

ЭКЗОПОЛИСАХАРИД АЛЬГИНАТНОГО ТИПА *PAENIBACILLUS EHIMENSIS* 739

© 2011 Г.Г. Худайгулов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев

Институт биологии Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 27.05.2011

Рассмотрены условия биосинтеза, характеристики и свойства экзогенного биополимера, продуцируемого бактерией *Paenibacillus ehimensis* 739.

Ключевые слова: экзополисахарид, альгинат, *Paenibacillus*

Известно свойство микроорганизмов продуцировать экзогенные полимеры при культивировании на средах, где в качестве субстрата выступает углевод при $C \gg N$ [1]. Такие бактериальные экзополисахариды (ЭПС), как ксантан, курдлан, декстран производят в промышленных масштабах, спектр применения их очень широк от загустителей в пищевой промышленности, до плазмозаменителей крови в медицине и компонентов буровых растворов при нефтедобыче [1].

Целью данной работы было исследование свойств экзополисахарида бактерий *Paenibacillus ehimensis* 739, который находится на патентном депонировании во Всероссийской коллекции микроорганизмов (регистрационный номер ВКМ В-2680D).

При скрининге музейных культур Института биологии УНЦ РАН на способность накапливать ЭПС при ферментации на среде Федорова с сахарозой культуральная жидкость (КЖ) данного штамма приобретала максимально вязкую консистенцию.

В ходе эксперимента наилучшие результаты были получены на среде с мелассой (табл. 1). Кинематическую вязкость оценивали с помощью капиллярных вискозиметров Оствальда.

Таблица 1. Влияние источника углерода на вязкость КЖ

Источник углерода	Вязкость культуральной жидкости, сСт
Глюкоза	48,34
Сахароза	67,56
Мальтоза	50,72
Крахмал	53,12
Меласса	765,45
Этанол	34,23

Дальнейшую оптимизацию состава среды и параметров культивирования проводили при помощи полного факторного эксперимента четвертого порядка (ПФЭ⁴) [2], где в качестве параметров варьирования были выбраны количество мелассы, аэра-

ция, температура и продолжительность культивирования (табл. 2). Результаты оптимизации представлены в таблице 3.

Максимальную вязкость культуральной жидкости наблюдали в варианте 12 ПФЭ⁴, которая составила более 30 000 сСт. Следует отметить, что условиям максимальной вязкости соответствуют – субоптимальный температурный режим, высокая степень аэрации и высокое содержание углевода в среде при низкой концентрации азота [1]. В данном случае бактерии получают азот из компонентов мелассы. На вязкость культуральной жидкости влияло количество углевода в питательной среде, при концентрации сахарозы в мелассе ниже 30% (масс.), вязкость культуральной жидкости была незначительной на уровне 40-50 сСт.

Экзополисахарид из культуральной жидкости выделяли путем осаждения холодным (-18°C) изопропиловым спиртом, для очистки данную процедуру проводили до 5 раз.

Для оценки молекулярной массы полученного ЭПС использовали метод гель-фильтрации на колонке TSK G4000SW (300x7,8 мм, “Тоyo Soda”, Япония) при элюировании 0,15 М хлоридом натрия с расходом 1 мл/мин. В качестве стандартов использовали декстраны. Время элюирования экзополисахаридов из колонки соответствовало 350 кДа. Далее для исследования мономерного состава был проведен гидролиз экзополисахарида (1% раствор ЭПС, 7% HCl, 3 ч.) с последующей нейтрализацией. Качественный анализ проводили на колонке Silasorb-NH₂ (290x7,5 мм) откалиброванной по углеводам, детектор рефрактометр, элюент ацетонитрил: вода = 75:25, расход 0,2 мл/мин. В процессе элюирования не удалось добиться разделения смеси, кроме того, наблюдалось значительное удержание сорбентом колонки компонентов гидролизата – это свидетельствовало о присутствии в ЭПС моно(олиго)меров с кислотными свойствами которые взаимодействовали с привитыми основными группировками сорбента.

