

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 579.841.921222.3:577.114

ОБРАЗОВАНИЕ АЦИЛИРОВАННЫХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ В ПРОЦЕССЕ ПЕРИОДИЧЕСКОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *ACINETOBACTER SP.*

© 1996 г. Т. П. Пирог

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев Поступила в редакцию 01.06.95 г.

В течение периодического культивирования *Acinetobacter sp.* в составе синтезируемых экзополисахаридов (ЭПС) наблюдается изменение соотношения ацилированных (АП) и неацилированных (НАП) полисахаридов, а также изменение содержания жирных кислот в АП, что сопровождается изменением свойств растворов ЭПС. Растворы ЭПС, синтезируемых в процессе периодического культивирования *Acinetobacter sp.*, характеризуются различной вязкостью в присутствии катионов, H^+ -форме, системе Cu^{2+} -глицин. Количество синтезируемых ацилированных полисахаридов и степень их ацилирования определяются содержанием одновалентных катионов в среде культивирования.

Ранее было показано, что свойства растворов экзополисахаридов (ЭПС) *Acinetobacter sp.* определяются соотношением в их составе ацилированных (АП) и неацилированных (НАП) полисахаридов, а также содержанием жирных кислот в АП [1,2]. Образование ацилированных полисахаридов зависит от концентрации одновалентных катионов (K^+ и Na^+) в среде культивирования [3].

В течение периодического культивирования *Acinetobacter sp.* в ростовой среде может изменяться содержание одновалентных катионов, участвующих в ацилировании ЭПС. Следовательно, 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]), но и степень ацилирования АП, т.е. содержание жирных кислот в АП. Проверка этого предположения определила задачу настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование *Acinetobacter sp.* осуществляли на минеральной среде Кодама [4], содержащей 1.0 об. % этанола в качестве источника углерода. В среду культивирования дополнительно вносили пантотеновую кислоту (0.0003%) и дрожжевой автолизат (0.5 об. %).

Начальная концентрация одновалентных катионов в среде культивирования составляла 0.065 М (0.025 М K^+ и 0.040 М Na^+) и 0.090 М (0.050 М K^+ и 0.040 М Na^+). Для достижения концентрации K^+ , равной 0.050 М, в среду вносили KCl .

Периодическое культивирование *Acinetobacter sp.* осуществляли в ферментере АК-210, как опи-

сано в работах Гринберг и Пирог [1, 5]. В стационарной фазе роста бактерий в среду вносили C_4 -дикарбоновые кислоты (фумаровую, яблочную, аспарагиновую, щавелево-уксусную). C_4 -дикарбоновые кислоты нейтрализовали KOH , $NaOH$, а также равными молярными количествами KOH и $NaOH$. Внесение C_4 -дикарбоновых кислот в течение процесса осуществляли 4 раза порциями по 0.2%, как описано Гринберг с соавт. и Малашенко с соавт. [6,7].

Определение уровня биомассы и ЭПС, количества синтезируемых ацилированных и неацилированных полисахаридов определяли, как описано Гринберг с соавт. [1].

В течение периодического культивирования *Acinetobacter sp.* перед внесением каждой из четырех порций C_4 -дикарбоновых кислот отбирали пробы культуральной жидкости (150-200 мл), из которых выделяли ЭПС.

Выделение и очистку ЭПС, разделение их на ацилированный и неацилированный компоненты, определение химического состава полисахаридов проводили, как описано Пирог с соавт. [5, 8].

Свойства растворов ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter sp.* после внесения каждой порции C_4 -дикарбоновых кислот, оценивали по изменению вязкости их растворов в присутствии катионов, в области низких значений pH (при переводе в H^+ -форму), в системе Cu^{2+} -глицин, как описано ранее [2].

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

Ранее нами было показано, что внесение в среду культивирования *Acinetobacter* sp. C₄-дикарбоновых кислот — интермедиатов метаболизма этанола — приводит к усилению глюконеогенеза и увеличению выхода ЭПС. При дробном внесении C₄-дикарбоновых кислот в стационарной фазе роста бактерий происходит стехиометрическое превращение их в углеводы [6, 7].

