

УДК 579.841:577.15

УДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ МІКРОБНОГО ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА ЕТАНОЛІ

Т. П. Пирог
Ю. В. Корж

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ
E-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Визначено особливості енергетичного й конструктивного метаболізму C_2 -субстратів у *Acinetobacter* sp. В-7005 — продуцента екзополісахариду етаполану, виявлено сайти метаболічного лімітування і розроблено підходи до їх усунення.

Показано, що «вузьким» місцем метаболізму етанолу в *Acinetobacter* sp. В-7005 є асиміляція ацетату: реакція, що каталізується ацетил-КоА-синтетазою, є швидкістюлімітувальною. Встановлено умови культивування бактерій, що дають змогу усунути лімітування C_2 -метаболізму і підвищити у три рази активність ацетил-КоА-синтетази.

За таких умов синтезується високоацильований етаполан зі ступенем ацилювання 3–15%. Середня молекулярна маса полісахариду становить 1,5 млн. і не змінюється у процесі виділення й очищення препарату. Підвищений вміст жирних кислот і висока молекулярна маса етаполану зумовлюють поліпшення реологічних властивостей його розчинів, що визначають практичну значущість цього полісахариду.

Ключові слова: екзополісахариди, біосинтез, метаболізм етанолу, регуляція C_2 -метаболізму, фізико-хімічні властивості.

Мікробні екзополісахариди (ЕПС) викликають великий інтерес у дослідників завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям цих полімерів, що визначають їх використання у нафтодобувній, харчовій, хімічній промисловості, сільському господарстві, медицині.

Acinetobacter sp. В-7005 є продуцентом комплексного екзополісахариду, названого нами етаполаном [1]. На основі етаполану розроблено спосіб ізоляції припливу пластових вод, який дає змогу в разі застосування 1 т етаполану видобути додатково близько 240 т нафти та знизити її обводнення з 84 до 15%. З використанням етаполану як головної складової частини розроблено технології виготовлення косметичних кремів під загальною назвою «Екол», технічного мийного засобу БІМС-1. Встановлено можливість і доцільність застосування етаполану під час виробництва хліба та хлібопродуктів. Завдяки спроможності етаполану адсорбувати та виводити з організму солі важких металів його рекомендовано для профілактичного харчування [1].

Етаполан складається з нейтрального (мінорний компонент) і двох кислих полісахаридів, один з яких є ацильованим. Ацильований і неацильований полісахариди ідентичні за молярним співвідношенням *D*-глюкози, *D*-манози, *D*-галактози, *L*-рам-

нози, *D*-глюкуронової і піровиноградної кислот (3:2:1:1:1:1) та структурою повторюваної ланки вуглеводного ланцюга. Різниця між цими ЕПС полягає в тому, що ацильований полісахарид містить жирні кислоти (C_{12} – C_{18}) [1].

Глюкуронова й піровиноградна кислоти є бічними замісниками повторюваної ланки вуглеводного ланцюга, з'єднаними із залишками рамнози і манози, відповідно. Залежно від умов культивування продуцента у складі етаполану міститься 25–35% мінеральних компонентів (одновалентних катіонів). Наявність мінеральних компонентів у складі етаполану зумовлена структуруванням цього ЕПС у процесі його біосинтезу катіонами, що містяться в середовищі культивування продуцента [1]. Реологічні властивості розчинів етаполану, що визначають його практичну значущість (здатність до емульгування, підвищення в'язкості за присутності одно- і двовалентних катіонів у разі зниження рН, за низьких швидкостей зсуву, у системі Ca^{2+} -гліцин), залежить від співвідношення у його складі ацильованих і неацильованих компонентів, а також від співвідношення жирних кислот в ацильованому полісахариді [1].

Слід зазначити, що сукупність таких реологічних властивостей не характерна для жодного з відомих мікробних полісахаридів.

Окрім того, для синтезу етаполану може бути використаний широкий набір вуглецевих субстратів (у тому числі й неуглеводних), тимчасом як інші відомі полісахариди одержують тільки на основі вуглеводної сировини.

Здатність до синтезу ЕПС виявлено у багатьох мікроорганізмів, проте рівень синтезу цих полімерів коливається в широких межах як для різних продуцентів ЕПС, так і для одного продуцента в різних умовах його культивування. Створення високоефективних технологій одержання практично важливих метаболітів базується на цілеспрямованій регуляції процесу біосинтезу, що у свою чергу потребує глибоких знань фізіології, біохімії та генетики продуцентів.

Відомо, що в послідовності метаболічних реакцій, пов'язаних з утворенням ключових інтермедіатів, існують лімітувальні реакції, швидкість яких нижча від інших або які супроводжуються великою витратою енергії чи втратою вуглецю субстрату. Виявлення таких сайтів метаболічного лімітування та розроблення на основі знань принципів регуляції метаболізму дасть змогу реалізувати біотехнологічні процеси з найвищою ефективністю.

