

УДК 579.22 : 577.114

ПОИСК МЕТАНОТРОФНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ

© 2001 г. Ю. Р. Малашенко, Т. П. Пирог, В. А. Романовская, И. Г. Соколов, Т. А. Гринберг

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, 03143 Киев

Поступила в редакцию 10.10.2000 г.

При проверке коллекционных штаммов метанотрофов *Methylococcus capsulatus* E494, 874, 3009; *M. thermophilus* 111п, 112п, 119п; *Methylobacter ucrainicus* 159, 161; *M. luteus* 57в, 126; *Methylobacter* sp. 100; *Methylomonas rubra* 15ш, SK-32 *Methylosinus trichosporium* OB3b, OB5b, 4э; *M. sporium* 5, 12, A20d, 90в; *Methylocystis parvus* OBVP выявлены бактерии, продуцирующие экзополисахариды (ЭПС) при использовании метана в качестве единственного источника углерода. Мезофильные штаммы метанотрофов с рибулозомонофосфатным путем ассимиляции C₁-соединений более активно синтезировали ЭПС по сравнению с бактериями, у которых функционирует сериновый цикл. Изучена динамика синтеза ЭПС метанотрофами в режиме хемостата.

В настоящее время микробные экзополисахариды (ЭПС) активно применяются в ряде отраслей промышленности. Использование ЭПС основано на том, что они изменяют реологические свойства водных систем и образуют гели различной плотности при низкой концентрации. Коллоидные и клеящие свойства ЭПС, их влияние на реологические свойства жидкостей используются в пищевой, фармацевтической, текстильной, нефтедобывающей и других отраслях промышленности. Необходимость расширения сырьевой базы для получения ЭПС стимулировала поиск продуцентов, способных утилизировать непищевое сырье. Известно, что метанотрофы способны синтезировать ЭПС из метана [1–5]. Интерес к ЭПС, которые синтезируются метанотрофами, вызван, помимо традиционного использования, перспективой применения этих биополимеров для связывания пыли и снижения уровня метана в выработках угольных шахт [6, 7].

Цель работы – выявление наиболее активных продуцентов ЭПС среди коллекционных штаммов метанотрофов и оценка их ЭПС-синтезирующую способность при культивировании в режиме хемостата с использованием природного газа в качестве источника углеродного питания.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе использовали штаммы облигатных метанотрофных бактерий: *Methylococcus thermophilus* 105п, 112п, 119п; *Methylococcus capsulatus* 3009; *Methylobacter ucrainicus* 159, 161; *Methylobacter luteus* 126, 57в; *Methylomonas rubra* 15ш, SK-32; *Methylosinus trichosporium* 4э; *Methylosinus sporium* 90в (выделены и описаны нами ранее [8, 9]); *Methylosinus trichosporium* OB3b, OB5b; *Methylosinus sporium* 5, 12;

Methylocystis parvus OBVP (получены от Р. Виттенбери, Англия, Эдинбургский Университет [9]); *Methylobacter* sp. 100 (получен от В. Гальченко, Россия, Институт микробиологии РАН); *Methylococcus capsulatus* E494, *Methylosinus sporium* A20d (получены от Ю. Хейер, Германия, Центральный институт микробиологии и экспериментальной терапии [9]) и *Methylococcus capsulatus* 874 (получен от Л. Горской, Россия, ВНИИсинтезбелок).

Культивирование бактерий. Периодическое культивирование метанотрофов осуществляли на двух минеральных средах (К и ММ) методами, описанными ранее [10]. Состав среды К (г/л): K₂HPO₄ · 3H₂O – 0.4; KH₂PO₄ – 0.4; NaCl – 0.3; MgSO₄ · 7H₂O – 0.4; FeCl₃ · 6H₂O – 0.001; (NH₄)₂SO₄ – 0.5. Состав среды ММ (г/л): Na₂HPO₄ · 12H₂O – 7.24; KH₂PO₄ – 3.54; MgSO₄ · 7H₂O – 0.4; FeSO₄ · 7H₂O – 0.01; (NH₄)₂SO₄ – 0.6. Время культивирования в колбах на качалке (220 об./мин) составляло 24–72 ч, температура 30°C (для штаммов *M. thermophilus* 50°C).

