

Пирог, Т.П. Интенсификация синтеза экзополисахарида этаполана на смеси ростовых субстратов / Т. П. Пирог, М. А. Коваленко, Ю. В. Кузьминская, Т. П. Криштаб // Микробиология. – 2003. – 72, № 1. – С. 26-32.

УДК 579.841: 577.114

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ СИНТЕЗА ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА НА СМЕСИ РОСТОВЫХ СУБСТРАТОВ

Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В., Криштаб Т.П.

Институт микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины, Киев

Установлены условия культивирования штамма *Acinetobacter sp.* 12S - продуцента микробного экзополисахарида (ЭПС) этаполана, позволяющие интенсифицировать синтез ЭПС на смеси двух энергетически-неравноценных субстратов (этанол и глюкоза в молярном соотношении 3,1:1).

Наиболее высокая эффективность трансформации углерода субстратов в ЭПС обеспечивалась при отсутствии в среде катионов натрия, снижении концентрации источника азотного питания до 0,3-0,45 г/л, использовании посевного материала, выращенного на этаноле. Культивирование продуцента в таких условиях сопровождалось также увеличением максимальной удельной скорости роста и смещением времени ее достижения в более раннюю ростовую фазу. Установлено, что глюкоза в смешанном субстрате не может быть заменена на мелассу.

При выращивании *Acinetobacter sp.* 12S на смеси субстратов активность ключевых ферментов C₂-метаболизма снижалась в 1,1-1,7 раза по сравнению с культивированием на этаноле. Более заметным (в 4-7 раз) было снижение изоцитратлиазной активности, что может свидетельствовать о незначительной роли глиоксилатного цикла в метаболизме бактерий при росте на смеси C₂-C₆-субстратов.

Ключевые слова: интенсификация синтеза экзополисахаридов, смешанный субстрат, ключевые ферменты C₂-C₆-метаболизма.

Ранее была показана возможность увеличения синтеза микробного экзополисахаридного препарата (ЭПС) этаполана при выращивании *Acinetobacter sp.12S* на смеси этанола и глюкозы [1]. На основе теоретических расчетов энергетических потребностей синтеза биомассы и ЭПС на энергетически-дефицитном субстрате (глюкоза) определена “дополняющая” концентрация энергетически-избыточного субстрата (этанол), позволяющая восполнить потери углерода глюкозы при окислении ее до CO_2 с целью получения энергии для процессов конструктивного метаболизма. Введение этанола в среду с глюкозой в молярном соотношении 3,1:1 сопровождалось увеличением количества синтезированных ЭПС, а также их выхода от субстрата по сравнению с выращиванием продуцента на моносубстратах.

Настоящая работа посвящена дальнейшим исследованиям интенсификации синтеза этаполана на смеси ростовых субстратов. Необходимость проведения таких исследований была обусловлена тем, что при выращивании бактерий на смеси этанола и глюкозы часто наблюдали повышение синтеза не только ЭПС, но и биомассы. Цель работы заключалась в установлении условий культивирования *Acinetobacter sp.12S* на смеси ростовых субстратов, обеспечивающих максимально полную трансформацию углерода субстратов в ЭПС. В задачу исследований входило изучение влияния на образование ЭПС таких факторов, как предистория посевного материала и состав питательной среды (концентрация источников углеродного и азотного питания, природа энергетически-дефицитного субстрата; наличие в среде ионов натрия).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследований. Объектами исследований являлись штамм *Acinetobacter sp. 12S* - продуцент комплексного полисахаридного препарата этаполана, описанный нами ранее [2] и мутантный штамм *Acinetobacter sp.1НГ*,

не образующий экзополисахариды [3].

Культивирование *Acinetobacter sp.* Бактерии выращивали на жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 6,8; NaOH – 0,9; NaCl – 1,1; NH_4NO_3 – 0,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001 (K^+ , Na^+ -среда). Культивирование бактерий осуществляли также на жидкой минеральной среде, не содержащей соединений натрия (NaOH и NaCl были заменены на эквимольные количества KOH и KCl ; K^+ -среда). В среды дополнительно вносили 0,5% (по объему) дрожжевого автолизата и 0,0006% пантотената кальция. В качестве источника углерода и энергии использовали этанол в концентрации 0,5; 1,0 и 1,7% (по объему), глюкозу в концентрации 0,5; 1,0 и 1,35% (масс.), а также смесь этих субстратов в соотношении 1:1 (% этанола по объему : масс. % глюкозы), что соответствовало молярному соотношению субстратов 3,1:1. При выращивании бактерий на смешанном субстрате концентрация этанола составляла 0,5; 0,75 и 1% (по объему), глюкозы – 0,5; 0,75 и 1% (масс.). В одном из вариантов культивирования продуцента на K^+ -среде глюкоза была заменена на эквимольную по углероду концентрацию мелассы. Гидролиз мелассы осуществляли, как описано в работе [4]. При исследовании влияния концентрации азота на образование ЭПС содержание NH_4NO_3 в среде составляло 0,3; 0,45 и 0,6 г/л.