Исследования по влиянию C₄-дикарбоновых кислот на образование ЭПС проводили при выращивании бактерий на среде, содержащей 0.065 М одновалентные катионы, т.е. в условиях, при которых в стационарной фазе роста синтезируется неацелированный полисахарид [1]. Эксперименты показали, что после внесения C₄-дикарбоновых кислот (в частности, фумарата калия) также отмечается образование НАП (рис. 1). Содержание ацелированного полисахарида в таком ЭПС составляет 40%, содержание жирных кислот в АП — 3.5%, и, как следствие, его растворы не структурируются катионами, не повышают вязкость при переводе в H⁺-форму и в системе Cu²⁺-глицин (таблица, рис. 2). Аналогичные результаты были получены при внесении в среду культивирования *Acinetobacter* sp. яблочной, аспарагиновой и щавелевоуксусной кислот. Для дальнейших экспериментов была выбрана фумаровая кислота.

Ранее было установлено, что при увеличении начальной концентрации одновалентных катионов в среде культивирования *Acinetobacter* sp. до 0.090-0.140 М синтезируются ЭПС, в составе которых обнаружено 70-95% АП [2,5]. Мы предположили, что можно добиться увеличения выхода ацелированных полисахаридов при внесении фумарата калия в среду с повышенным содержанием одновалентных катионов. Оказалось, что в таких условиях культивирования *Acinetobacter* sp. после внесения фумарата калия синтезируется в основном ацелированный полисахарид (рис. 1). Содержание АП в составе ЭПС, полученного после внесения четырех порций фумарата калия, достигает 65%, вязкость растворов таких ЭПС увеличивается в присутствии катионов, H⁺-форме и системе Cu²⁺-глицин, однако степень увеличения вязкости ниже, чем для растворов ЭПС, синтезируемых на аналогичной среде без внесения фумарата калия (таблица, рис. 2).

Очевидно, что наблюдаемые различия в величинах вязкости растворов исследуемых ЭПС объясняются различной степенью ацилирования АП (содержание АП в составе ЭПС одинаковое — 65-70%). В составе АП, синтезируемого при внесении в среду фумарата калия, обнаружено 3.5% жирных кислот, в то время как степень ацилирования АП, полученного на аналогичной среде без внесения фумарата, составляет 12.4% (таблица).

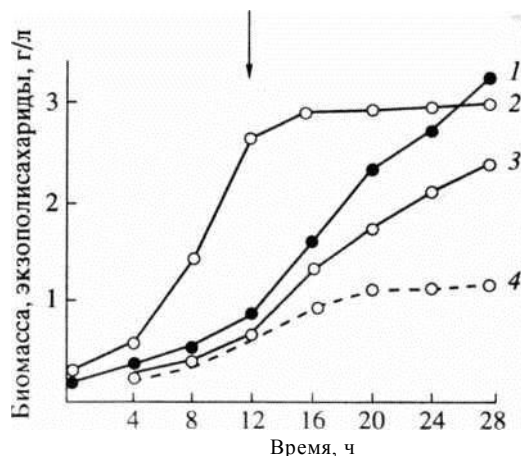


Рис. 1. Влияние фумарата калия на образование ацелированных экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. 1 — ЭПС, 2 — биомасса, 3, 4 — ацелированный полисахарид. Содержание одновалентных катионов в среде (М): 3 — 0.90; 4 — 0.065; ↓ — внесение фумарата калия.

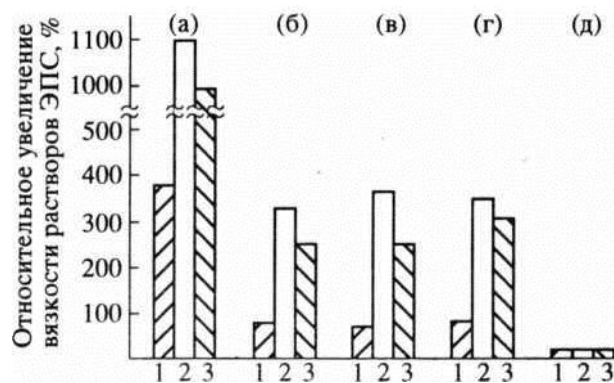


Рис. 2. Относительное увеличение вязкости растворов ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. при внесении в среду фумарата, в присутствии 0.1 М KCl (1); H⁺-форме (2); системе Cu²⁺-глицин (3). Содержание одновалентных катионов в среде культивирования (М): а-г — 0.090; д — 0.065. а — без фумарата; б, д — фумарат калия; в — фумарат натрия; г — фумаровая кислота, нейтрализованная равными молярными количествами КОН и NaOH.

