

# ЭКЗОПОЛИСАХАРИД ОБЛИГАТНОЙ МЕТИЛОТРОФНОЙ БАКТЕРИИ *Methylophilus quaylei*: ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА И ИЗУЧЕНИЕ УГЛЕВОДНОГО И ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА

С.А.М. Отман, аспирант, А.Б. Пшеничникова, доцент,

В.И. Швец, заведующий кафедрой

кафедра Биотехнологии и бионанотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: a\_pshenichnikova@mail.ru

**О**птимизирован состав среды культивирования *Methylophilus quaylei* для повышения продукции экзополисахарида (отношение C/N, концентрации фосфатов и хлорида кальция). Отработаны условия выделения, определены углеводный и фракционный состав экзополисахарида *M. quaylei*.

The optimal composition of *Methylophilus quaylei* culture medium for the exopolysaccharide production increasing were selected (the ratio C/N, the concentration of phosphate and calcium chloride). Worked out conditions for the isolation, defined carbohydrate and fractional composition of exopolysaccharide *M. quaylei*.

**Ключевые слова:** бактериальные экзополисахариды, метилотрофные бактерии, состав питательной среды, углеводный и фракционный состав.

**Key words:** methylotrophic bacteria, bacterial exopolysaccharides, culture fluid composition, carbohydrate and fractional composition.

## Введение

Бактериальные экзополисахариды (ЭПС) являются важнейшими продуктами промышленной биотехнологии, востребованность которых в пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве определяется уникальными физико-химическими свойствами, такими как высокая вязкость растворов, способность к гелеобразованию, псевдопластичность, тиксотропность [1, 2]. Метилотрофные бактерии, утилизирующие непищевые доступные C1-соединения в качестве источника углерода и энергии, имеют определенные преимущества как продуценты экзополисахаридов [3–5]. Производство метанола не зависит от сезонных изменений, что выгодно отличает его от сырья сельскохозяйственного происхождения. Активными продуцентами ЭПС из метанола являются облигатные метилотрофы *Methylophilus methylotrophus*, *M. viscosus* и факультативные – *Pseudomonas polysaccharogenes* и *P. viscigena*, выход полисахарида у которых достигает 40–45% на утилизированный субстрат [6–10].

Поиск новых продуцентов ЭПС – метилотрофных бактерий остается актуальным и продолжается во многих лабораториях мира. К настоящему времени среди экзополисахаридов метилотрофных бактерий найдены представители практически всех известных типов – линейные, разветвленные, гомо- и гетерополисахариды, нейтральные, кислые и аминокислоты [11, 12]. Большинство из них – кислые гетерополисахариды, содержащие наряду с нейтральными компонентами уроновые кислоты и остатки пировиноградной кислоты, присоединенные в виде кеталей к остаткам нейтральных моносахаридов [11]. Остатки уроновых кислот, пировиноградной кислоты и аминокислот сообщают полисахаридам определенный заряд, придающий им специфические свойства полиэлектролитов. Облигатная ме-

тилотрофная бактерия *Methylophilus quaylei*, выделенная и охарактеризованная нами ранее [13], продуцирует в культуральную жидкость вязкий экзополисахарид, биосинтез и физико-химические свойства которого практически не изучены. Целью данной работы явилась оптимизация условий биотехнологического получения и выделения экзополисахарида *M. quaylei*, а также изучение его углеводного и фракционного состава.