В качестве посевного материала использовали двухсуточную культуру, выращенную на мясо-пептонном агаре (МПА), а также культуру из экспоненциальной фазы (16-24 ч роста), выращенную на минеральной K^+ -среде с различными источниками углерода: а) этанол – 0,5% (по объему); б) глюкоза – 0,5% (масс.); в) этанол 0,5% + глюкоза 0,5%. Концентрация посевного материала составляла 5% от объема засеваемой среды. Содержание NH_4NO_3 в среде культивирования бактерий при получении инокулята составляло 0,6 г/л.

Acinetobacter sp. культивировали в колбах на качалке (220 об/мин) при 30°C, pH 6,8-7,0 в течение 16 - 96 ч.

Эффективность трансформации углерода субстратов в ЭПС в различных условиях культивирования продуцента оценивали по следующим показателям:

количество синтезируемых ЭПС, выход ЭПС от субстрата и ЭПС-синтезирующая способность.

Концентрацию биомассы определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на вес абсолютно сухих клеток по калибровочному графику. Количество синтезированных ЭПС устанавливали весовым методом [5]. Выход ЭПС от субстрата и удельную скорость роста бактерий определяли, как описано в работе [6]. ЭПС-синтезирующую способность определяли как отношение количества синтезированных ЭПС к биомассе и выражали в г ЭПС/г биомассы. Концентрацию этанола и глюкозы в культуральной жидкости определяли, как описано в работах [1, 4].

Скорость дыхания интактных клеток *Acinetobacter sp.* в присутствии этанола, ацетальдегида, ацетата, глюкозы и пирувата, а также активности ключевых ферментов C_2 - C_6 -метаболизма в бесклеточных экстрактах: НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1.), НАДФ⁺-зависимой ацетальдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.4), ацетил-КоА-синтетазы (КФ 6.2.1.1.), ацетаткиназы (КФ 2.7.2.1), изоцитратлиазы (КФ 4.1.3.1.), 6-фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11), 6-фосфоглюконатдегидратазы (КФ 4.2.1.12) определяли, как описано в работах [4, 7]. Для проведения полярографических и энзиматических исследований использовали мутантный штамм *Acinetobacter sp.* 1НГ, не образующий ЭПС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что «узким» местом метаболизма этанола у *Acinetobacter sp.* является вовлечение ацетата в метаболизм [7]. Активность ацетил-КоА-синтетазы в бесклеточном экстракте, а также скорость дыхания интактных клеток в присутствии ацетата ингибировалась ионами натрия. Исключение Na^+ из этанолсодержащей среды культивирования бактерий позволило в 2-2,5 раза увеличить активность ацетил-КоА-синтетазы и скорость окисления ацетата целыми клетками. Это дало возможность предотвратить накопление ацетата в культуральной жидкости при росте продуцента на этаноле и и увеличить синтез ЭПС. В связи с этим на первом этапе исследовали

образование этаполана при выращивании бактерий на K^+ , Na^+ - и K^+ -средах, содержащих этанол и глюкозу (табл. 1). Как видно из представленных в табл. 1 данных, при выращивании бактерий на K^+ -среде повышалось количество синтезированных ЭПС, их выход от субстрата и ЭПС-синтезирующая способность. В дальнейших экспериментах *Acinetobacter sp.* выращивали на K^+ -среде.

Исследование влияния способа приготовления посевного материала показало, что при использовании инокулята, выращенного на этаноле, а также на смеси этанола и глюкозы, наблюдали увеличение показателей синтеза ЭПС по сравнению с данными, полученными при применении посевного материала с МПА или глюкозы (табл. 1). В последующих опытах в качестве инокулята использовали культуру, выращенную на этаноле.

Обращает на себя внимание существенное снижение выхода ЭПС от субстрата при повышении в среде концентрации этанола и глюкозы (табл. 1). По нашему мнению, это может быть обусловлено следующими причинами.