Непрерывное культивирование метанотрофов осуществляли в ферментере АК-10 (рабочий объем 4 л). Природный газ (98% метана, 1% этана и 1% других углеводородов) подавали в ферментер со скоростью 0.3 л/мин, воздух – 0.7 л/мин. Условия культивирования: концентрация растворенного кислорода (pO₂) – 10% от насыщения воздухом; pH 6.7; 30°C. Фактор, лимитирующий рост бактерий – аммонийный азот; скорость разбавления средой – 0.05 ч⁻¹. Использовали минеральную среду К, в которую добавляли микроэлементы (мкг/л): CuSO₄ · 5H₂O – 200; H₃BO₃ – 10; MnSO₄ · 4H₂O – 10; ZnSO₄ · 7H₂O – 70; Na₂MoO₄ · 2H₂O – 10. Концентрацию минеральных компонентов в среде, подаваемой в ферментер, увеличивали пропорционально концентрации биомассы; pH культуральной жидкости в ферментере поддер-

живали автоматической подачей 3%-ной NaOH. Бактериологическую чистоту выращенных в ферментере штаммов метанотрофов контролировали методом посева на глюкозо-картофельную и мясо-пептонную агаризованные среды. Отсутствие микробного роста на этих средах свидетельствовало об отсутствии контаминирующих бактерий.

Определение параметров роста бактерий и синтеза ЭПС. Прирост биомассы определяли по оптической плотности (D_{540}) клеточной суспензии с последующим пересчетом на абсолютно сухую биомассу клеток по калибровочному графику.

Количество синтезированных ЭПС оценивали по содержанию углеводов реакцией с фенолом и серной кислотой [11]. Активность синтеза ЭПС у бактерий определяли как количество ЭПС, которое синтезируется 1 г бактериальной биомассы (ЭПС г/г сух. массы).

Концентрацию аммонийного азота в культуральной жидкости определяли по Несслеру [12].

Выделение ЭПС [13]. Культуральную жидкость разбавляли дистиллированной водой в 2–3 раза, добавляли NaCl до конечной концентрации 0.01 М и центрифугировали (12000 g, 40 мин) для осаждения клеток. Супернатант диализовали против дистиллированной воды в течение 3 сут, затем концентрировали в вакууме (50°C) до первоначального объема и экстрагировали ЭПС органическими растворителями (этанол, изопропанол). Полученный осадок ЭПС промывали в чистом растворителе и высушивали при комнатной температуре. Количество углеводов в ЭПС определяли по реакции с фенолом и серной кислотой. Кинематическую вязкость растворов ЭПС измеряли при 20°C на стеклянном капиллярном вискозиметре ВПЖ-4, "Союзнаучприбор" (СССР).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор метанотрофов – продуцентов ЭПС. Коллекционные штаммы метанотрофов в периодическом режиме культивирования синтезировали ЭПС в различной степени (табл. 1). Более высокая ЭПС-синтезирующая способность выявлена у штаммов с рибулозомонофосфатным (РМФ) путем ассимиляции C_1 -соединений (от 0.05 до 0.32 г ЭПС / г сух. массы) на среде ММ (табл. 1). Однако на среде ММ рост штаммов *M. capsulatus* E494, 874 и 3009 (РМФ-путь) практически отсутствовал из-за высокой концентрации фосфатов и соответственно не наблюдался синтез ЭПС. Штаммы *Methylobacter* sp. 100, *M. ucrainicus* 159, *M. luteus* 126 и *Methylomonas rubra* 15ш характеризовались одинаково высокой способностью синтезировать ЭПС на обеих средах ЭПС (0.2–0.3 г/г сух. массы). Метанотрофы с сериновым циклом C_1 -ассимиляции практически не синтезировали ЭПС (табл. 1).

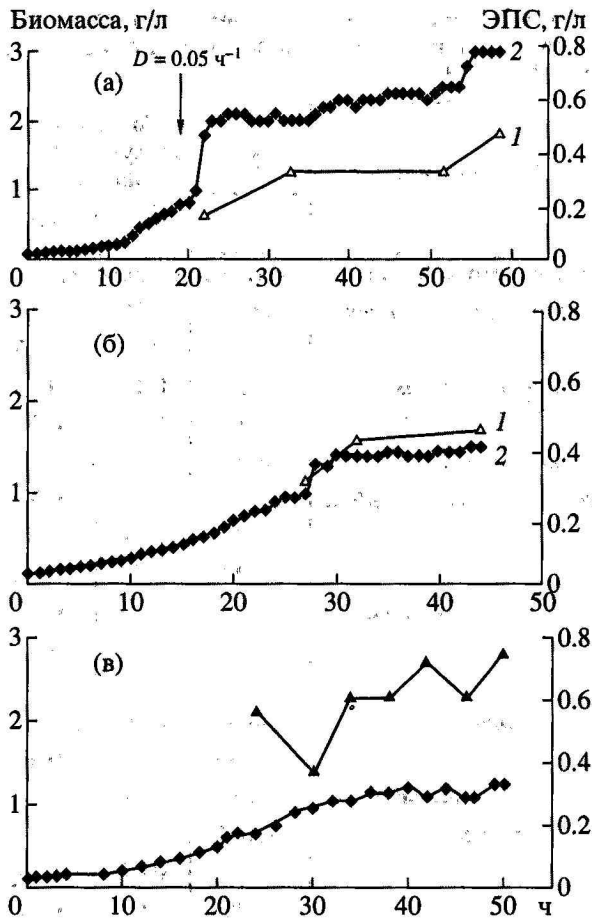
Таблица 1. Синтез экзополисахаридов метанотрофами при культивировании в периодическом режиме на средах К и ММ