Мета роботи полягала у визначенні шляхів регуляції різних ланок метаболізму у процесі вирощування штамів *Acinetobacter* sp. В-7005 і В-7005 (1НГ) на C_2 -субстратах для вдосконалення процесу біосинтезу ЕПС етаполану.

Матеріали і методи

Об'єкти досліджень. Об'єктом досліджень був штам *Acinetobacter* sp. — продуцент комплексного екзополісахаридного препарату етаполану [2], депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером В-7005, а також мутантний штам *Acinetobacter* sp. В-7005 (1НГ), що не утворює ЕПС, який було одержано з вихідного за допомогою нітрозогуанідинового мутагенезу [3].

Культивування *Acinetobacter* sp. В-7005.

Культивування бактерій здійснювали в колбах на качалці (220 об/хв) при 30 °С, рН 6,8–7,0, упродовж 16–120 год на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л): **середовище 1:** KH_2PO_4 — 6,8; NaOH — 0,9; NaCl — 1,05; NH_4NO_3 — 0,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,4; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; **середовище 2:** KH_2PO_4 — 6,8; KOH — 1,8; KCl — 1,4; NH_4NO_3 — 0,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,4; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; **середовище 3:** KH_2PO_4 — 3,4; KOH — 0,9;

NH_4NO_3 — 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,4; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; **середовище 4:** KH_2PO_4 — 3,4; KOH — 0,9; KCl — 4,4; NH_4NO_3 — 0,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,4; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; **середовище 5:** KH_2PO_4 — 1,7; KOH — 0,45; NH_4NO_3 — 0,3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,4; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; **середовище 6:** KH_2PO_4 — 2,0; KOH — 0,55; KCl — 5,6; NH_4NO_3 — 0,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,4; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01. Середовища різнилися між собою молярністю фосфатного буфера, загальною кількістю солей, наявністю Na^+ , концентрацією одновалентних катіонів. Так, молярність буфера становила (М): середовища 1 і 2 — 0,05; 3 і 4 — 0,025; 5 і 6 — 0,0125. У середовища додатково вносили 0,5% (об'ємна частка) дріжджового автолізату та 0,006–0,009% пантотенату кальцію (вітамін B_5). Штами В-7005 і В-7005 (1НГ) є ауксотрофами за цим вітаміном [2,3], який є попередником коензиму А. Джерелом вуглецю та енергії слугував етанол у концентрації 1% (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (16–24 год), вирощену на мінеральних середовищах 1÷6 із різними джерелами вуглецю. Джерелом вуглецю та енергії у процесі одержання посівного матеріалу і біосинтезу ЕПС були: а) 0,5% етанолу (об'ємна частка); б) 1% етанолу (об'ємна частка) за наявності або відсутності ацетату калію (0,1% або 0,01%); в) 1,6% ацетату калію. Кількість посівного матеріалу становила 5% від об'єму середовища.

Ензиматичні аналізи. Визначення активності ферментів здійснювали в безклітинних екстрактах. Одержання безклітинних екстрактів проводили як описано в роботі [4].

Ключові ферменти C_2 -метаболізму та гліоксилатного циклу. Активність алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.1.1), ацетальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.3 і КФ 1.2.1.4), ацетил-КоА-синтетази (КФ 6.2.1.1), ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1) та малатсинтази (КФ 4.1.3.2) визначали як описано в роботі [4].

Ферменти циклу трикарбонових кислот. Активність цитратсинтази (КФ 4.1.3.7) аналізували за зниженням концентрації ацетилфосфату у присутності коензиму А та оксалоацетату, як описано в роботі [5]. Активність аконітатгідратази (КФ 4.2.1.3) [6] встановлювали в присутності *цис*-аконітату за відновленням НАДФ⁺ при 340 нм. Активність ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.41) [7], малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37) [8]

визначали за відновленням НАД⁺, а ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.42) [5], малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.82) [9] — за відновленням НАДФ⁺ при 340 нм у присутності ізоцитрату чи малату, відповідно. Активність 2-оксоглутаратдегідрогенази (КФ 1.2.4.2) [10] встановлювали за відновленням НАД⁺ при 340 нм у присутності 2-оксоглутарату та коензиму А, сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.99.1) [6] — за відновленням дихлорфеноліндофенолу в присутності феназинметасульфату при 600 нм, фумарази (КФ 4.2.1.2) — за утворенням фумарату з малату при 250 нм [5].

Активність ключових ферментів глюконеогенезу та деяких біосинтетичних шляхів. Активність фосфоенолпіруватсинтетази (КФ 2.7.9.2) [11] аналізували колориметрично за зниженням концентрації пірувату в реакційній суміші (реакція з динітрофенілгідразинном) при 445 нм [11], фосфоенолпіруваткарбоксікінази (КФ 4.1.1.49) [12], оксалоацетатдекарбоксілази (КФ 4.1.1.3) [6] — за утворенням фосфоенолпірувату (ФЕП) та пірувату при окисненні НАДН, а глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.4) [13] — за утворенням глутамату при окисненні НАДФН і 340 нм. Активність глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2) [14] встановлювали за відновленням НАД⁺ при 340 нм у присутності 2-оксоглутарату.