1. Ранее нами было показано, что при выращивании *Acinetobacter sp.* на этаноле продукты промежуточного его окисления (НАДН и НАДФН) являются ингибиторами ацетил-КоА-синтетазы – фермента, при участии которого ацетат вовлекается в метаболизм [8].

2. Из литературы известно, что у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и бактерий *Bacillus subtilis* глюкоза репрессирует синтез ацетил-КоА-синтетазы [9-12].

Таким образом, вполне вероятно, что повышение концентрации этанола и глюкозы в среде культивирования *Acinetobacter sp.* приводит к снижению как синтеза, так и активности ацетил-КоА-синтетазы и, следовательно, снижению эффективности трансформации углерода этанола в ЭПС. В пользу такого предположения свидетельствовали данные определения скорости дыхания целых клеток в присутствии C_2 - C_6 -субстратов (табл. 2). Так, скорость окисления ацетата интактными клетками, выращенными на среде с повышенным содержанием этанола и глюкозы, была в 1,5 раза ниже, чем у клеток,

культивируемых при более низкой концентрации субстратов. При этом скорость окисления этанола, ацетальдегида, глюкозы и пирувата в обоих случаях практически не изменялась (табл. 2).

Данные определения активности ключевых ферментов C_2 - C_6 -метаболизма при выращивании *Acinetobacter sp.* на смеси этанола и глюкозы, а также на моносубстратах, представлены в табл. 3. Эти результаты подтверждают полученные ранее [4] данные о том, что независимо от источника углеродного питания (глюкоза, этанол) в клетках *Acinetobacter sp.* обнаружена высокая активность ключевых ферментов C_2 - и C_6 -метаболизма. Исключением являлась активность изоцитратлиазы при выращивании бактерий на глюкозе.

Следует отметить, что при выращивании бактерий на смешанном субстрате активность ферментов C_6 -метаболизма была ниже, чем на моносубстрате - глюкозе, как и активность ферментов C_2 -метаболизма по сравнению с культивированием продуцента на этаноле. (табл. 3). Обращает на себя внимание существенное (в 4-7 раз) снижение изоцитратлиазной активности на смеси этанола и глюкозы по сравнению с выращиванием бактерий на этаноле, причем активность этого фермента снижалась при повышении в среде концентрации субстратов. Ранее была установлена корреляция между активностью ацетил-КоА-синтетазы и изоцитратлиазы при росте *Acinetobacter sp.* на этаноле [7]. Вполне вероятно, что снижение изоцитратлиазной активности при увеличении концентрации глюкозы и этанола в среде может быть объяснено репрессирующим влиянием глюкозы на синтез ацетил-КоА-синтетазы и ингибированием активности этого фермента продуктами промежуточного метаболизма этанола. С таким объяснением согласуются и результаты полярографических исследований (табл. 2). Однако определение ацетил-КоА-синтетазной активности показало, что она, хотя и снижалась на смеси этанола и глюкозы, тем не менее оставалась достаточно высокой (табл. 3). Кроме того, в бесклеточном экстракте обнаружена ацетаткиназная активность, которая была практически одинаковой при росте как на моно-, так и на смешанном субстрате (табл.3).

Мы полагаем, что наблюдаемое снижение активности изоцитратлиазы на смеси субстратов обусловлено тем, что ацетил-КоА, образовавшийся в ацетил-КоА-синтетазной и ацетаткиназной реакциях, вовлекается преимущественно в цикл трикарбоновых кислот, а не в глиоксилатный шунт. Ответы на этот вопрос, а также на вопрос о возможном репрессирующем влиянии глюкозы на синтез ацетил-КоА-синтетазы будут получены при проведении дальнейших исследований.

Из литературы известно, что соотношение концентраций углерода и азота в среде имеет существенное значение для синтеза ЭПС [2, 13-16]. Как правило, максимальный синтез ЭПС наблюдается в условиях лимита по азотному источнику питания. Наши исследования показали, что при выращивании *Acinetobacter sp.* на смеси этанола и глюкозы «глубина» лимитирования источником азотного питания может являться одним из факторов, регулирующих направленность биосинтетических процессов в сторону образования ЭПС (табл. 4). Так, изучение влияния концентрации источника азота в среде культивирования бактерий на синтез ЭПС показало, что, независимо от содержания этанола и глюкозы в среде, при снижении концентрации азота наблюдалось существенное повышение ЭПС-синтезирующей способности, а также увеличение выхода ЭПС от субстрата (табл. 4). Повышение этих показателей было обусловлено как снижением уровня биомассы при уменьшении концентрации источника азота, так и повышением (за некоторыми исключениями) количества синтезируемых ЭПС.

