

Изобретение относится к биотехнологии и касается получения штамма бактерий, продуцирующего высоковязкие экзополисахариды (ЭПС) многофункционального назначения, которые могут быть использованы в качестве стабилизаторов дисперсных систем, а также загустителей и эмульгаторов в нефтедобывающей, парфюмерной, химической, горнодобывающей, пищевой промышленности.

Известны бактериальные культуры-продуценты ЭПС: *Xanthomonas campestris* 8162 [11 NRLL B-12075, NRLL B-12074 [2], ATCC 31601 [3], *Pseudomonas elodea* ATCC 31461 [4], *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 [5] и др.

Недостатком этих продуцентов является фитопатогенность *X.campestris*, патогенность *Ps.aeruginosa*, большая естественная изменчивость штаммов, диссоциация их на муконидные и немуконидные формы, что влечет за собой нестабильность выхода и качества синтезируемых ЭПС.

Кроме того, каждый из ЭПС, синтезируемых указанными продуцентами, характеризуется определенными физико-химическими свойствами, ограничивающими возможность их практического использования

Известен штамм *Acinetobacter* sp. ЦМПМ В-3243 [6, прототип], синтезируемый ЭПС, в состав которого входят глюкоза, галактоза, манноза и рамноза (3 : 1 : 2 : 1), пировиноградная и жирные кислоты. Наличие жирных кислот в составе ЭПС обуславливает совокупность уникальных свойств их растворов: способность к структурированию в присутствии одно- и двухвалентных катионов, повышению вязкости при низких значениях pH, низких скоростях сдвига, в системе Cu^{2+} -глицин.

Задача настоящего изобретения - новый штамм бактерий - продуцент ЭПС, характеризующихся свойствами, превосходящими свойства растворов ЭПС согласно прототипу и расширяющими возможность их практического применения.

Штамм бактерий *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 (лабораторный номер 12SR), устойчивый к стрептомицину (1000мкг/мл) и рифампицину (100мкг/мл).

Штамм *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 был получен из исходного штамма *Acinetobacter* sp. ЦМПМ В-3243 (6, прототип) в два этапа. На первом этапе осуществляли прямой ступенчатый отбор вариантов, устойчивых к стрептомицину (1 - 500мкг/мл), на втором - из стрептомицинустойчивого штамма аналогично получали варианты, устойчивые к рифампицину (1 - 100мкг/мл). Получение мутантов осуществляли на агаризованной суслевой среде.

Штамм депонирован в Коллекции микроорганизмов ИМВ НАН Украины под номером В-7005.

Штамм *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 характеризуется следующими культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками.

Культурально-морфологические признаки.

Клетки *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 представляют собой в логарифмической фазе роста толстые короткие палочки, в стационарной - кокковидные, расположенные парами, реже - в коротких цепочках. Размеры клеток 0,95 - 1,5 × 1,2 - 2,0мкм. Спор не образуют. Размножение клеток осуществляется путем бинарного деления. Клетки грамотрицательные, неподвижные.

Электронно-микроскопические исследования подтвердили отсутствие органов движения и позволили выявить тяжи экзополисахаридов вокруг клеток. Клеточная стенка в срезах имеет грамотрицательный тип строения. Органеллы, вакуоли отсутствуют.

Особенности роста на агаризованных средах.

При росте на сусло-агаре образует выпуклые блестящие слизистые колонии кремового цвета с ровными краями, поверхность колоний гладкая, консистенция - слизистая, тягучая, при снятии с агара вся колония тянется за петлей. Диаметр колонии 4 - 8мм.

Особенности роста на жидкой среде.

При росте на жидкой минеральной среде с этанолом, глюкозой, фруктозой в качестве источника углеродного питания образует высоковязкую суспензию кремово-белого цвета.

Физиолого-биохимические признаки.

Аэроб. Каталазоположительный, оксидазоотрицательный, кислотонеустойчивый. Температурный диапазон роста 10 - 42°C. Оптимальная температура роста 24 - 30°C, pH 5,5 - 8,0. Оптимум 6,5 - 7,5.

Желатин не разжижает.

Крахмал не гидролизует.

Молоко не сбраживает.

Нитраты не восстанавливает.

Сероводород, индол и ацетон не образует.

Отношение к источникам углерода.

Ассимилирует сахарозу, глюкозу, фруктозу, маннозу, целлюлозу, ксилозу, галактозу, арабинозу, этанол, маннит, уксуснокислый натрий, янтарнокислый натрий, пируват, малат, фумарат. При росте на глюкозе закисляет среду.

Отношение к источникам азота.

В качестве источника азотного питания использует соли аммония, нитраты, нитриты, мочевины, пептон. Растет на безазотистой среде Эшби.

Олигокарбонитрофил.

Отношение к факторам роста.

Нуждается в дополнительных факторах роста - дрожжевом автолизате и пантотеновой кислоте.

Сведения о патогенности.

Непатогенен для теплокровных животных и человека, нетоксичен.

Условия хранения.

Периодический пересев проводят один раз в месяц на скошенную агаризованную суслевую среду с последующим выращиванием при 30°C в течение 2 - 3 суток. Хранят при +4°C.

Состав среды и условия получения посевного материала.

Состав среды, мас. %:

KH_2PO_4	0,68;
NaOH	0,0896;
NaCl	0,105;
NH_4NO_3	0,06;
MgSO_4	0,019;

CaCl_2	0,00075;
-----------------	----------

FeSO_4	0,0006;
-----------------	---------

Пантотенат

кальция	0,0003;
---------	---------

Дрожжевой автолизат 0,5% (объемных);

Этанол 1,0% (объемный)

Остальное вода (до 1 л).