| Метанотроф | № Штамма | Синтез ЭПС, г/г сухих клеток на средах | |
|---|----------|--|---------|
| | | К | ММ |
| Рибулозомонофосфатный путь ассимиляции метана | | | |
| <i>Methylobacter ucrainicus</i> | 159 | 0.16 | 0.22 |
| | 161 | 0.05 | 0.06 |
| <i>Methylobacter luteus</i> | 126 | 0.17 | 0.24 |
| | 57в | 0.11 | 0.13 |
| <i>Methylobacter</i> sp. | 100 | 0.31 | 0.37 |
| <i>Methylococcus thermophilus</i> | 105п | 0.19 | 0.38 |
| | 112п | 0.21 | не опр. |
| | 119п | 0.32 | не опр. |
| <i>Methylococcus capsulatus</i> | 874 | 0.30 | 0 |
| | E494 | 0.19 | 0 |
| | 3009 | 0.12 | 0 |
| <i>Methylomonas rubra</i> | SK32 | 0.26 | не опр. |
| | 15ш | 0.30 | 0.35 |
| Сериновый путь ассимиляции метана | | | |
| <i>Methylosinus trichosporium</i> | OB3b | 0.02 | 0.01 |
| | OB5b | 0.01 | не опр. |
| | 4э | 0.01 | 0.01 |
| <i>Methylosinus sporium</i> | 5 | 0.02 | 0.01 |
| | 12 | 0 | не опр. |
| | A20d | 0.01 | 0.01 |
| <i>Methylocystis parvus</i> | 90в | 0 | 0.01 |
| | OBVP | 0.02 | 0.03 |

Таблица 2. Образование ЭПС метанотрофами при культивировании в режиме хемостата

| Метанотроф | ЭПС-синтезирующая способность, г/г сухих клеток | Вязкость культуральной жидкости, мПа · с |
|-------------------------------------|---|--|
| <i>Methylobacter luteus</i> 126 | 0.17 ± 0.03 | 350 ± 40 |
| <i>Methylobacter ucrainicus</i> 159 | 0.55 ± 0.05 | 110 ± 30 |
| <i>Methylobacter</i> sp. 100 | 0.30 ± 0.05 | 170 ± 30 |
| <i>Methylomonas rubra</i> 15ш | 0.06 ± 0.03 | 290 ± 35 |

Таким образом, показано, что метанотрофы, реализующие РМФ-путь C_1 -ассимиляции, более активно синтезировали ЭПС по сравнению с бактериями, у которых функционирует сериновый цикл, что согласуется с данными работы [1].



Синтез ЭПС (1) и биомассы (2) бактериями *Methylobacter luteus* 126 (а), *Methylobacter ucrainicus* 159 (б) и *Methylobacter* sp. 100 (в) при культивировании в режиме хемостата.

Предполагается, что путь ассимиляции углерода у метилотрофов определяет продуктивность процесса синтеза ЭПС [1, 14]. Так, теоретический расчет стехиометрии образования полисахаридов из C_1 -соединений показал [14], что экономический коэффициент по углеродному субстрату (Y , ЭПС г/г субстрата) у бактерий, реализующих РМФ-путь ассимиляции C_1 -соединений, значительно выше (на 25–28%) по сравнению с бактериями, у которых функционирует сериновый цикл. Однако существуют и противоположные сведения [2, 15], хотя не исключено, что у метанотрофов с сериновым циклом повышенный синтез ЭПС происходил при неблагоприятных или экстремальных условиях существования. Так, например, синтез ЭПС наблюдался у *Methylocystis parvis* ОВВР при ассимиляции метанола после длительной адаптации к этому субстрату [15].