Полученные результаты позволили установить, что при выращивании бактерий на среде, содержащей 0,5% этанола + 0,5% глюкозы, оптимальная концентрация нитрата аммония в среде составляет 0,3 г/л; 1% этанола + 1% глюкозы – 0,45 г/л; 0,75% этанола + 0,75% глюкозы – 0,3-0,45 г/л NH_4NO_3 . Следует однако отметить, что и при оптимальной для синтеза ЭПС концентрации источника азота в среде, содержащей 1% этанола + 1% глюкозы, выход ЭПС от субстрата оставался на уровне 50-52%, что существенно ниже, чем на средах с более низкой концентрацией субстратов (табл. 4).

В табл. 4 представлены сравнительные показатели процесса культивирования *Acinetobacter sp.* на смешанном субстрате (0,75% этанола + 0,75% глюкозы) и моносубстратах. Концентрация моносубстратов в среде была эквимолярна по углероду концентрации смешанного субстрата. При культивировании бактерий на смеси этанола и глюкозы наблюдали увеличение количества синтезированных ЭПС (в 1,3-1,7 раза), ЭПС-синтезирующей способности (в 1,2-1,6 раза) и выхода ЭПС от субстрата по сравнению с данными выращивания на моносубстратах.

Ранее было установлено, что при выращивании *Acinetobacter sp.* на смеси этанола и глюкозы наблюдалось ускорение роста бактерий и синтеза ими ЭПС [1]. Так, через 24 ч культивирования бактерий уровень биомассы и ЭПС на смешанном субстрате был в два, а вязкость культуральной жидкости – в 4-5 раз выше, чем на моносубстратах [1]. Результаты настоящей работы показали, что при выращивании продуцента этаполана на смеси этанола и глюкозы максимальная удельная скорость роста повышалась в 1,3-1,9 раза (табл. 5). Кроме того, на смеси субстратов наблюдали смещение времени достижения максимальной скорости роста в более раннюю ростовую фазу.

Интересным оказался тот факт, что при культивировании продуцента на глюкозосодержащей среде с использованием посевного материала, выращенного на этаноле, наблюдали увеличение показателей синтеза ЭПС (табл. 4). В предыдущих исследованиях отмечалась интенсификация синтеза ЭПС при внесении в среду с глюкозой низких (0,01-0,02%) концентраций этанола или ацетата [4]. Вполне вероятно, что в обоих случаях выращивания *Acinetobacter sp.* на среде с глюкозой (при использовании инокулята с этанола, как показано в настоящей работе, или при внесении в среду с глюкозой минорных концентраций C₂-соединений, как установлено ранее [4]) увеличение синтеза ЭПС обусловлено одной и той же причиной: присутствие C₂-соединений в среде с глюкозой может индуцировать глюконеогенез. В пользу такого механизма интенсификации синтеза ЭПС свидетельствовали полученные ранее данные энзиматических исследований - при наличии низких концентраций этанола или ацетата в среде с

глюкозой активность изоцитратлиазы повышалась почти в 15 раз (по сравнению с активностью данного фермента при выращивании на глюкозе) [4]. Изоцитратлиаза является одним из ключевых ферментов глиоксилатного цикла – анаплеротической последовательности реакций, восполняющей пул C₄-дикарбоновых кислот, которые являются предшественниками глюконеогенеза [17]. Окончательные выводы об индукции глюконеогенеза как возможном механизме интенсификации синтеза этаполана на глюкозосодержащей среде при использовании инокулята с этанола могут быть сделаны после проведения соответствующих энзиматических исследований (в частности, после определения активности ключевых ферментов глюконеогенеза в различных условиях культивирования продуцента).