Функциональные группы определяли методом ИК-спектроскопии на спектрофотометре Specord M 80 (Carl Zeiss, Германия) в области 600-4000 см⁻¹ (в пленке толщиной 15-20 μ). В ИК-спектре полисахарида присутствовали характерные полосы поглощения ацетильных групп 1250, 1730 см⁻¹, полосы поглощения валентных колебаний пиранозного кольца гулурановой кислоты (G) 787 и 1290 см⁻¹, и

Худайгулов Гайсар Гараевич, e-mail: gaisar-1986@mail.ru; Логинов Олег Николаевич, докт. биол. наук, проф., e-mail: biolab316@yandex.ru; Мелентьев Александр Иванович, докт. биол. наук, проф., e-mail: mlnt@anrb.ru

полосы поглощения валентных колебаний пиранозного кольца маннуриновой кислоты (M) 808 и 1320 см⁻¹, что дает основания для предположения об альгинатной структуре полисахарида (табл. 4).

Из соотношения интенсивностей колебаний маннуриновой и гулуриновой кислот определено соотношение M/G – 0,32 [3].

Таблица 2. Факторы варьирования

Компонент	Фактор	Средний уровень «0»	Нижний уровень «->»	Верхний уровень «+»	Единица варьирования
Меласса, г/л	X ₁	20	10	30	10
Аэрация, об/мин	X ₂	180	160	200	20
Температура, °C	X ₃	30	25	35	5
Время культивирования, ч	X ₄	120	72	168	48

Таблица 3. Варианты и результаты ПФЭ⁴

Вариант	Содержание мелассы, г/л	Аэрация, об/мин	Температура, °C	Продолжительность культивирования, ч	Вязкость, сСт
1	10	160	25	72	40,02
2	30	160	25	72	50,93
3	10	200	25	72	33,95
4	30	200	25	72	274,05
5	10	160	35	72	20,61
6	30	160	35	72	4,85
7	10	200	35	72	7,28
8	30	200	35	72	20,61
9	10	160	25	168	126,11
10	30	160	25	168	55,78
11	10	200	25	168	297,09
12	30	200	25	168	> 30 000
13	10	160	35	168	14,55
14	30	160	35	168	27,89
15	10	200	35	168	18,19
16	30	200	35	168	13,34
17	20	180	30	120	765,39

Таблица 4. Полосы поглощения экзополисахарида в ИК-области

Полосы поглощения в ИК – области, см ⁻¹	3400	-ОН -CH ₃ -COCH ₃ -COO- Колебания маннуриновой кислоты (M-блоки) Колебания гулуриновой кислоты (G-блоки)
	2800-2900 1730, 1250 1607-1620 1320, 808 1290, 787	

Для косвенной оценки преобладания тех или иных мономерных блоков был применен метод поляриметрии, т.к. гулуриновая кислота является правовращающим изомером, маннуриновая левовращающим и в зависимости от относительной длины блоков экзополисахарид будет проявлять те или

иные оптические свойства [3]. Для ЭПС продуцируемого *Paenibacillus ehimensis* 739 величина угла вращения равна +25,2, что говорит о преобладании гулуриновых блоков в полимерной цепи.

При исследовании ЭПС бактерий *Paenibacillus ehimensis* 739 методом ЯМР ¹H и ¹³C спектроскопии

были получены спектры, содержащие сигналы характерные для альгинатов [4]. Результаты приведены в таблицах 5-6.

Исследование влияния солей на вязкость 0,1% раствора ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739 проводили с применением 1% растворов NaCl, CaCl₂, FeCl₃, NH₄NO₃, Na₂SO₄, MnSO₄, (NH₄)₂SO₄, KNO₃, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ и H₂C₂O₄. Результаты приведе-

ны на рис. 1. Как видно из рис. 1, значительное увеличение вязкости вызывали сульфаты и фосфаты, максимальные показатели вязкости наблюдались NaSO₄ и NaH₂PO₄. Хлорид железа (III) вызывал коагуляцию ЭПС, что объясняется выраженными кислотными свойствами этой соли.

Таблица 5. Характерные химические сдвиги спектра ЯМР ¹H ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739

Кислота	Химические сдвиги, м.д.				
	H1	H2	H3	H4	H5
D- маннуроновая кислота	4,79	4,74	4,69	4,72	4,67
L- гулуруновая кислота	4,84	4,72	4,74	4,76	4,82

Таблица 6. Характерные химические сдвиги спектра ЯМР ¹³C ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739

Кислота	Химические сдвиги, м.д.				
	C1	C2	C3	C4	C5
D-маннуроновая кислота	105,82	70,84	71,31	78,70	77,56
L-гулуруновая кислота	106,51	65,72	68,83	82,61	68,83