## Результаты и их обсуждение

Облигатная метилотрофная бактерия *M. quaylei* продуцирует экзополисахарид, выход которого составляет 3.97 г ЭПС/г метанола в оптимальных для роста условиях – при pH 7 и 28°C [14]. Нами было изучено влияние состава питательной среды на продукцию ЭПС методом математического планирования. Варьируемые параметры выбирали из условия наибольшей чувствительности культуры к их изменению. Определяющими выход ЭПС бактерий является отношение концентраций источников углерода и азота, а также концентрации фосфатов и солей кальция [15–17]. Таким образом, варьировали концентрацию фосфатов, хлорида кальция и соотношение концентраций источников углерода и азота – метанола и нитрата натрия (C/N). Интервалы варьирования параметров выбирали таким образом, чтобы значения параметров были как меньше, так и больше значений, оптимальных для роста бактерии. Выбирали время культивирования, соответствующее стационарной фазе роста – 48 ч. В качестве откликов использовали: а)  $Y_1$  – оценку концентрации биомассы по оптической плотности культуры, при длине волны 600 нм; б)  $Y_2$  – оценку концентрации экзополисахарида, определяемой фенол-сернокислотным методом – по оптической плотности при длине волны 490 нм [18]. Ошибку эксперимента рассчитывали для каждой серии и использовали полученное значение

для оценки значимости коэффициентов регрессионных уравнений [19, 20]. Интервалы варьирования

параметров культивирования представлены в табл. 1.

Таблица 1. Интервалы варьирования параметров культивирования *M. quaylei*.

| Соотношение C/N<br>X <sub>1</sub> |     |                                                 | [CaCl <sub>2</sub> ]<br>X <sub>2</sub> | [Фосфаты]<br>X <sub>3</sub> |                                                                                  |
|-----------------------------------|-----|-------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| +                                 | 4:1 | 2% CH <sub>3</sub> OH, 0.5% NaNO <sub>3</sub>   | 0.03 г/л                               | 4.5 г/л                     | 3 г/л K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>1.5 г/л KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| –                                 | 1:1 | 0.5% CH <sub>3</sub> OH, 0.5% NaNO <sub>3</sub> | 0.01 г/л                               | 1.5 г/л                     | 1 г/л K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>0.5 г/л KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |

Для нахождения регрессионного уравнения использовали матрицу полного факторного эксперимента для трех факторов [21, 22] (табл. 2).

Таблица 2. Матрица полного факторного эксперимента для трех факторов.

| № | X <sub>0</sub> | X <sub>1</sub> | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> | X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> | X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> | Y <sub>1</sub> ,<br>(D <sub>600</sub> ) | Y <sub>2</sub> ,<br>(D <sub>490</sub> ) | C <sub>ВБ</sub> <sup>*</sup> ,<br>г/л | C <sub>ЭПС</sub> <sup>**</sup> ,<br>г/л | Y <sub>3</sub> ,<br>ЭПС/ВБ |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|
| 1 | +              | +              | +              | +              | +                             | +                             | +                             | +                                            | 2.367                                   | 12.096                                  | 13.49                                 | 1.80                                    | 0.13                       |
| 2 | +              | –              | +              | +              | –                             | –                             | +                             | –                                            | 2.394                                   | 13.422                                  | 13.65                                 | 1.99                                    | 0.15                       |
| 3 | +              | +              | –              | +              | –                             | +                             | –                             | –                                            | 2.760                                   | 10.056                                  | 15.76                                 | 1.49                                    | 0.09                       |
| 4 | +              | –              | –              | +              | +                             | –                             | –                             | +                                            | 2.397                                   | 11.076                                  | 13.66                                 | 1.65                                    | 0.12                       |
| 5 | +              | +              | +              | –              | +                             | –                             | –                             | –                                            | 2.919                                   | 9.210                                   | 16.68                                 | 1.37                                    | 0.08                       |
| 6 | +              | –              | +              | –              | –                             | +                             | –                             | +                                            | 2.646                                   | 12.444                                  | 15.11                                 | 1.85                                    | 0.12                       |
| 7 | +              | +              | –              | –              | –                             | –                             | +                             | +                                            | 2.415                                   | 11.586                                  | 13.77                                 | 1.72                                    | 0.12                       |
| 8 | +              | –              | –              | –              | +                             | +                             | +                             | –                                            | 2.556                                   | 12.474                                  | 14.58                                 | 1.85                                    | 0.13                       |

\* C<sub>ВБ</sub> – концентрация высушенной биомассы (ВБ) в культуральной жидкости (КЖ).

\*\* C<sub>ЭПС</sub> – концентрация ЭПС в КЖ.