Ацелированные полисахариды, синтезируемые *Acinetobacter* sp. на средах с этанолом и этанолом в присутствии фумарата калия, характеризуются одинаковым молярным соотношением нейтральных моносахаридов (глюкозы, галактозы, маннозы, рамнозы), глюкуроновой и пировиноградной кислот (таблица). Ранее мы установили [7], что в составе ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. при внесении в среду фумарата, отмечается некоторое увеличение содержания урсонных и пировиноградной кислот (22.5 и 3.90% соответственно против 17.7 и 3.02% в составе ЭПС, синтезируемых на среде с этанолом без фумарата). Результаты, приведенные в данной работе, свидетельствуют о том, что ЭПС не

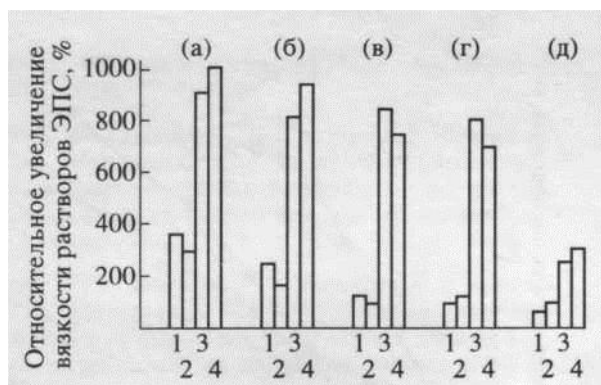


Рис. 3. Относительное увеличение вязкости растворов ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования с дробным внесением fumarата калия, в присутствии 0.1 М КСl (1), 0.4 М NH₄Cl (2), H⁺-форме (3), системе Cu²⁺-глицин (4). а — до внесения fumarата калия; б-д — после внесения fumarата калия: б — первая порция, в — вторая порция, г — третья порция, д — четвертая порция.

различаются по содержанию в составе глюкуроновой и пировиноградной кислот. По нашему мнению, незначительные расхождения в результатах обусловлены тем, что химический состав, представленный в настоящей работе, устанавливали для дезацилированных ЭПС. Различия в содержании уроновых и пировиноградной кислот в составе ЭПС, не подвергнутых дезацилированию [7], объясняются, очевидно, различной устойчивостью этих ЭПС в условиях кислотного гидролиза.

Дальнейшие эксперименты показали, что при внесении в среду как fumarата калия, так и fumarата натрия, а также fumarовой кислоты, нейтрализованной равными молярными количествами КОН и NaOH, синтезируются ЭПС, растворы которых характеризуются одинаковым поведением в присутствии катионов, H⁺-форме и системе Cu²⁺-глицин (рис. 2). Это свидетельствует о том, что образование ацилированных полисахаридов

не зависит от соотношения K⁺ и Na⁺, а определяется концентрацией одновалентных катионов в ростовой среде, как и было показано ранее [3].

В работе Пирог [3] отмечалось, что концентрация одновалентных катионов в среде меняется в течение периодического культивирования *Acinetobacter* sp., причем основное их количество расходуется в процессах структурирования синтезируемых ЭПС, которые зависят от концентрации катионов и ЭПС. При структурировании ЭПС одновалентные катионы связываются с молекулами ЭПС и, следовательно, не могут участвовать в процессах ацилирования полисахаридов. Ацилирование ЭПС происходит, очевидно, при участии так называемых “свободных” катионов, не задействованных в синтезе биомассы и структурировании синтезируемых ЭПС.

ЭПС, синтезируемые *Acinetobacter* sp. при внесении в среду fumarата, являются удобными объектами для изучения влияния одновалентных катионов на ацилирование ЭПС, так как после внесения каждой порции C₄-дикарбоновой кислоты в среде меняется содержание K⁺(Na⁺). В частности, при добавлении 0.2% fumarата калия содержание K⁺ в среде увеличивается на 0.02 М. Кроме того, при внесении одной порции fumarата синтезируется 1.5-2.0 г/л ЭПС. Такое количество ЭПС обычно образуется в течение всего процесса культивирования бактерий без внесения C₄-дикарбоновых кислот. Следовательно, можно ожидать, что увеличение количества синтезируемых ЭПС повлечет за собой повышение “расхода” одновалентных катионов, необходимых для их структурирования.

В связи с этим можно предположить, что изменение соотношения АП и НАП в составе синтезируемых ЭПС, а также степени ацилирования АП будет наиболее заметным в процессе периодичес-

Химический состав ацилированных экзополисахаридов *Acinetobacter* sp.

