

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 579.841.92.017.7:577.114

ОБРАЗОВАНИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ В ПРОЦЕССЕ ПЕРИОДИЧЕСКОГО
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *ACINETOBACTER SP.* НА СРЕДАХ С РАЗЛИЧНЫМ
СОДЕРЖАНИЕМ K^+

© 1995 г. Т. П. Пирог, Т. А. Гринберг, В. Н. Буклова, С. К. Воцелко, Ю. Р. Малашенко
Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного, Киев Поступила в редакцию 01.04.94 г.

Свойства растворов экзополисахаридов (ЭПС) *Acinetobacter* sp. определяются соотношением в их составе ацилированных и неацилированных полисахаридов, которое меняется в процессе периодического культивирования, а также зависит от условий культивирования продуцента. При повышении концентрации K^+ в ростовой среде до 0.05 - 0.10 М соотношение ацилированного и неацилированного полисахаридов в составе синтезируемых ЭПС не зависит от фазы роста продуцента; образование ацилированного полисахарида продолжается и в стационарной фазе, что позволяет независимо от длительности процесса культивирования получать препараты, растворы которых обладают необходимой совокупностью полезных свойств.

Ранее было показано, что в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. на среде Кодама [4], содержащей 0.025 М K^+ , в составе синтезируемых экзополисахаридов (ЭПС) наблюдается изменение соотношения ацилированных (АП) и неацилированных (НАП) полисахаридов, что приводит к изменению свойств их растворов [3]. В стационарной фазе роста отмечается образование НАП, что сопровождается снижением вязкости растворов синтезируемых ЭПС. Содержание АП в составе таких ЭПС составляет не более 40%, в то время как в момент достижения максимальной вязкости растворов ЭПС (логарифмическая фаза роста) в их составе содержится 65 - 68% АП [3].

Растворы ЭПС с высоким содержанием в составе НАП не структурируются катионами, не повышают вязкость при низких скоростях сдвига, при понижении рН, т. е. не обладают теми уникальными свойствами, которые определяют практическую ценность ЭПС *Acinetobacter* sp. [3].

При выращивании бактерий на среде, содержащей 0.05 М K^+ , синтезируется ЭПС, из которого удалось выделить 70% АП [6]. Ранее было установлено также, что увеличение концентрации K^+ в ростовой среде до 0.05 и 0.10 М позволяет в 4 - 9 раз повысить вязкость культуральной жидкости при неизменном уровне биомассы и ЭПС [2].

Очевидно, характер изменения состава и свойств ЭПС, синтезируемых в процессе периодического культивирования бактерий на средах с повышенным содержанием K^+ отличается от установленного ранее. Проверка данного предположения определила цель настоящей работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Периодическое культивирование *Acinetobacter* sp. осуществляли в колбах на качалке и ферментере АК-210, как описано ранее [3,6]. Для достижения концентрации K^+ , равной 0.05 и 0.10 М, в среду дополнительно вносили KCl .

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на вес абсолютно сухих клеток по калибровочному графику.

Количество синтезированных ЭПС устанавливали по концентрации углеводов, определяемых с помощью колориметрического метода по реакции с фенолом и серной кислотой [9].

Для сравнения вязкости растворов ЭПС, синтезируемых в процессе культивирования бактерий, через каждые 4 ч отбирали пробы культуральной жидкости, разбавляли их дистиллированной водой до одинаковой концентрации (0.02%) по углеводам и измеряли вязкость полученных растворов с помощью стеклянного капиллярного вискозиметра типа Оствальд. Таким образом, об изменении свойств ЭПС в процессе культивирования судили по изменению вязкости 0.02% (по углеводам) растворов культуральной жидкости.

Для выделения ЭПС культуральную жидкость диализовали против дистиллированной воды в течение 7 сут, разбавляли дистиллированной водой в 2 - 3 раза, центрифугировали для отделения клеток. Супернатант концентрировали в вакууме (50°C) до первоначального объема. Для дальнейших исследований использовали полученные растворы ЭПС.