Активність ферментів у безклітинних екстрактах визначали при температурі 28–30 °С, що є оптимальною для росту даних бактерій, та виражали у нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка. Вміст білка в безклітинних екстрактах установлювали за Bradford [15].

Визначення швидкості окиснення субстратів (етанолу, ацетальдегіду й ацетату) інтактними клітинами *Acinetobacter* sp. B-7005 та B-7005 (1НГ) проводили як описано в роботі [4].

Встановлення складу і фізико-хімічних властивостей етаполану. Комплексний полісахаридний препарат етаполан виділяли з культуральної рідини осадженням ізопропанолом після попереднього відокремлення клітин продуцента та діалізу [1]. Розділення етаполану на ацильований і неацильований компоненти здійснювали за розробленим раніше методом [16]. Для дезацильовання проводили оброблення ЕПС NaOH у присутності NaBH₄. Вміст вуглеводів в ЕПС визначали колориметричним методом за реакцією з фенолом і сірчаною кислотою [17], піровиноградної кислоти — за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразинном [18], уронових кислот — за реакцією з карбазолом [19], жирних кис-

лот — ваговим методом після дезацильовання розчинів ЕПС [16]. Встановлення вмісту мінеральних компонентів у складі етаполану здійснювали, обробляючи його катіонітом КУ-2-8 (Н⁺). Вміст нейтральних моносахаридів визначали за допомогою вуглеводного аналізатора Biotronik LC-2000 [1], а молекулярно-масовий склад ЕПС — методом аналітичного градієнтного центрифугування в розчині хлористого натрію [20]. Як стандарти молекулярних мас використовували декстрини фірми Fluka із молекулярною масою 13,5; 20; 40; 70; 110; 500 тис. і 2 млн. Вміст вуглеводів в отриманих після центрифугування фракціях (об'єм 1 мл) встановлювали за реакцією з фенолом і сірчаною кислотою.

Вміст компонентів певної молекулярної маси обчислювали, визначаючи кількість вуглеводів у відповідних фракціях, і виражали в процентах до вихідної (загальної) кількості вуглеводів. Знаючи процентний вміст у складі ЕПС компонентів різної молекулярної маси, розраховували середню молекулярну масу.

Властивості розчинів етаполану оцінювали за відносною зміною їхньої в'язкості у присутності 0,1 М KCl, рН 4–4,5 (за умови переведення ЕПС в Н⁺-форму), у системі Cu²⁺-гліцин. Відносну зміну в'язкості визначали за формулою:

$$\frac{\eta_1 - \eta_0}{\eta_0} \cdot 100\%,$$

де η_1 — в'язкість розчину ЕПС у досліджуваних умовах; η_2 — в'язкість розчину ЕПС у дистильованій воді.

Результати та обговорення

Вивчення особливостей С₂-метаболізму під час росту штамів *Acinetobacter* sp. B-7005 та B-7005 (1НГ) на етанолі показало, що окиснення етанолу до ацетальдегіду каталізується НАД⁺-залежною алкогольдегідрогеназою. Акцепторами електронів в ацетальдегіддегідрогеназній реакції є НАД⁺ і НАДФ⁺. З'ясовано, що в *Acinetobacter* sp. ацетат залучається до метаболізму за участю ацетил-КоА-синтетази; анаплеротичною послідовністю реакцій, що поповнюють пул С₄-дикарбонових кислот, є гліоксилатний цикл [21].

Подальші дослідження було спрямовано на визначення активності ферментів циклу трикарбонових кислот (ЦТК) та деяких біосинтетичних шляхів [22]. У безклітинному екстракті *Acinetobacter* sp. B-7005 і B-7005 (1НГ) виявлено високу активність усіх

ферментів цього циклу (табл. 1). На нашу думку, наявність обох ключових ферментів гліоксилатного циклу, а також висока активність ізоцитратдегідрогенази, глутаматдегідрогенази і низька активність 2-оксоглутаратдегідрогенази є підтвердженням того, що ЦТК в *Acinetobacter* sp. B-7005 і B-7005 (1НГ) під час росту на етанолі виконує переважно біосинтетичну роль.

У процесі асиміляції мікроорганізмами дво- або тривуглецевих субстратів або субстратів, катаболізм яких здійснюється через ацетил-КоА чи інтермедіати ЦТК, виникає необхідність синтезу молекул вуглеводів. Ці перетворення відбуваються шляхом гліоконеогенезу. Ензиматичні дослідження показали, що під час росту на етанолі в *Acinetobacter* sp. B-7005 і B-7005 (1НГ) піруват утворюється з оксалоацетату в оксалоацетатдекарбоксілазній реакції, а в утворенні фосфоенолпірувату беруть участь обидва ключові ферменти гліоконеогенезу — ФЕП-карбоксікіназа і ФЕП-синтаза (табл. 1).