Начальная концентрация одновалентных катионов в среде, М	Источник углерода	Содержание АП в составе ЭПС, %	Содержание жирных кислот в АП, %	Молярное соотношение					
				Глюкоза	Галактоза	Манноза	Рамноза	Глюкуроновая кислота	ПВК*** : рамноза
0.065	Этанол	40	4.0	2.9	1.0	2.0	1.0	0.70	1.00 : 1
	Этанол + fumarат*	40	3.5	2.9	1.0	1.7	0.9	0.77	0.93 : 1
0.090	Этанол	70	12.4	3.5	1.0	1.9	1.0	0.70	0.90 : 1
	Этанол + fumarат**	65	3.5	2.9	1.0	1.8	0.9	0.73	0.95 : 1

* Внесение одной порции (0.2%) fumarата калия.

** Внесение четырех порций (0.8%) fumarата калия. ***

ПВК - пировиноградная кислота.

кого культивирования *Acinetobacter* sp. с дробным внесением С₄-дикарбоновых кислот.

Если в течение процесса культивирования изменяется количество синтезированных ацилированных полисахаридов, а также содержание в их составе жирных кислот, то и свойства растворов таких ЭПС будут различаться.

Эксперименты показали, что характер поведения растворов ЭПС, синтезируемых бактериями после внесения каждой порции фумарата калия, в присутствии катионов, Н⁺-форме, системе Cu²⁺-глицин различен (рис. 3).

На рис. 4 представлена зависимость вязкости растворов ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в течение периодического процесса с дробным внесением фумарата калия, от концентрации NaCl. Растворы этих ЭПС отличаются между собой по способности структурироваться в присутствии одинаковых концентраций NaCl.

Обращает на себя внимание снижение в исследуемых условиях вязкости растворов ЭПС, синтезируемых после внесения последних порций фумарата (рис. 3 и 4). Поскольку содержание АП в составе ЭПС, синтезируемых к концу процесса (после внесения четырех порций фумарата калия) составляет 65%, т.е. является достаточно высоким, наблюдаемое "ухудшение" свойств растворов этих ЭПС может быть объяснено изменением степени ацилирования АП. Приведенные данные по исследованию свойств растворов ЭПС позволяют предположить, что АП, синтезируемый к концу культивирования *Acinetobacter* sp., представляет собой смесь ацилированных полисахаридов с различной степенью ацилирования, причем содержание жирных кислот в АП, образуемых после внесения последних порций фумарата, очевидно, наиболее низкое.

На рис. 5 представлены данные по изменению содержания АП и НАП в составе ЭПС, а также данные по содержанию жирных кислот в АП, образуемых *Acinetobacter* sp. в течение периодического культивирования с дробным внесением фумарата калия. Результаты исследований показали, что после внесения первой порции фумарата в составе АП содержится 7.4% жирных кислот, после добавления второй порции фумарата содержание жирных кислот в АП не меняется. При определении АП и НАП в составе синтезируемых ЭПС установлено увеличение содержания неацилированного полисахарида (рис. 5). Таким образом, из второй порции фумарата синтезировался только НАП. Внесение третьей и четвертой порций фумарата в среду культивирования привело к снижению степени ацилирования АП до 3.5%. Результаты по определению содержания АП и НАП в составе синтезируемых ЭПС свидетельствуют о превращении последней порции фумарата в неацилированный полисахарид. Исходя из дан-

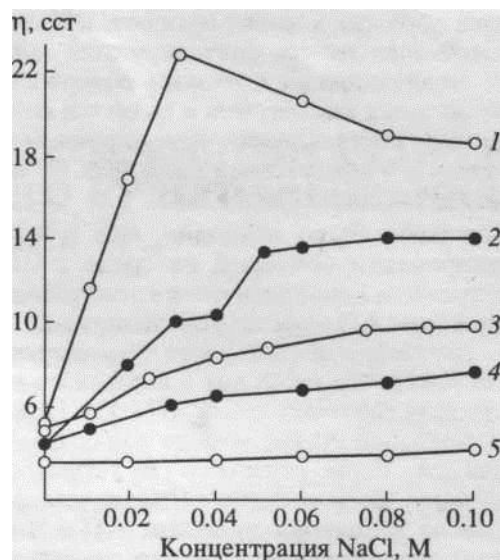


Рис. 4. Вязкость 0.03% (по углеводам) растворов ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования с дробным внесением фумарата калия, в присутствии различных концентраций NaCl. 1 — до внесения фумарата калия; 2-5 — после внесения фумарата калия: 2 — первая порция, 3 — вторая порция, 4 — третья порция, 5 — четвертая порция.