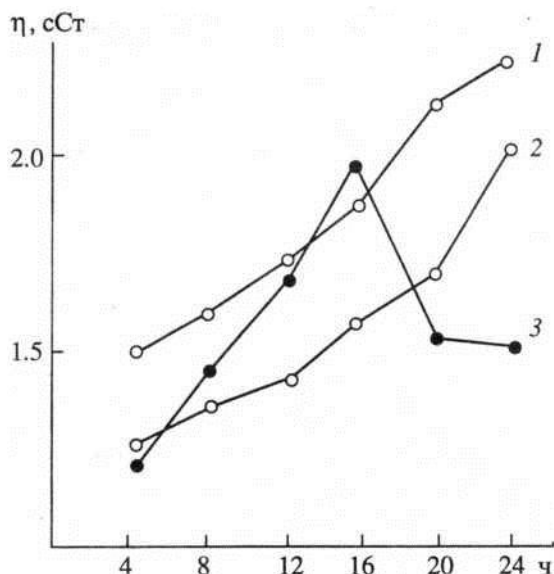


Рис. 1. Изменение вязкости растворов экзополисахаридов при периодическом культивировании *Acinetobacter* sp. Содержание K⁺ в среде, М: 1 — 0.10; 2 — 0.05; 3 — 0.025.

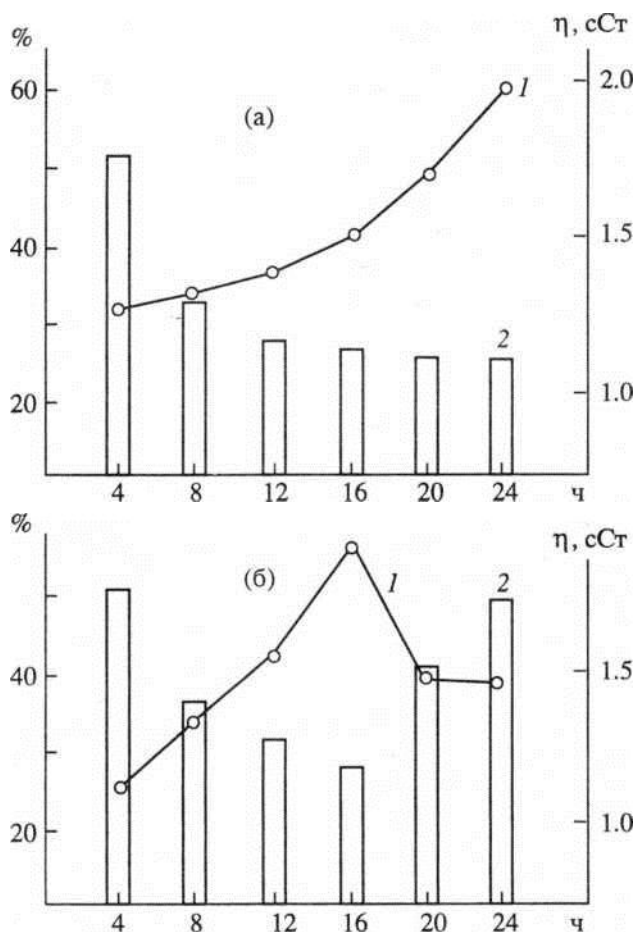


Рис. 2. Изменение вязкости растворов экзополисахаридов (1), содержания в ЭПС фракций с молекулярной массой до 2 млн. (ось ординат) (2) в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. на среде, содержащей 0.05 М К⁺ (а) и 0.025 М К⁺ (б).

Определение молекулярной массы ЭПС, синтезируемых в процессе периодического культивирования, и содержания в составе ЭПС фракций с молекулярной массой до 2 млн. проводили по описанному методу [1,5].

Определение количества АП и НАП, синтезируемых бактериями в процессе культивирования, осуществляли, как описано в работе [2].

Для изучения химического состава полисахаридов из полученных растворов (см. выше) осаждали ЭПС добавлением 1.5 объемов изопропанола. Осадок ЭПС промывали в чистом изопропаноле и высушивали при комнатной температуре.

Содержание углеводов в составе ЭПС определяли по описанному методу [9], урановых кислот - по методу Дише [8], пировиноградной кислоты - по методу Умбрейта, описанному в работе [7], жирных кислот - как описано в работе [6] и выражали в процентах к весу условно сухого вещества. За условно сухое вещество принимали вещество, не теряющее веса при высушивании в вакууме при 40°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение периодического культивирования *Acinetobacter* sp. на среде, содержащей 0.025 М К⁺, наблюдается постепенное увеличение вязкости растворов синтезируемых ЭПС до максимального значения (рис. 1, кривая 3, 16 ч роста); к концу процесса вязкость растворов снижается. При выращивании бактерий на среде с повышенным содержанием К⁺ (0.05 и 0.10 М) характер изменения вязкости растворов ЭПС отличается: наблюдается постепенное увеличение вязкости в течение всего процесса культивирования (рис. 1).

Учитывая закономерности, установленные для процесса культивирования бактерий на среде с 0.025 М К⁺ [2,4], предположили, что различный характер изменения вязкости растворов ЭПС при выращивании *Acinetobacter* sp. на средах с 0.025, 0.05 и 0.10 М К⁺ может быть обусловлен различиями в значениях молекулярной массы синтезируемых ЭПС, а также различным соотношением в их составе ацилированных и неацилированных полисахаридов.