Таблиця 1. Активність ферментів циклу трикарбонових кислот та деяких біосинтетичних шляхів у *Acinetobacter* sp. B-7005 та B-7005 (1НГ)

Фермент	Активність, нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка	
	B-7005	B-7005 (1НГ)
Цитратсинтаза	421,3±25,1	405,6±21,6
Аконітаза	340,8±18,0	349,0±19,4
НАД ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа	0	0
НАДФ ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа	729,7±38,5	717,8±33,8
2-Оксоглутаратдегідрогеназа	96,2±4,8	93,4±5,3
Сукцинатдегідрогеназа	183,4±13,9	197,5±15,8
Фумараза	192,1±9,6	186,8±9,9
НАД ⁺ -залежна малатдегідрогеназа	654,2±32,7	643,1±32,1
НАДФ ⁺ -залежна малатдегідрогеназа	81,9±5,1	79,8±4,3
НАД ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа	653,9±33,5	642,6±31,8
НАДФ ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа	247,3±15,6	257,2±16,3
Оксалоацетатдекарбоксілаза	457,3±28,6	446,6±23,3
Фосфоенолпіруваткарбоксікіназа	58,5±2,9	48,7±3,5
Фосфоенолпіруватсинтаза	584,4±32,9	487,0±35,4

Аналіз активності ключових ферментів метаболізму етанолу у процесі культивування *Acinetobacter* sp. B-7005 на середовищах 1 і 2 показав, що активність ацетил-КоА-синтетази в безклітинному екстракті була в 2,7–5 разів нижчою, ніж активність алкоголь- і ацетальдегіддегідрогеназ (табл. 2). Досліджуючи швидкість окиснення С₂-субстратів інтактними клітинами *Acinetobacter* sp. B-7005 (1НГ), вирощеними на середовищах 1 та 2, встановили, що після голодування клітин упродовж 20 год швидкість дихання за присутності етанолу й ацетальдегіду не змінювалась і становила 152,6–157,8 та 153,5–159,4 нмоль О₂·хв⁻¹·мг⁻¹ клітин відповідно, а за присутності ацетату знижувалась у 2 і 4 рази на середовищі 2 і середовищі 1, відповідно, порівняно зі швидкістю окиснення ацетату клітинами, що не голодували.

Таблиця 2. Активність ключових ферментів метаболізму етанолу в процесі культивування *Acinetobacter* sp. B-7005

Ферменти	Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка) під час культивування бактерій	
	24 год	48 год
НАД ⁺ -залежна алкогольдегідрогеназа	365,7±19,6	289,5±17,5
НАД ⁺ -залежна ацетальдегіддегідрогеназа	119,5±7,6	93,7±6,5
НАДФ ⁺ -залежна ацетальдегіддегідрогеназа	253,7±15,7	197,3±11,3
Ацетил-КоА-синтетаза	135,7±8,7 (74,5±5,2)	134,1±8,7
Ізоцитратліаза	130,0±7,8 (50,5±2,9)	144,9±9,4 (7,4±0,4)
Малатсинтаза	58,2±3,7	67,4±3,7

Примітки: 1. Культивування бактерій здійснювали на середовищі 1 з 0,0006% В₅.
2. Для визначення активності ацетил-КоА-синтетази, ізоцитратліази і малатсинтази бактерії вирощували на середовищі 2 з 0,0009 % В₅. У дужках наведено дані культивування штаму на середовищі 1 з 0,0006 % В₅.

Отже, під час росту на етанолі в клітинах *Acinetobacter* sp. B-7005 і B-7005 (1НГ) ацетат утворюється з вищою швидкістю, ніж залучається до метаболізму. Тому наші наступні дослідження були спрямовані на пошук чинників, що забезпечують однакову швидкість утворення і подальшого метаболізму ацетату в клітинах бактерій у процесі культивування на етанолі.

У результаті ензиматичних і полярографічних досліджень встановлено, що інгібі-

торами ацетил-КоА-синтетази є іони натрію, а також продукти окиснення етанолу й ацетальдегіду — НАДН і НАДФН; активаторами ферменту є катіони калію і магнію [23].

Виходячи з отриманих результатів ми припустили, що одним із можливих шляхів регуляції метаболізму ацетату в клітинах штамів В-7005 і В-7005 (ІНГ) під час росту на етанолі може бути вилучення Na^+ із середовища культивування і підвищення в ньому концентрації K^+ і Mg^{2+} . Для усунення інгібувального впливу інтермедіатів окиснення етанолу й ацетальдегіду на активність ацетил-КоА-синтетази було знижено початкову концентрацію етанолу в середовищі з подальшим додаванням його частинами у процесі культивування бактерій. Показано, що в разі зниження у два рази концентрації етанолу (до 0,5 %) спостерігалось підвищення швидкості дихання клітин за присутності ацетату, причому її величина практично не відрізнялася від швидкості окиснення етанолу й ацетальдегіду. Окрім того, швидкість окиснення ацетату істотно не змінювалась у процесі тривалого голодування клітин. Слід зазначити, що за початкової концентрації етанолу 0,5 % у середовищі вміст пантотенату кальцію можна було знизити до 0,0006 %, при цьому не було потреби підвищувати концентрацію Mg^{2+} .