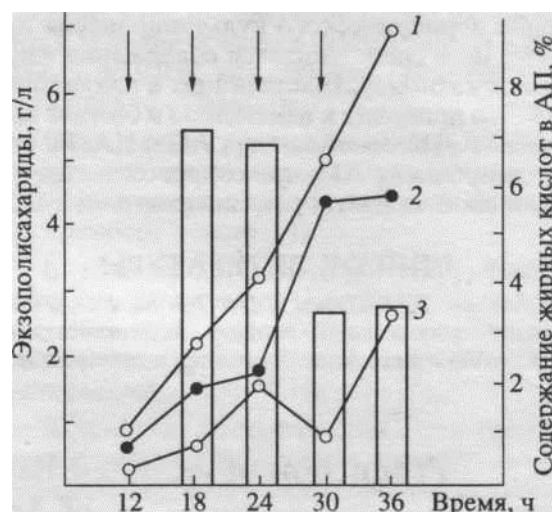


Рис. 5. Образование экзополисахаридов и изменение содержания жирных кислот в составе ацилированных полисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. с дробным внесением фумарата калия. 1 — экзополисахариды, 2 — ацилированный полисахарид, 3 — неацилированный полисахарид. □ — содержание жирных кислот в АП; ↓ — внесение фумарата калия.

ных, представленных на рис. 5, можно рассчитать, что после внесения третьей порции фумарата синтезировался АП со степенью ацилирования не более 2%.

Таким образом, к концу процесса культивирования *Acinetobacter* sp. синтезируются ацилированные полисахариды с низким содержанием в составе жирных кислот, что и является основной причиной незначительного повышения вязкости их растворов в присутствии катионов, H⁺-форме, системе Cu²⁺-глицин (рис. 3 и 4).

Ранее нами было показано, что в процессе культивирования бактерий на среде с 0.065 М концентрацией одновалентных катионов меняется содержание АП в составе синтезируемых ЭПС. Так, в стационарной фазе роста отмечается образование НАП, что приводит к снижению вязкости растворов синтезируемых ЭПС [1]. Приведенные в настоящей статье данные показывают, что в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. в составе синтезируемых ЭПС меняется не только соотношение АП и НАП, но и степень ацилирования АП, что служит причиной изменения свойств растворов ЭПС.

Данное исследование является заключительным в цикле работ, посвященных установлению причин, которые обуславливают изменение свойств растворов ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования [1—3, 5, 8, 9].

Результаты, изложенные в указанных работах и настоящей статье, свидетельствуют о том, что в течение периодического культивирования *Acinetobacter* sp. в среде меняется содержание одновалентных катионов, участвующих в ацилировании ЭПС. Это приводит к изменению в составе синтезируемых ЭПС соотношения АП и НАП и степени ацилирования АП, что сопровождается изменением свойств растворов синтезируемых ЭПС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Пинчук Г.Э. и др. Изменение состава и свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в процессе перио-

- дического культивирования // Микробиология. 1994. Т. 63. Вып. 6. С. 1015-1019.
2. 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.
3. Пирог Т.П. Влияние одновалентных катионов на образование ацилированных экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. // Микробиология. 1996. Т. 65. № 5.
4. Кодама Т., Накахара Т., Омори Т. и др. Образование внеклеточных полисахаридов водородными и метаниспользующими микроорганизмами // Рост микроорганизмов на C₁-соединениях: Тез. докл. симп. (12-16 сентября 1977 г., Пушкино). Пушкино: НЦБИ АН СССР, 1977. С. 213-215.
5. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Буклова В.Н., Воцелко 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.
6. 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.
7. Малащенко Ю.Р., Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э. Регуляция синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом // Микробиол. журн. 1993. Т. 55. № 2. С. 35-41.
8. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э., Сенченкова С.Н., Малащенко Ю.Р. Разделение экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp., на ацилированный и неацилированный компоненты // Микробиология. 1994. Т. 63. № 5. С. 840-846.
9. Пирог Т.П., Краснопевцева Н.В., Гринберг Т.А. и др. Изменение некоторых свойств экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования // Биотехнология. 1991. № 4. С. 67-70.

Рецензент И.О. Северина

Production of Acylated Exopolysaccharides in a Batch Culture of *Acinetobacter* sp.

T. P. Pirog

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

Abstract—Exopolysaccharides produced by *Acinetobacter* sp. in batch culture display changes in the ratio of acylated and nonacylated components and in the content of fatty acids in acylated polysaccharides, which affects the viscosity of exopolysaccharide solutions in the presence of cations, in the H⁺-form, and in the Cu²⁺-glycine system. The amount of acylated polysaccharides produced and the extent of their acylation are determined by the total concentration of monovalent cations in the growth medium.