Коэффициенты регрессионного уравнения находили по формуле:

$$b_i = \sum_i (Z_i \cdot C_i) / N$$

где Z<sub>i</sub> – знак «+» или «–», N – число опытов (в данном случае 8).

Были получены следующие регрессионные уравнения:

а) для ВБ:

$$C_{ВБ} = 14.59 + 0.34 \cdot X_1 + 0.15 \cdot X_2 - 0.45 \cdot X_3 + 0.02 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0.15 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0.72 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0.58 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3$$

б) для ЭПС:

$$C_{ЭПС} = 1.72 - 0.12 \cdot X_1 + 0.04 \cdot X_2 + 0.02 \cdot X_3 - 0.05 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0.03 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0.125 \cdot X_2 \cdot X_3 + 0.04 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3.$$

Была проведена проверка значимости коэффициентов регрессии [19–22]. Значимыми коэффициентами в регрессионном уравнении для ЭПС, в связи с условием  $|b_i| > 0.074$ , являются  $b_{13} = -0.12$  и  $b_{2,3} = 0.125$ . Проверка показала, что уравнения адекватны. Анализ полученного регрессионного уравнения позволяет сделать следующий вывод: наибольшее влияние на конечную концентрацию экзополисахарида оказывает соотношение C/N и совместное влияние хлорида кальция и фосфатов. На основании полученного регрессионного уравнения проводили оптимизацию питательной среды по направлению градиента для биосинтеза ЭПС. Для этого проводили крутое восхождение, изменяя значения коэффициентов  $b_2$  и  $b_3$ , предполагая линейную зависимость отклика от факторов X<sub>2</sub> и X<sub>3</sub> (табл. 3).

Оптимальными для биосинтеза ЭПС (2.88 г ЭПС/л) концентрациями источников кальция и фосфора оказались: 0.0287 г/л CaCl<sub>2</sub> и 4.31 г/л фосфатов калия.

Для получения ЭПС бактерии культивировали в питательной среде, состав которой был определен методом математического планиро-

вания эксперимента. Клетки продуцента отделяли от бесклеточной культуральной жидкости (БКЖ) центрифугированием. ЭПС осаждали ацетоном (или 2-пропанолом). Выпавшие белые хлопья полисахаридов отделяли центрифугированием. Очистку ЭПС от гидрофобных примесей (жирных кислот и липидов, присутствующих в культуральной жидкости *M. quaylei* [23]) проводили методом непрерывной экстракции диэтиловым эфиром. Обработка ЭПС в условиях дезацелирования (щелочного гидролиза) показала, что он не содержит остатков жирных кислот C<sub>12</sub>–C<sub>20</sub>.

Реологические свойства ЭПС и их способность формировать гели зависят от молекулярной массы полимера и соотношения углеводных мономеров. Углеводный состав ЭПС определяли после его полного кислотного гидролиза в растворе 2 М трифторуксусной кислоты (ТФУ) при 100°C с последующим ацелированием [24, 25]. Методом хромато-масс-спектрометрии было показано, что в составе углеводов ЭПС *M. quaylei* присутствуют остатки D-глюкозы (время удерживания 18.68 мин), L-рамнозы (время удерживания 16.55 мин) и D-галактозы

(время удерживания 18.59 мин) в соотношении 5:2:1 (рис. 1). Для идентификации соединений по их масс-спектрам использовали банк данных и программное обеспечение фирмы Hewlett Packard.

Таблица 3. Оптимизация состава питательной среды культивирования *M. quaylei* с целью направленного биосинтеза ЭПС

| № | [CaCl <sub>2</sub> ], г/л | [Фосфаты], г/л | C <sub>ЭПС</sub> , г/л |
|---|---------------------------|----------------|------------------------|
| 1 | 0.0300                    | 4.50           | 1.54                   |
| 2 | 0.0313                    | 4.69           | 1.65                   |
| 3 | 0.0326                    | 4.88           | 2.04                   |
| 4 | 0.0339                    | 5.07           | 1.71                   |
| 5 | 0.0342                    | 5.26           | 1.95                   |
| 6 | 0.0287                    | 4.31           | 2.88                   |
| 7 | 0.0274                    | 4.12           | 1.73                   |
| 8 | 0.0261                    | 3.93           | 1.65                   |