У табл. 3 наведено активність ключових ферментів метаболізму етанолу у штаму *Acinetobacter* sp. В-7005, вирощеному за різних умов культивування. Встановлено, що зі зниженням початкової концентрації етанолу в середовищі, за відсутності сполук натрію і наявності 100 мМ K^+ активність ацетил-КоА-синтетази підвищувалася більш ніж у два рази. За таких умов стала можливою реалізація процесу біосинтезу етаполану на незабуферених середовищах 4 і 6 (0,025–0,125 М). Отримання аналогічного результату при початковій концентрації етанолу 1,0% забезпечувало підвищення вмісту вітаміну B_5 в середовищі до 0,0009 %, концентрації Mg^{2+} — до 5 мМ і катіонів калію — до 100 мМ.

Таким чином, у результаті досліджень регуляції активності ацетил-КоА-синтетази нам вдалось істотно знизити молярність буфера зі збереженням вмісту солей у середовищі культивування, що тільки частково усувало лімітування C_2 -метаболізму у продуцента етаполану.

Відомо, що ацетил-КоА-синтетаза є індукцибельним ферментом, індуктором якого є ацетат [24]. У зв'язку із цим ми припустили, що можна повністю зняти лімітування C_2 -метаболізму внесенням екзогенного аце-

тату в середовище з етанолом або використувуючи посівний матеріал, вирощений на ацетаті чи етанолі у присутності ацетату. Встановлено, що додавання екзогенного ацетату під час одержання інокуляту і біосинтезу ЕПС дало змогу збільшити у 2,5–3 рази активність ацетил-КоА-синтетази та швидкість дихання за присутності ацетату і реалізувати процес синтезу етаполану на незабуферених середовищах 3 і 5, в яких загальний вміст солей було знижено у 2 і 4 рази (до 5,1–2,95 г/л) [25].

Умови культивування продуцента впливають не тільки на синтез ЕПС, а й на фізико-хімічні властивості кінцевого продукту [26]. У різних умовах культивування можуть змінюватися хімічний склад ЕПС, їхня молекулярна маса, співвідношення декількох полісахаридів, що впливає на реологічні властивості ЕПС, які визначають практичну значущість цих полімерів. Раніше було з'ясовано, що необхідною умовою для синтезу ацильованого полісахариду є наявність у середовищі культивування продуцента етаполану 100 мМ K^+ [1]. Встановлено, що тільки етаполан з високим вмістом ацильованого компонента (>50%) характеризувався сукупністю реологічних властивостей, необхідних для практичного використання. Оскільки вміст K^+ у середовищах 3 і 5 становить 40 та 20 мМ відповідно, на наступному етапі досліджували реологічні властивості синтезованого за таких умов етаполану. Згідно з попередніми даними такої концентрації K^+ недостатньо для синтезу ацильованого ЕПС з необхідними реологічними властивостями.

Результати дослідження, що їх наведено в табл. 4, свідчать, що ЕПС, синтезовані на середовищах з різним вмістом K^+ , мають практично однакові реологічні характеристики. Отже, культивування продуцента на незабуференому середовищі з низьким вмістом солей (і катіонів калію) не впливало на властивості синтезованого етаполану. Для з'ясування причин, що зумовлюють це явище, ми детальніше дослідили хімічний склад одержаних полісахаридів.

Встановлено, що незалежно від умов культивування продуцента (вміст мінеральних компонентів, співвідношення С/Н і молярність буфера в середовищі культивування) нативні ЕПС характеризувалися практично однаковим вмістом вуглеводів (44,5–46,7%) та піровиноградної кислоти (3,2–3,7%) (табл. 5). Співвідношення глюкози, манози, галактози та рамнози у складі всіх ЕПС було однаковим і становило 3:2:1:1.

Таблиця 3. Вплив умов культивування *Acinetobacter* sp. B-7005 на активність ключових ферментів метаболізму етанолу

Умови культивування			Активність, нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка			
концентрація В ₅ , %	концентрація Mg ²⁺ , мМ	початкова концентрація етанолу, %	НАД ⁺ -залежна алкоголь-дегідрогеназа	НАД ⁺ +НАДФ ⁻ -залежна альдегіддегідрогеназа	ацетил-КоА-синтетаза	ізоцитратліаза
0,0006	1,6	1,0	354,8±17,7	367,3±21,2	95,0±5,6	98,4±6,3
0,0009	1,6	1,0	349,9±22,9	356,7±24,4	130,9±7,6	130,0±7,9
0,0009	5,0	1,0	359,6±17,9	349,7±24,0	180,9±9,6	185,4±11,8
0,0009	1,6	0,5	265,9±16,1	277,9±15,4	219,8±11,0	225,4±13,8
0,0006	1,6	0,5	279,4±13,9	285,7±19,0	225,3±15,2	230,7±15,5

Примітка. Культивування бактерій здійснювали на середовищі 2 (у середовищі відсутні сполуки Na⁺, вміст K⁺ — 100 мМ).