Синтез ЭПС при непрерывном культивировании. У мезофильных метанотрофов с РМФ-путем C_1 -ассимиляции изучали ЭПС-синтезирующую способность в режиме хемостата (рисунок). По-

скольку растворимость метана (источник углерода) в жидкой минеральной среде (также как и в воде) очень низкая, а синтез ЭПС у бактерий определяется прежде всего соотношением углерода и азота в среде, в качестве фактора, лимитирующего рост клеточной популяции, использовали аммонийный азот. Влияние других факторов не исследовали. Активный синтез ЭПС наблюдали при культивировании в режиме хемостата *Methylobacter ucrainicus* 159, *Methylobacter* sp. 100, *M. luteus* 126, *Methylomonas rubra* 15ш (табл. 2). Количество синтезированных ЭПС составляло 0.5–0.8 г/л, ЭПС-синтезирующая способность варьировала в пределах ЭПС 0.17–0.55 г /г сух. массы, вязкость культуральной жидкости варьировала от 110 до 350 мПа·с. Полученные результаты сопоставимы с данными по синтезу ЭПС термофильным метанотрофом *Methylococcus thermophilus* 111п [11].

Три исследованных штамма рода *Methylobacter* (126, 100, 159) синтезировали ЭПС в виде ассоциированного с клетками конгломерата, который содержал ЭПС и клетки, оседал на дно колбы через 30 мин после отбора культуральной жидкости из ферментера; при центрифугировании клетки осаждались вместе с ЭПС. Были отработаны условия, позволяющие отделить ЭПС от клеток: прогревание культуральной жидкости (80°C, 20 мин) или подщелачивание (до pH 12) с дальнейшей нейтрализацией (до pH 7). После такой обработки культуральной жидкости ЭПС можно было выделить обычным способом (см. раздел “Методика”).

Установлено, что вязкость 0.1%-ных водных растворов ЭПС, синтезированных мезофильными метанотрофами, составляла 2.2–4.0 мм²/с, что сопоставимо с вязкостью растворов ЭПС, синтезируемых известными микробными продуцентами на углеводном сырье (например, вязкость 0.1%-ного раствора ксантана фирмы “Sigma” (США) составляет 3.5–4.5 мм²/с). Наиболее высокая вязкость 0.1%-ного раствора отмечена для ЭПС, синтезированного *M. rubra* 15ш. Установлено, что ЭПС, синтезированный *M. rubra* 15ш, содержал 56–62% углеводов, белок в данном препарате не был обнаружен. ЭПС переходил в осадок при обработке водных растворов цетилтриметиламмонием бромистым (цетавлоном), что свидетельствовало о наличии кислых групп в составе ЭПС. Вязкость раствора ЭПС не изменялась в интервале pH от 5.0 до 10.0, а также в присутствии некоторых солей (KCl, NaCl, CuSO₄) при их концентрации от 0.005 до 0.1 М.

Активность синтеза ЭПС у изученных нами мезофильных метанотрофов сопоставима с таковой у известных метанотрофных продуцентов ЭПС. Так, например, по данным, приведенным в работе [2], ЭПС-синтезирующая способность у метанотрофов варьировала от 0.03 до 0.43 ЭПС г/г сух. массы. У штаммов *Methylomonas rubra*

15ш, *Methylobacter ucrainicus* 159, *Methylobacter* sp. 100, *M. luteus* 126 данный показатель ЭПС оказался выше: 0.17–0.55 г/г сух. массы, хотя количество синтезированных ЭПС (0.5–0.8 г/л) было ниже, чем у *Methylococcus thermophilus* 111п [1], *M. capsulatus* 874 [4] и неидентифицированной метаниспользующей бактерии Н-2 [3], которые продуцировали 1.0; 1.64–1.84 и 1.8 г/л ЭПС соответственно. Не исключено, что более активный синтез ЭПС характерен для термотолерантных метанотрофов (растут при 45–55°C), каковыми являются штаммы Н-2 [3], 874 [4] и 111п [10]. Наши результаты позволили выявить мезофильных (растут при 30°C) метанотрофных продуцентов ЭПС: *Methylomonas rubra* 15ш, *Methylobacter ucrainicus* 159, *Methylobacter* sp. 100, *M. luteus* 126. Вязкость 0.1%-ных водных растворов ЭПС (2.2–4.0 мм²/с), продуцируемых этими штаммами, сопоставима с вязкостью растворов ЭПС, синтезируемых как термотолерантными метанотрофами, так и известными промышленными микробными продуцентами ЭПС.