Ранее было установлено, что снижение вязкости растворов ЭПС к концу процесса сопровождается увеличением в составе ЭПС фракций с молекулярной массой до 2 млн. [4]. При выращивании бактерий на среде с 0.05 М К⁺ в течение периодического культивирования в составе синтезируемых ЭПС содержание фракций с молекулярной массой до 2 млн. остается практически неизменным и составляет приблизительно 25%, т. е. столько, сколько в момент достижения максимальной вязкости растворов ЭПС при выращивании *Acinetobacter* sp. на среде с 0.025 М К⁺ (рис. 2).

ЭПС *Acinetobacter* sp. является высокомолекулярным - основное количество препарата имеет молекулярную массу 2 млн. и выше [4] (рис. 2). Высокая молекулярная масса ЭПС и, как следствие, высокая вязкость культуральной жидкости обусловлены структурированием растворов ЭПС катионами, содержащимися в ростовой среде (табл. 1). Из данных, представленных в табл. 1, следует, что чем выше вязкость культуральной жидкости, тем ниже содержание в ЭПС компонентов с молекулярной массой до 2 млн. Следует отметить, что после диализа растворов ЭПС в их составе увеличивается содержание фракций с молекулярной массой до 2 млн., причем особенно сильно для ЭПС, синтезируемых на средах с повышенным содержанием K^+ . Это позволяет сделать вывод о том, что структурирование растворов ЭПС катионами осуществляется путем "сшивки" отдельных молекул ЭПС между собой, т. е. их агрегации. Однако ранее было установлено, что растворы ЭПС *Acinetobacter* sp. с высоким содержанием в составе НАП не структурируются катионами [3]. Таким образом, увеличение содержания фракций с молекулярной массой до 2 млн. в составе ЭПС, синтезируемых бактериями в стационарной фазе роста на среде с 0.025 М K^+ (рис. 2), обусловлено образованием неацелированных ЭПС, как показано ранее [3]. В течение периодического культивирования бактерий на среде с 0.05 М K^+ содержание фракций с молекулярной массой до 2 млн. в составе синтезируемых ЭПС не меняется (рис. 2). Можно предположить, что в этих условиях независимо от фазы роста продуцента синтезируется, в основном, ацелированный полисахарид.

Таблица 1. Молекулярная масса экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+

Содержание K^+ в среде, М	Вязкость культуральной жидкости, сСт	Процент фракций с молекулярной массой до 2 млн. в ЭПС	
		до диализа	после диализа
0.025	149.6	17.0	46.3
0.050	347.7	5.5	24.5
0.100	420.4	3.4	22.0

Примечание. Уровень биомассы и ЭПС при выращивании бактерий на исследуемых средах был одинаковым и составлял 1.8 - 2.0 г/л.

Таблица 2. Химический состав экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+

Содержание K^+ в среде, М	Содержание, % к весу условно сухого ЭПС			
	углеводов	урановых кислот	ПВК*	жирных кислот
0.025	40.0	15.7	3.0	2.0
0.050	39.3	15.3	3.1	6.5
0.100	38.0	15.4	3.3	5.0

* ПВК - пировиноградная кислота.

Изучение химического состава ЭПС, синтезируемых на средах с различной концентрацией K^+ , показало, что исследуемые полисахариды отличаются содержанием в их составе жирных кислот (табл. 2). При этом содержание углеводов,

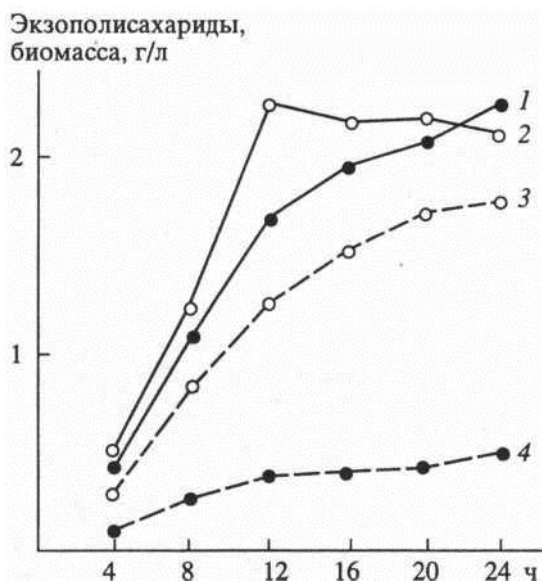


Рис. 3. Накопление экзополисахаридов (1, 3, 4), биомассы (2) в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. на среде, содержащей 0.05 М K^+ ; 3 - ацелированный ЭПС; 4 - неацелированный ЭПС (то же на рис. 4).