Таблиця 4. Реологічні властивості 0,03% -х розчинів етаполану, синтезованого за різних умов культивування

Середовище	Концентрація K ⁺ у середовищі, мМ	Відносне збільшення в'язкості, %	
		за присутності 0,1 М KCl	у системі Cu ²⁺ -гліцин
2	100	325,7±21,0	1400,3±78,0
3	40	480,3±35,2	1865,0±93,2
5	20	315,6±18,8	1700,5±100,5

Примітка. Концентрація етанолу 1 %; у середовища 3 і 5 додатково вносили 0,1 % ацетату калію для одержання інокуляту і біосинтезу ЕПС.

Таблиця 5. Хімічний склад нативного і дезацильованого етаполану, синтезованого на середовищах різного складу

Компонентний склад ЕПС	ЕПС	Вміст складових компонентів (%) в ЕПС, синтезованих на середовищах			
		1	2	3	5
Вуглеводи	нативний	44,5	45,0	46,7	45,9
	після дезацильовання	60,0	59,1	58,6	55,7
Піровиноградна кислота	нативний	3,3	3,7	3,4	3,2
	після дезацильовання	4,8	4,4	4,7	4,8
Уронові кислоти	нативний	7,5	7,7	11,4	13,8
	після дезацильовання	20,0	22,0	20,6	—
Жирні кислоти	нативний	6,5	6,8	8,8	5,9
	після дезацильовання	0	0	0	0
Мінеральні компоненти	нативний	24,3	28,6	7,2	6,2
	після дезацильовання	3,5	3,9	—	—

Примітки: 1. Концентрація етанолу 1 %; у середовище 5 додатково вносили 0,1% ацетату калію для одержання інокуляту і біосинтезу ЕПС.

2. « - » — не визначали.

3. Дезацильований ЕПС одержано в результаті лужного оброблення нативного препарату.

Проте полісахариди різнилися за кількістю уронових (7,5–13,8 %), жирних (5,9–8,8%) кислот, мінеральних компонентів (6,2–28,6 %), а також за вмістом ацильованого компонента (70–100 %). Ми припускаємо, що зниження вмісту мінеральних компонентів у складі етаполану, синтезованого на

середовищах 3 і 5, зумовлено зменшенням кількості одновалентних катіонів (зокрема катіонів калію) у цих середовищах. Так, раніше нами було встановлено, що у процесі культивування продуцента етаполану відбувається структурування синтезованих ЕПС катіонами, що містяться у живильному середовищі [1].

Після дезацильовання нативних ЕПС вміст уронових кислот збільшувався у 2–3 рази і становив 20–22 % для всіх досліджуваних полісахаридів (табл. 5). У попередніх роботах було з'ясовано, що реальний вміст уронових кислот у складі нативних ЕПС вдається виявити тільки після їх дезацильовання [1]. Підвищення вмісту уронових кислот у цьому разі можна пояснити тим, що під час дезацильовання відбувається дисоціація високомолекулярних конгломератів ЕПС, змінюється конформація полісахаридних молекул і просторова структура ЕПС, внаслідок чого уронові кислоти стають доступнішими для взаємодії з різними реагентами. Варто зазначити, що після дезацильовання у складі етаполану суттєво знижувався вміст мінеральних компонентів. На сьогодні причини, що зумовлюють це явище, залишаються невідомими. На з'ясування цих причин буде спрямовано наші подальші дослідження.

Дослідження молекулярної маси етаполану, синтезованого за різних умов культивування, показало, що середня молекулярна маса полісахаридів, одержаних на середовищах 3 та 5, практично не змінювалась у процесі виділення й очищення і становила 1,5 млн. (табл. 6). Це можна пояснити тим, що одержані полісахариди є високоацильованими, а в результаті ацильовання вуглеводного ланцюга формується щільна структура ЕПС, яка залишається без змін у процесі оброблення розчинів етаполану органічними розчинниками. Слід зазначити, що аналіз молекулярно-масового складу етаполану, синтезованого в різних умовах культивування, показав наявність компонентів з молекулярною масою від 13,5 тис. до 2 млн., причому основну масу препарату становили фракції з молекулярною масою понад 2 млн. У попередніх дослідженнях встановлено, що тільки високомолекулярному етаполану, у складі якого міститься не більше 35% фракцій з молекулярною масою до 2 млн., притаманні необхідні для практичного використання реологічні властивості [1].