Молекулярную массу ЭПС определяли методом гель-фильтрации. Продуцируемый бактерией *M. quaylei* полисахарид выходит с колонки в виде трех фракций: основной (70%), ограниченной значениями молекулярных масс от  $6.8 \times 10^5$  до  $7.9 \times 10^7$  г/моль, высокомолекулярной (13%) с молекулярной массой  $2.6 \times 10^8$  г/моль и низкомолекулярной (17%) с молекулярной массой  $<40\,000$  г/моль (рис. 2).

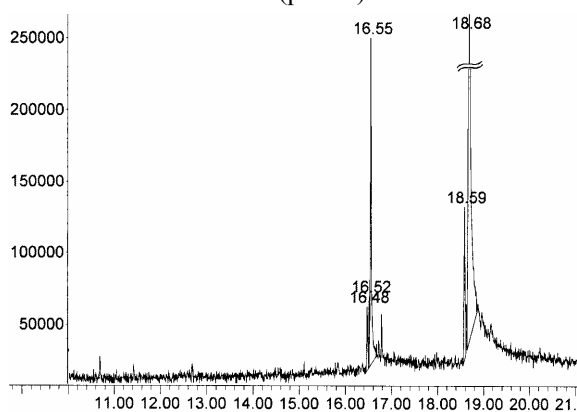


Рис. 1. Хромато-масс-спектрометрический анализ ацетилизованного гидролизата ЭПС *M. quaylei*. Капиллярная колонка HP-1, США (50 м×0.32 мм×1.05 мкм), температура инжектора 250°C, газ-носитель – гелий, 1 мл/мин. Программирование температуры термостата: 80°C – изотерма 1 мин, линейный рост 10°C/мин до 290°C.

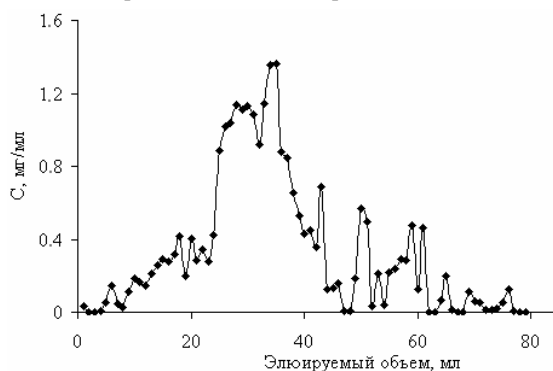


Рис. 2. Гель-хроматограмма ЭПС *M. quaylei* на колонке TOYOPEARL HW-65 (Япония) (600×20 мм) при элюировании 0.15 М хлоридом натрия.

### Экспериментальная часть

В работе использовали облигатную метилотрофную бактерию *Methylophilus quaylei* (штамм MT B-2338<sup>T</sup> (ВКМ)), выделенную нами из утилизирующей метанол смешанной культуры [11]. Для культивирования метилотрофных бактерий использовали минеральную среду, содержащую 1% об. метанола [26]. Для получения плотных питательных сред добавляли 1.5% агара («Becton Dickinson», США). Стерилизацию сред проводили в стерилизаторе ST 174-11 (Венгрия) и в стерилизаторе паровом ГК-10-1 («Медико», Тюмень, РФ). Для приготовления питательных сред использовали реактивы отечественного производства (х.ч.). Органические растворители предварительно перегоняли.

Бактерии выращивали в колбах объемом 250 мл (100 мл среды) на шейкере («Labline», США) и на термостатируемом шейкере лаб-ПУ-01 (РФ) при 100 об./мин и 28°C. В качестве инокулята использовали 28-часовую культуру в экспоненциальной фазе роста в количестве 2.5% об. Оптическую плотность КЖ измеряли на спектрофотометре («Beckman DU-7», США), при  $\lambda$  600 нм, в кювете  $l = 10$  мм. Для получения БКЖ биомассу отделяли на центрифуге ОПН-8УХЛ4.2 («ПОЛИКОМ», Россия) при 10 000 g, 20 мин. Концентрацию экзополисахарида определяли фенолсернокислотным методом [18].

