1); 0.1 М NaCl (2); 0.4 М NH₄Cl (3); Н⁺-форме (4); системе

Cu²⁺-глицин (5). Концентрация растворенного кислорода в среде (%): а - 5–10; б - 30–40; в - 50–60; г - 70–80.

ях растворов остальных ЭПС. Вполне вероятно, что невысокая вязкость растворов ЭПС, синтезируемых при низких значениях pH, в системе Cu²⁺-глицин обусловлена более низким содержанием в составе этих ЭПС остатков глюкуроновой и (или) пировиноградной кислот.

При увеличении концентрации растворенного кислорода в среде до 50–60 и 70–80% свойства растворов синтезируемых ЭПС менялись: не наблюдалось структурирования их одновалентными катионами; при рО₂ 70–80% образовывались ЭПС, растворы которых не превышали вязкость в Н⁺-форме (рис. 2). Как показали исследования, это связано с преимущественным образованием в таких условиях неацилированных полисахаридов, содержание которых в ЭПС составляло более

90%. В тоже время растворы ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. при высоких значениях pO_2 , обладали способностью значительно повышать вязкость в системе Cu^{2+} –глицин. Как отмечалось ранее, это может быть обусловлено тем, что растворы этих ЭПС не структурируются одновалентными катионами. Однако растворы ЭПС, синтезируемых при 37° и 42°С и представляющих собой практически полностью неацелированные полисахариды, также не структурировались катионами но и не повышали вязкость в системе Cu^{2+} -глицин (рис. 1). В связи с этим можно предположить, что в условиях высоких значений pO_2 синтезируются ЭПС с повышенным содержанием в составе глюкуроновой и (или) пировиноградной кислот.

Ранее нами было показано, что ЭПС, синтезируемые *Acinetobacter* sp. в различных условиях культивирования (в частности при различном содержании в среде одновалентных катионов, а также при внесении в среду C_4 -дикарбоновых кислот), характеризуются одинаковым полярным соотношением нейтральных моносахаридов, глюкуроновой и пировиноградной кислот [10, 12, 13]. Представленные в настоящей работе данные позволяют предположить, что при культивировании *Acinetobacter* sp. в условиях пониженных значений pH, а также при высоких концентрациях растворенного кислорода, в составе синтезируемых ЭПС может меняться содержание кислых групп. Такие различия в составе ЭПС, наряду с изменением в составе содержания АП и степени их ацилирования как было установлено ранее [10-12], могут быть причиной изменения некоторых свойств растворов ЭПС.

Следует отметить, что все исследуемые ЭПС (т.е. ЭПС, синтезируемые при различных значениях pH, pO_2 , температуры и различном содержании в среде одновалентных катионов) выпадали в осадок в присутствии Cr^{3+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} . Это важное свойство ЭПС адсорбировать ионы тяжелых токсичных металлов в результате их осаждения, присущее всем исследуемым ЭПС

Acinetobacter sp., является, очевидно, определяющим фактором в защите клеток от действия токсичных металлов.

Таким образом, при изменении внешних факторов культивирования *Acinetobacter* sp. синтезируются ЭПС, растворы которых характеризуются различными физико-химическими свойствами. Полученные результаты позволяют предположить, что степень выполнения биологической функции такими ЭПС будет различной, а также определить новые области практического использования синтезируемых ЭПС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ботвинко И.В. // Успехи микробиологии. 1985. Т. 20. С. 79-122.
2. Семенова Е.В., Гречушкина Н.Н. // Экологическая роль микробных метаболитов. М.: Изд-во ун-та, 1986. С. 121-130.
3. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C_1 - C_2 -соединениях. Киев: Наук, думка, 1922. 212 с.
4. Кодама Т., Накахара Т., Омори Т. и др. // Рост микроорганизмов на C_1 -соединениях: Тез. докл. симп. Пушино: НЦБИ АН СССР, 1977. С. 213-215.
5. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Пинчук Г.Э. и др. // Микробиология. 1994. Т. 63. № 6. С. 1015-1019.
6. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Буклова В.Н. и др. // Микробиология. 1995. Т. 64. № 1. С. 51-54.
7. Dubois M., Gilles K., Hamilton J et al. // Anal. Chem. 1956. V. 28. №3. P. 350-356.
8. Пирог Т.П., Краснопецева Н.В., Гринберг Т.А. и др. // Биотехнология. 1991. № 4. С. 67 -70.
9. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э. и др. // Микробиология. 1994. Т. 63. № 5. С. 840-846.
10. Пирог Т. П., Гринберг Т.А., Сенченкова С.Н., Малащенко Ю.Р. // Микробиология. 1995. Т. 64. С. 527-532.
11. Пирог Т.П. // Микробиология. 1996. Т. 65. № 5. С. 639-643.
12. Пирог Т.П. // Микробиология. 1996. №5. С. 644-648.
13. Малащенко Ю.Р., Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э. // Микробиологический журнал. 1993. Т. 55. №2. С. 35—41.

Effect of Environmental Factors on the Synthesis and Properties of *Acinetobacter* sp. Exopolysaccharides

T. P. Pirog, T. A. Grinberg, and Yu. R. Malashenko

Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 252627 Ukraine

Abstract—Effects of external factors on the synthesis and physicochemical properties of *Acinetobacter* sp. exopolysaccharides (EPSs), which determine the biological functions of this microorganism, were studied. The cultivation temperature, medium pH, and oxygen concentration in the medium (pO_2) affected the viscosity of

EPS solutions in the presence of monovalent cations, in the H^+ -form, and in a Cu^{2+} -glycine system. All the EPSs studied were precipitated with heavy metal ions (Cr^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , etc.). No changes in the EPS yield were observed under unfavorable environmental conditions. At high pO_2 values (up to 80% of saturation), the maximum specific rates of bacterial growth and EPS synthesis increased. It was suggested that *Acinetobacter* sp. EPSs perform different biological functions under optimal and nonoptimal conditions.