Дослідження реологічних властивостей ЕПС показало, що розчини етаполану, синтезованого на середовищі 5 з 20 мМ K^+ , на всіх етапах його виділення й очищення характеризувалися вищою в'язкістю у присутності 0,1 М KCl і в системі Cu^{2+} –гліцин (1 200 та 1 500–2 000% відповідно) порівняно з ЕПС, синтезованими на середовищі зі 100 мМ K^+ (1 000 та 800–1 000% відповідно).

Таблиця 6. Молекулярна маса етаполану, синтезованого за різних умов культивування

Середовище	Випарений концентрат ЕПС		ЕПС після осадження і висушування	
	середня молекулярна маса, млн.	фракції з молекулярною масою до 2 млн., %	середня молекулярна маса, млн.	фракції з молекулярною масою до 2 млн., %
1	1,44	31,7±2,19	0,48	82,7±4,89
2	1,44	29,9±1,92	0,50	71,2±3,56
3	1,61	23,7±1,59	1,54	25,7±1,80
5	1,57	25,4±1,27	1,48	27,8±1,39

Примітка. Концентрація етанолу 1 %; у середовищі 5 додатково вносили 0,1% ацетату калію для одержання інокуляту і біосинтезу ЕПС.

Таким чином, на основі досліджень особливостей метаболізму у штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 і В-7005 (1НГ) визначено шляхи регуляції C_2 -метаболізму, що уможливило вдосконалення технології біосинтезу етаполану на етанолі. Ключовими елементами цієї технології є: відсутність у середовищі культивування катіонів натрію, підвищення в ньому концентрації пантотенату кальцію до 0,0009%, а також наявність 0,1% ацетату калію під час одержання інокуляту і біосинтезу полісахариду. Це дало змогу здійснити без зниження показників синтезу процес одержання етаполану на незабуференому середовищі, в якому вміст солей зменшено в 4 рази (з 11 до 2,95 г/л). За умов усунення лімітування C_2 -метаболізму молекулярна маса етаполану становила 1,5 млн. і не знижувалась у процесі його виділення й очищення, а вміст жирних кислот в ацильованому полісахариді досягав 15%. Підвищений вміст жирних кислот у складі етаполану і висока молекулярна маса зумовлюють поліпшення реологічних властивостей, що визначають практичну цінність цього полісахариду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т. П. Принципы регуляции состава и физико-химических свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp.: Дисс. ... докт. биол. наук: 03.00.20. — К., 1999. — 450 с.
2. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Малашенко Ю. Р., Пинчук Г. Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C₁-C₂-соединениях. — К.: Наук. думка, 1992. — 212 с.
3. Пирог Т. П., Столяр С. М., Малашенко Ю. Р. Получение и исследование мутантных штаммов *Acinetobacter* sp., не образующих экзополисахариды // Микробиология. — 2000. — Т. 60, № 5. — С. 674–680.
4. Пирог Т. П., Кузьминська Ю. В., Коваленко М. О. Метаболізм C₂-C₆-субстратів в умовах міксотрофного росту штамів *Acinetobacter* sp. В-7005 та В-7005 (1НГ) // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 1. — С. 33–38.
5. O'Brien R. W., Stern J. R. Requirement for sodium in the anaerobic growth of *Aerobacter aerogenes* on citrate // J. Bacteriol. — 1969. — V. 98, N2. — P. 388–393.
6. O'Brien R. W., Geisler J. Citrate metabolism in *Aerobacter cloacae* // Ibid. — 1974. — V. 119, N3. — P. 661–665.
7. Kornberg A. Isocitric dehydrogenase of yeast (DPN) // Methods in enzymology (Ed. Colowick S.P. and Kaplan N.O.). — New York: Acad. Press, 1955. — V. 1. — P. 707–709.
8. Kitto G.B. Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenase from chicken and tuna heart // Methods in enzymology (Ed. Lowenstein J.M.). — New York and London: Acad. Press, 1969. — V. 13. — P. 106–116.
9. Johnson H. S., Hatch M. D. Properties and regulation of leaf nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-malate dehydrogenase and «malic» enzyme in plants with the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis // Biochem. J. — 1970. — V. 119, N2. — P. 273–280.
10. Mukherjee B. B., Matthews J., Horney D. L., Reed L.J. Resolution and reconstitution of the *Escherichia coli* -ketoglutarate dehydrogenase complex // J. Biol. Chem. — 1965. — V. 240, N5. — P. 2268–2269.
11. Cooper R. A., Cornberg H. L. Phosphoenolpyruvate synthetase // Methods in enzymology (Ed. Lowenstein J.M.). — New York: Acad. Press, 1969. — V. 13. — P. 309–314.
12. Huei-Che Chang, Lane M. D. The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. II. Purification and properties of liver mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase // J. Biol. Chem. — 1966. — V. 241, N10. — P. 2413–2420.
13. Martinez-Bilbao M., Martinez A., Urkijo I. et al. Induction, isolation and some properties of the NADPH-dependent glutamate dehydrogenase from the nonheterocystous cyanobacterium *Phormidium laminosum* // J. Bacteriol. — 1988. — V. 170, N10. — P. 4897–4902.
14. Nakamura I., Ohmura Y., Kamihara T. Effect of thiamin-induced vitamin B₆ deficiency on NAD- and NADP-linked glutamate dehydrogenases in Yeast // J. Gen. Microbiol. — 1983. — V. 129, №4. — P. 945–952.
15. Bredford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72, N3. — P. 248–254.
16. Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Пинчук Г. Э. и др. Разделение экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp., на ацилированный и неацилированный компоненты // Микробиология. — 1994. — Т. 63, № 5. — С. 840–846.
17. Dubois M., Gilles K., Hamilton J. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. — 1956. — V. 28, N3. — P. 350–356.
18. Sloneker J. N., Orentas D. G. Pyruvic acid — a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide // Nature. — 1962. — V. 194, N4827. — P. 478–479.
19. Dische Z. A new specific color reaction of hexuronic acids // J. Biol. Chem. — 1947. — V. 167, N1. — P. 189–198.
20. Votselko S. K., Pirog T. P., Malashenko Y. R., Grinberg T. A. A method for determining the mass-molecular composition of microbial exopolysaccharides // Microbiol. Methods. — 1993. — V. 18. — P. 349–356.
21. 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. — 2002. — Т. 71, № 2. — С. 222–229.
22. Пирог Т. П., Кузьминская Ю. В. Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter* sp, растущего на этаноле // Там же. — 2003. — Т. 72, № 4. — С. 459–465.
23. Пирог Т. П., Кузьминская Ю. В. Регуляция метаболизма ацетата у штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // Прикл. биохим. и микробиол. — 2003. — Т. 39, №2. — С. 180–188.
24. Kumari S., Beatty C. M., Browning D. F. et al. Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 2000. — V. 182, N15. — P. 4173–4179.
25. Пирог Т. П., Корж Ю. В. Влияние ацетата на синтез экзополисахарида этаполана при культивировании *Acinetobacter* sp. В-7005 на среде с этанолом // Микробиол. журн. — 2006. — Т. 68, № 5. — С. 12–19.
26. Пирог Т. П., Кузьминська Ю. В. Вплив умов культивування мікроорганізмів-продуктивів екзополісахаридів на їхній синтез та фізико-хімічні властивості // Біополімери і клітина. — 2003. — Т. 19, № 5. — С. 393–413.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ BIOTECHНОЛОГИИ МИКРОБНОГО ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА НА ЭТАНОЛЕ