ЭПС из БКЖ осаждали ацетоном в соотношении 1:2 по объему, перемешивали и оставляли на холоду на 12 ч. Осадок ЭПС отделяли центрифугированием (5000 об./мин, 20 мин), промывали ацетоном и высушивали под вакуумом водоструйного насоса, затем лиофилизовали (лиофильная сушка VirTis BenchTop «2K» («VirTis», Канада).

Очистку ЭПС от примесей органической природы проводили экстракцией диэтиловым эфиром в течение 48 ч, используя экстрактор Сокслета.

Для обработки ЭПС в условиях щелочного гидролиза к 0.15%-ной водной суспензии ЭПС (302.1 мг) добавляли боргидрид натрия (30.2 мг, 0.8 ммоль) и гидроксид натрия (1.5 мг, 0.04 ммоль), перемешивали 48 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь нейтрализовали соляной кислотой до pH 4, экстрагировали гексаном.

Гидролиз ЭПС осуществляли в 2 н. растворе ТФУ 8 ч при 100°C. ТФУ удаляли под вакуумом. Для получения перацетатов растирали гидролизат ЭПС (200 мг) с свежепрокаленным ацетатом натрия (100 мг), добавляли 2 мл уксусного ангидрида и выдерживали 2 ч при 100°C. Затем реакционную массу переносили в ледяную воду (8 мл), интенсивно перемешивали 2 ч, осадок отделяли центрифугированием (7000 об./мин, 10 мин), промывали водой и высушивали.

Хромато-масс-спектры были получены на газовом хроматографе 6890N «Agilent Technologies» (США), масс-детекторе 5973N «Agilent Technologies» (США), с колонкой HP-1

(США) (длина 50 м, диаметр 0.32 мм, толщина слоя неподвижной фазы 1.05 мкм).

Молекулярную массу ЭПС определяли методом гель-фильтрации. В качестве стандартов использовали декстраны: М10000 («FLUKA Chemie AG»), М40000 («Ferak», Германия), Blue М2000000 («Sigma», США). КЖ упаривали до объема 20–30 мл и наносили на колонку. Отби-

рали фракции по 1 мл. Обнаружение углеводов в элюате проводили фенол-сернокислотным методом [18].

Работа поддержана грантом № 3.1.1/9247 АБЦП «Развитие научного потенциала высшей школы».