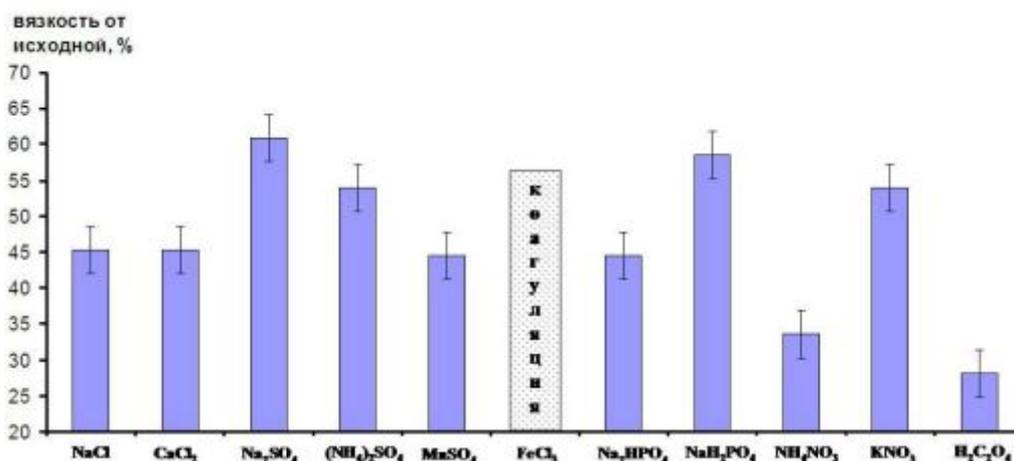


Рис. 1. Влияние солей на вязкость раствора ЭПС.

Кислотность растворителя также влияла на вязкостные характеристики. В интервале рН 2-12 наибольшая вязкость наблюдалась при рН равном от 7-

8 смещение в кислую или щелочную сторону от этого интервала вызывала снижение вязкости (рис. 2).

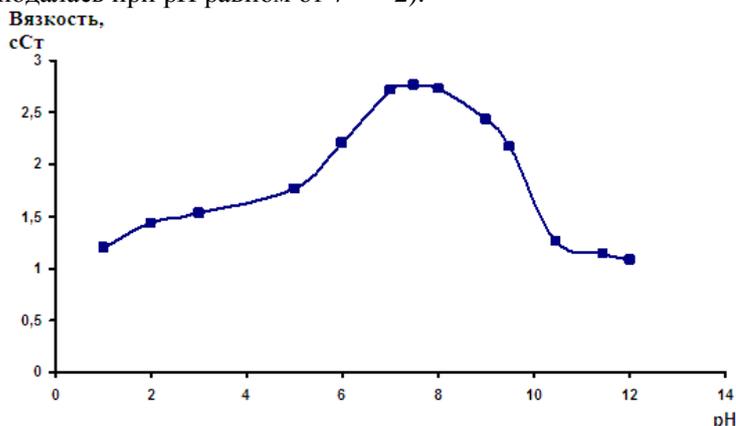


Рис. 2. Влияние кислотности среды на вязкость раствора ЭПС.

Таким образом, по совокупности свойств можно сказать, что исследуемый экзополисахарид представляет собой линейный полимер альгинатного типа с преобладанием гулурановой кислоты, которая обуславливает его уникальные свойства – высокую склонность к гелеобразованию, полиэлектролитную природу взаимодействий в растворах и способность воздействовать на реологические свойства водных систем при малых концентрациях. Данный экзогенный биополимер может найти широкое применение в областях легкой, пищевой и нефтедобывающей промышленности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Anita S.K., Kalpana M., Bhavanath J. Bacterial exopolysaccharides – a perception // J. Basic Microbiology. 2007. № 47. P. 103-117.
2. Непусов А.И. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
3. Усов А.И. Успехи химии // 1999. Т. 68. № 11. С. 1051-1061.
4. Amanullah A., Serranocarreon L., Castro B. et al. The influence of impeller type in pilot scale xanthan fermentations // Biotechnol. Bioengineer. 1998. № 57. P. 95-108.

ALGINATE OF *PAENIBACILLUS EHIMENSIS* 739

© 2011 G.G. Khudaygulov, O.N. Loginov, A.I. Melent'iev

Institute of Biology, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

In the article are considered conditions of production, features and characteristics of exopolysaccharide produced by *Paenibacillus ehimensis* 739.

Key words: exopolysaccharide, alginate, *Paenibacillus*.