Т. П. Пирог, Ю. В. Корж

Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного
НАН Украины, КиевE-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Определены особенности энергетического и конструктивного метаболизма C₂-субстратов у *Acinetobacter* sp. B-7005 — продуцента экзополисахарида этаполана, выявлены сайты метаболического лимитирования и разработаны подходы к их устранению.

Показано, что «узким» местом метаболизма этанола в *Acinetobacter* sp. B-7005 является ассимиляция ацетата: реакция, катализируемая ацетил-КоА-синтетазой, — скоростью лимитирующая. Установлены условия культивирования бактерий, позволяющие устранить лимитирование C₂-метаболизма и повысить в три раза активность ацетил-КоА-синтетазы.

В таких условиях синтезируется высокоацилированный этаполан со степенью ацилирования 3–15%. Средняя молекулярная масса полисахарида составляет 1,5 млн. и не изменяется в процессе выделения и очистки препарата. Повышенное содержание жирных кислот и молекулярная масса этаполана обуславливают улучшение реологических свойств его растворов, определяющих практическую ценность этого полисахарида.

Ключевые слова: экзополисахариды, биосинтез, метаболизм этанола, регуляция C₂-метаболизма, физико-химические свойства.

IMPROVEMENT OF BIOTECHNOLOGY OF MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDE ETHAPOLAN ON ETHANOL

T. P. Pirog, Ju. V. Korzh

Zabolotny Institute of Microbiology
and Virology of National Academy of Science
of Ukraine, KievE-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

The study is devoted to investigating of the basic stages of C₂-compounds assimilation in *Acinetobacter* sp. B-7005, to reveal «bottleneck» of C₂-metabolism and to develop of approaches to their removal to improve process of microbial exopolysaccharide ethapolan synthesis.

Limitation of ethanol metabolism in *Acinetobacter* sp. B-7005 by the rate of acetate assimilation in a reaction catalyzed by acetyl-CoA-synthetase, was shown. Basing on the investigations of C₂-metabolism regulation the cultivation conditions were developed which allowed to increase the acetyl-CoA-synthetase activity in *Acinetobacter* sp. B-7005.

Ethapolan synthesized under these conditions was characterized by high level of acylation (3–15%). Molecular mass of this polysaccharide was 1,5 million and was not changed during purification. Improved reological properties of ethapolan were associated with high molecular mass and increasing fatty acids content.

Key words: exopolysaccharides, biosynthesis, metabolism of ethanol, regulation of C₂-metabolism, physical and chemical properties.