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Bacterial polysaccharides: Current innovations and future trends / Ed. by M. Ullrich. – Bremen: School of Engineering and Science, Jacobs University Bremen, Germany, 2009. 358 p.
2. Cheng K.C., Demirci A., Catchmark J.M. Evaluation of medium composition and fermentation parameters on pullulan production by *Aureobasidium pullulans* // Food Sci. Technol. Int. 2011. V. 17. № 2. P. 99–109.
3. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии. – Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325 с.
4. Гринберг Т.А., Косенко Л.В., Малащенко Ю.Р. Образование экзополисахаридов метило-трофными микроорганизмами // Микробиол. журн. 1984. Т. 45. № 3. С. 22–26.
5. Гринберг Т.А., Дерябин В.В., Старухина Л.А., Малащенко Ю.Р. Экзополисахариды метилотрофных бактерий // Микробиол. журн. 1987. Т. 49. № 2. С. 101–112.
6. Takayama T., Endo F., Nozawa T., Masuda Y., Mori M., Kanayama T. Process for producing a polysaccharide using *Pseudomonas polysaccharogenes* M-30: pat. 4230800 US. – № 05/920142; заявл. 29.06.1978; опубл. 28.10.1980.
7. Misaki A., Tsuburaya Y., Kakuta M. D-Allose-containing polysaccharide synthesized from methanol by *Pseudomonas* species // Carbohydrate Res. 1979. V. 75. P. 8–10.
8. Rees D.A., Morris E.R., Thom D., Madden J.K. Shapes and interaction of carbohydrate chains. The polysaccharides / Ed. G.O. Aspinall. – London: Acad. Press, 1982. V. 1. P. 196–291.
9. Southgate G., Goodwin P.M. The regulation of exopolysaccharide production and of enzyme involved in C<sub>1</sub> metabolism in *Methylophilus methylotrophus* // J. Gen. Microbiol. 1989. V. 135. P. 2859–2867.
10. Доронина Н.В., Троценко Ю.А. *Methylobacillus viscigenes* – новый вид облигатнометило-трофных бактерий, образующих экзополисахарид // Микробиология. 1991. Т. 60. № 5. С. 908–914.
11. Davis E.N., Wallen L.L. Viscous product from activated sludge by methanol fermentation // Appl. Environ. Microbiol. 1976. V. 32. № 2. P. 303–305.
12. Kanamaru K., Iwamuro Y., Mdcami Y., Obi Y., Kasaki T. O-Methyl-D-rhamnose in an extra-cellular polysaccharide from *Hyphomicrobium* sp. // Agr. Biol. Chem. 1982. V. 46. № 10. P. 2419–2424.
13. Doronina N., Ivanova E., Trotsenko Y., Pshenichnikova A., Kalinina E., Shvets V. *Methylophilus quaylei* sp. nov., a new aerobic obligately methylotrophic bacterium // System. Appl. Microbiol. 2005. V. 28. P. 303–309.
14. Нево А.Н.С., Пшеничникова А.Б., Складнев Д.А., Швеиц В.И. Влияние дейтерометанола и оксида дейтерия на ростовые характеристики и биосинтез экзополисахарида облигатными метило-трофными бактериями *Methylophilus* sp. B-7741 // Биотехнология. 2003. № 6. С. 38–46.
15. Jonathan S.G., Fasidi I.O. Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atrombonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom // Food Chem. 2001. V. 22. P. 479–483.
16. Delavechia C., Hampp E., Fabra A., Castro S. Influence of pH and calcium on the growth, poly-saccharide production and symbiotic association of *Sinorhizobium meliloti* SEMIA 116 with alfalfa roots // Biol. Fertil. Soils. 2003. V. 38. P. 110–114.
17. Dilworth M.J., Rynne F.G., Castelli J.M., Vivas-Marfisi A.I., Glenn A.R. Survival and exopoly-saccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH // Microbiology. 1999. V. 145. № 7. P. 1585–1593.
18. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances // Analyt. Chem. 1983. V. 28. P. 350–356.
19. Дерффель К. Статистика в аналитической химии. Пер. с нем. – М.: Мир, 1994. 272 с.
20. Вознесенский В.А. Статистические методы планирования эксперимента в технико-экономических исследованиях. – М.: Статистика, 1981. 215 с.
21. Вучков И., Бояджиева Л., Солаков Е. Прикладной линейный регрессионный анализ. – М.: Статистика, 1987. 346 с.
22. Демиденко Е.З. Оптимизация и регрессия. – М.: Наука, 1989. 187 с.
23. Терехова Е.А., Степичева Н.А., Пшеничникова А.Б., Швеиц В.И. Метилловый эфир стеариновой кислоты – новый внеклеточный метаболит облигатной метилотрофной бактерии *Methylophilus quaylei* // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 2. С. 180–186.
24. Слонекер Дж. Газожидкостная хроматография ацетатов альдитов / В кн.: Методы исследования углеводов. / Пер. с англ. под ред. А.Я. Хорлина. – М.: Мир, 1975. С. 22–25.
25. Костенко В.Г. Хроматографический анализ сахаров, получаемых в процессе переработки растительного сырья. – М.: ОНТИТЭИмикробиопром, 1984. 56 с.
26. Нево А.Н.С., Пшеничникова А.Б., Складнев Д.А., Швеиц В.И. Оксид дейтерия как стрессовый фактор у метилотрофных бактерий *Methylophilus* sp. B-7741 // Микробиология. 2004. Т. 73. № 2. С. 1–5.