Таким образом, в результате отбора метанотрофов выявлены наиболее активные продуценты ЭПС при использовании природного газа: *Methylomonas rubra* 15ш, *Methylobacter ucrainicus* 159, *Methylobacter* sp. 100, *Methylobacter luteus* 126. Эти продуценты могут применяться для получения ЭПС непосредственно на угольных шахтах (в ферментерах за счет метана, удаляемого из угольных пластов [16]) и использоваться далее в виде культуральной жидкости, содержащей ЭПС, для связывания пыли и снижения уровня метана в выработках угольных шахт [6, 7]. Существует также принципиальная возможность получения ЭПС с помощью этих продуцентов непосредственно на нефтепромыслах на мобильных установках за счет попутных нефтяных газов с высоким содержанием метана, для интенсификации нефтедобычи при закачке содержащей ЭПС культуральной жидкости метанотрофов в заброшенные нефтяные скважины, подобно тому, как это реализуется при использовании ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. [17].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гринберг Т.А., Косенко Л.В., Малащенко Ю.Р. // Микробиол. жур. (Киев). 1984. Т. 46. № 3. С. 22–26.
2. Нестеров А.И., Иванова Т.И., Ильченко В.Я., Гаязов Р.Р., Мишенский Ю.Н. // Биотехнология. 1988. № 5. С. 584–589.
3. Chida K., Chen G.I., Kodama T., Minoda Y. // Agr. Biol. Chem. 1983. V. 47. № 2. P. 275–280.
4. Хмеленина В.Н., Гаязов Р.Р., Сузина Н.Е., Дороница Н.В., Мишенский Ю.Н., Троценко Ю.А. // Микробиология. 1992. Т. 61. № 3. С. 404–410.
5. Sutherland J.W., Ettwood D.C. // Microbiol. Technol. Curr. State Future Prospects: 29 Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge, 1979. P. 107–150.
6. Грецингер Б.Е., Малащенко Ю.Р., Карпенко В.И., Гринберг Т.А. А. с. 973869 СССР // Б.И. 1982. № 42. С. 12–16.
7. Грецингер Б.Е., Малащенко Ю.Р., Чернышенко Д.В. А. с. 962594 СССР // Б.И. 1982. № 36. С. 36–39.
8. Романовская В.А., Столяр С.М., Малащенко Ю.Р. Систематика метилотрофных бактерий. Киев: Наукова думка, 1991. 190 с.
9. Украинская коллекция микроорганизмов. Каталог культур / Под ред. В.В. Смирнова, Е.А. Киприановой, О.Р. Гвоздяк. Киев, 1998. 350 с.
10. Малащенко Ю.Р., Романовская В.А., Троценко Ю.А. Метанокисляющие микроорганизмы. М.: Наука, 1978. 195 с.
11. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350–356.
12. Баславская С.С., Трубецкова О.М. Практикум по физиологии растений. М.: Изд-во МГУ, 1964. 326 с.
13. Пирог Т.П., Краснопевецова Н.В., Гринберг Т.А., Власов С.А., Воцелко С.А., Малащенко Ю.Р. // Биотехнология. 1991. № 4. С. 67–70.
14. Linton J.D., Watts P.D., Austin R.M., Haugh D.E., Neikus H.G.D. // J. Gen. Microbiol. 1986. V. 132. № 3. P. 779–788.
15. Hou C.T., Laskin A.I., Patel R.N. // Appl. Environ. Microbiol. 1978. V. 37. № 5. P. 800–804.
16. Малащенко Ю.Р., Курдюш И.К., Романовская В.А. Выбросы угля, породы и газа. Киев: Наукова думка, 1976. С. 152–157.
17. Grinberg T.A., Pirog T.P., Malashenko Yu.R., Vlasov S.A. // Energy & Fuels. 1995. V. 9. № 6. P. 1086–1089.

Search for Methanotrophic Producers of Exopolysaccharides

Yu. R. Malashenko, T. P. Pirog, V. A. Romanovskaya, I. G. Sokolov, and T. A. Grinberg

Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences, Kiev, 03143 Ukraine; e-mail: malashenko@serv.imv.kiev.ua

Bacteria that produce exopolysaccharides (EPS) and use methane as the only source of carbon were selected by studying a collection of methanotroph strains: *Methylococcus capsulatus* E 494, 874, and 3009; *M. thermophilus* 111p, 112p, and 119p; *Methylobacter ucrainicus* 159 and 161; *M. luteus* 57v and 12b; *Methylobacter* sp. 100; *Methylomonas rubra* 15 sh and SK-32; *Methylosinus trichosporium* OV3b, OV5b and 4e; *M. sporium* 5, 12, A20d, and 90v; and *Methylocystis parvus* OVVP. Mesophilic methanotroph strains with the ribulose monophosphate way of C₁-compound assimilation synthesized EPS more actively than bacteria operating the serine cycle. The dynamics of EPS synthesis by methanotrophs during chemostat cultivation was studied.