На следующем этапе исследовали возможность замены глюкозы в смешанном субстрате, используемом для культивирования продуцента этаполана, на более дешевый энергетически-дефицитный субстрат – мелассу. Однако при выращивании бактерий на смеси этанола и мелассы не наблюдали интенсификации синтеза ЭПС по сравнению с культивированием продуцента на моносубстрате – мелассе (табл. 6). Исследование скорости дыхания в присутствии C₂-субстратов интактных клеток *Acinetobacter sp.* показало, что скорость окисления этанола клетками, выращенными на смеси этанола и мелассы, была в 2-2,5 раза ниже, чем у клеток, культивируемых на смеси этанола и глюкозы (табл. 2). Можно предположить, что ингибиторами окисления этанола являются какие-то компоненты, входящие в состав мелассы. По нашему мнению, именно это может являться причиной отсутствия интенсификации синтеза этаполана при культивировании продуцента на смеси этанола и мелассы.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что при выращивании продуцента этаполана на смеси этанола и глюкозы в молярном соотношении 3,1:1 наиболее высокая эффективность конверсии углерода субстратов в ЭПС наблюдается при:

- использовании посевного материала, выращенного на этаноле или смеси этанола и глюкозы;

- снижении концентрации источника азотного питания (нитрата аммония) в среде до 0,3-0,45 г/л;
- отсутствии катионов натрия в среде культивирования продуцента.

При культивировании продуцента этаполана в таких условиях наблюдали повышение максимальной скорости роста бактерий и смещение времени ее достижения в более раннюю ростовую фазу, увеличение концентрации синтезированных ЭПС, выхода ЭПС от субстрата и ЭПС-синтезирующей способности по сравнению с показателями, полученными при выращивании на моносубстратах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter sp.* на смеси этанола и глюкозы // Микробиология. 2002. 71. № (В печати).
2. 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.
3. Пирог Т.П., Столяр С.М., Малащенко Ю.Р. Получение и исследование мутантных штаммов *Acinetobacter sp.*, не образующих экзополисахариды // Микробиология. 2000. 69, N 5. С. 674-680.
4. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Образование экзополисахаридов на углеводных субстратах штаммом *Acinetobacter sp.* и особенности его C₆-метаболизма // Микробиология. 2002. 71. № 2. (В печати).
5. Williams A.G., Wimpenny W.T. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in continuous culture // J. Gen. Microbiol. 1978. 104. P. 47 – 57.
6. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М: Мир, 1978. 331 с.

7. Пирог Т.П., Соколов И.Г., Кузьминская Ю.В., Малашенко Ю.Р. Некоторые особенности метаболизма этанола у мутантного штамма *Acinetobacter sp.*, не образующего экзополисахариды // Микробиология. 2001. 70. № 6. С.

8. Кузьминская Ю.В., Пирог Т.П. Регуляция активности ацетил-КоА-синтетазы у мутантного штамма *Acinetobacter sp.*, не образующего экзополисахариды // Украинский биохимический журнал. 2002. 74. № 1. С. 121.

9. Grundy F.J., Turinsky A.J., Henkin T.M. Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA // J. Bacteriol. 1994. 176. N 15. P. 4527-4533.

10. Kratzer S., Schuller H.J. Carbon source-dependent regulation of acetyl-coenzyme A synthetase-encoding gene ACS1 from *Saccharomyces cerevisiae* // Gene. 1995. 161. N 1. P. 75-79.

11. Van den Berg M.A., de Jong-Gubbels P., Kortland C.J., van Dijken J.P., Pronk J.T., Steensma H.Y. The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation // J. Biol. Chem. 1996. 271. N 46. P. 28953-28959.

12. Kratzer S., Schuller H.J. Transcriptional control of the yeast acetyl-CoA synthetase gene, ACS1, by the positive regulators CAT8 and ADR1 and the pleiotropic repressor UME6 // Mol. Microbiol. 1997. 26. N 4. P. 631-641.

13. Scheepe-Leberkuhne M., Wagner F. Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthesized by *Enterobacter sakazakii* // Biotechnol. Lett. 1986. 8. N 10. P. 695-700.

14. Southgate G., Goodwin P.M. The regulation of exopolysaccharide production and of enzymes involved in C₁-assimilation in *Methylophilus methylotrophus* // J. Gen. Microbiol. 1989. 135. P. 2859-2867.

15. Shabtai Y., Wang D.I.C. Production of emulsan in a fermentation process using soybean oil (SBO) in a carbon-nitrogen coordinated feed // Biotechnol. Bioeng. 1990. 35, N 8. P. 753-765.

16. Breuer U., Ackerman J.U., Babel W. Accumulation of poly-(3-hydroxybutyric acid) and over production of exopolysaccharides in a mutant of a

methylotrophic bacterium // 4th Symp. Bact. Polyhydroxyalkanoates (Montreal, Aug. 14-18, 1994). Can. J. Microbiol. 1995. 41, Suppl. n 1. P. 55-59.

17. *Готтишак Г.* Метаболизм бактерий. Москва: Мир, 1982. 312 с.