Рис. 4. Накопление экзополисахаридов (2, 3, 4), биомассы (1) в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. на среде, содержащей 0.10 М K^+ .

а также остатков пировиноградной и уоновых кислот - функциональных групп, наряду с жирными кислотами определяющих свойства растворов ЭПС, не меняется. Очевидно, различия в количестве жирных кислот у исследуемых ЭПС связаны с различным соотношением в их составе АП и НАП.

Результаты дальнейших исследований показали, что при выращивании бактерий на среде с повышенным содержанием K^+ в процессе периодического культивирования содержание ацилированных полисахаридов в составе синтезируемых ЭПС практически не меняется и составляет 70 - 95%, причем образование АП происходит и в стационарной фазе роста (рис. 3 и 4).

Роль K^+ в синтезе ацилированных полисахаридов может заключаться в его влиянии на активность ферментов, осуществляющих этерификацию углеводной цепи ЭПС, или в случае, когда эти ферменты находятся снаружи цитоплазматической мембраны, в участии K^+ в процессах экскреции жирных кислот через цитоплазматическую мембрану.

Полученные результаты позволяют предположить, что в зависимости от условий культивирования продуцента меняется не только соотношение АП и НАП в составе синтезируемых ЭПС, но и содержание жирных кислот в ацилированном полисахариде, т. е. степень ацилирования АП. Очевидно, свойства растворов ЭПС *Acinetobacter* sp. зависят как от содержания жирных кислот в АП, так и от соотношения в составе ЭПС АП и НАП.

Ранее было установлено, что при выращивании бактерий на среде с 0.025 М K^+ для получения ЭПС, растворы которых обладают оптимальной совокупностью полезных свойств, процесс культивирования следует вести до момента достиже-

ния максимальной вязкости растворов ЭПС (обычно до наступления стационарной фазы роста культуры), что неизбежно приводит к снижению количества получаемого препарата. Приведенные результаты показывают, что при увеличении концентрации K^+ в ростовой среде независимо от длительности процесса культивирования можно получать препараты с высоким содержанием в их составе ацилированных полисахаридов, т. е. ЭПС, растворы которых характеризуются необходимыми полезными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Воцелко С. К., Пирог Т. П., Малашенко Ю. Р., Гринберг Т. А.* Способ определения молекулярно-массовой неоднородности микробных полисахаридов. А. с. 1451166 СССР // Б. И. 1989. № 2. С. 7.
2. *Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Малашенко Ю. Р.* // Прикл. биохимия и микробиология. 1990. Т. 26. Вып. 5. С. 654.
3. *Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Пинчук Г. Э. и др.* // Микробиология, 1994. Т. 63. Вып. 6. С. 1015.
4. *Кодама Т., Накакура Т., Омори Т. и др.* // Рост микроорганизмов на С-соединениях (12 - 16 сентября 1977. Пушино). Тез. докл. симп. Пушино: НЦБИ АН СССР, 1977. С. 213.
5. *Пирог Т. П., Краснопецева Н. В., Гринберг Т. А. и др.* // Биотехнология. 1991. № 4. С. 67.
6. *Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Пинчук Г. Э. и др.* // Микробиология. 1994. Т. 63. Вып. 5. С. 840.
7. *Филлипович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Т. А.* Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение, 1975. 252 с.
8. *Dische Z. I/ J. Biol. Chem.* 1947. V. 167. № 1. P. 189.
9. *Dubois M., Gilles R., Hamilton J. et al.* // *Anal. Chem.* 1956. V. 28. № 3. P. 350.

Рецензент Л.О. Северина

Production of *Acinetobacter* sp. Exopolysaccharides in Batch Culture in the Presence of Different Potassium Concentrations

T. P. Pirog, T. A. Grinberg, V. N. Buklova, S. K. Votselko, and Yu. R. Malashenko

Zabolotnyi Institute of Microbiology and Virology, Ukrainian Academy of Sciences, Kiev

Abstract — Rheological properties of *Acinetobacter* sp. exopolysaccharide solutions are defined by the ratio of acylated to non-acylated polysaccharide components which varies in the course of batch cultivation and is influenced by the cultivation conditions. This ratio becomes independent on the growth phase of the producer when potassium concentration in the medium is raised to 0.05 - 0.10 M; acylated polysaccharides are still synthesized during the stationary phase thus allowing to obtain bacterial preparations with the desired spectrum of properties whatever the cultivation duration.