Культивирование проводят в колбах на качалке

(220об/мин) при 30°C. Продолжительность инкубации 24 - 36 часов. В качестве инокулята используют двухсуточную культуру, выращенную на скошенном сусло-агаре.

Культивирование *Acinetobacter* sp. для получения экзополисахаридов осуществляют в ферментере АК-210 (рабочий объем 5л) или БИОР (рабочий объем 150л) при температуре 28 - 30°C в условиях аэрации и перемешивания при концентрации растворенного кислорода 20 - 40%. рН среды 6,5 - 7,5, предпочтительнее 7,0, продолжительность культивирования 24 - 48 часов. Состав среды тот же, что и для получения посевной культуры. Количество этанола - 1,5% (объемных). Количество посевного материала - 3 - 5% от объема питательной среды.

Количество синтезируемых ЭПС к концу процесса культивирования составляет 3 - 4г/л, концентрация биомассы - 1,8 - 2,5г/л.

Физико-химические свойства (подвижная фаза):

А (по прототипу)

$$6 \times 10^5 - 2 \times 10^5$$

Молекулярная

глюкоза, галактоза, манноза, рамноза (3:1:2:1), пировиноградная кислота, жирные кислоты

Вязкость 0,1% растворов (сСт. 20°C):

рН 7,0 - 4,20
рН 2,6 - 60,44

в 0,1 М КСl - 14,76

Пример 1. Химический состав ЭПС. Культивирование *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 осуществляли в условиях, описанных выше. Культуральную жидкость, содержащую ЭПС, диализовали против дистиллированной воды в течение 7 суток, разбавляли дистиллированной водой в 2 - 3 раза, центрифугировали для отделения клеток (12000об/мин, 40мин). Супернатант концентрировали в вакууме (50°C) до первоначального объема, после чего осаждали ЭПС добавлением 1,5 объемов изопропанола. Осадок ЭПС промывали в чистом изопропанол и высушивали при комнатной температуре.

Для определения нейтральных моносахаридов и уроновых кислот, входящих в состав ЭПС *Acinetobacter* sp., образцы гидролизуют в запаянных ампулах с 2N трифторуксусной кислотой в течение 2,5 часов при 121°C. Содержание нейтральных моносахаридов и уроновых кислот определяли с помощью углеводного анализатора "Biotronik LC-2000" (колонка 0,38 × 12,5см, смола Dionex Ax8-11) в 0,5M Na-боратном буфере (рН 8,0) при 60°C и 0,04M фосфатном буфере (рН 2,4) при 70°C соответственно, детектировали при 570нм после реакции с 2,2'-бицинхонином меди.

Для определения липидов, входящих в состав ЭПС *Acinetobacter* sp. проводили щелочную обработку растворов ЭПС.

Для щелочного гидролиза ЭПС, приводящего к отщеплению липидного компонента, к 0,15% растворам ЭПС добавляли боргидрид натрия и твердый NaOH из расчета 10мг и 500мг соответственно на 100мг ЭПС, выдерживали при периодическом перемешивании в течение 48 часов при комнатной температуре, после чего нейтрализовали растворы концентрированной соляной кислотой и осуществляли экстракцию липидов гексаном или хлороформом. Для удаления гексана (хлороформа) полученный экстракт упаривали на ротаторном испарителе до постоянной массы.

Липидные экстракты исследовали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках "SHufol" ("Kavalier", Чехия). Анализ проводили с использованием следующих систем растворителей

неполярная система:

1) гексан - диэтиловый эфир - уксусная кислота (90 : 10 : 1)

2) петролейный эфир - диэтиловый эфир (9 : 1)

полярная система:

1) хлороформ - метанол - уксусная кислота (90 : 10 : 6 : 1)

2) хлороформ - метанол - вода (65 : 25 : 4).

ЭПС, синтезируемый *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005, состоит из нейтральных моносахаридов - глюкозы, галактозы, маннозы и рамнозы. Кислые группы представлены остатками глюкуроновой и пировиноградной кислот. Молярное соотношение глюкозы, галактозы, маннозы, рамнозы, глюкуроновой и пировиноградной кислот составляет 3 : 1 : 2 : 1 : 1 : 1.

В составе липидного компонента обнаружены высшие жирные кислоты, высшие спирты, моно-, ди-, триглицериды. Липиды связаны с углеводной цепью ЭПС прочной химической связью: их удается обнаружить только после щелочной обработки ЭПС. Содержание липидного компонента в составе ЭПС составляет 5,0 - 6,5%.

Таким образом, состав ЭПС по предлагаемой заявке отличается от состава ЭПС согласно прототипу наличием глюкуроновой кислоты и липидного компонента.

Пример 2. Свойства растворов ЭПС оценивали по изменению вязкости растворов ЭПС в присутствии катионов, в области низких значений рН (при переводе в H^+ -форму), в системе Cu^{2+} - глицин.

Растворы ЭПС, полученные после диализа культуральной жидкости, отделения клеток и концентрирования в вакууме, разбавляли дистиллированной водой до концентрации 0,03% (по углеводам). К полученным растворам ЭПС добавляли KCl до концентрации 0,1M; для перевода растворов ЭПС в H^+ -форму проводили обработку растворов ЭПС катионитом КУ-2 - 8 (H^+) (300мг смолы на 15мл раствора ЭПС). Для изучения поведения растворов ЭПС в системе Cu^{2+} - глицин к раствору ЭПС добавляли 0,003M $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, затем 0,015M глицина; раствор нагревали до 80°C и выдерживали при этой температуре 5 минут, после чего охлаждали. Вязкость растворов ЭПС измеряли на стеклянном капиллярном вискозиметре типа "Оствальд" при температуре 20°C. 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.

Вязкость 0,03% (по углеводам) растворов ЭПС *Acinetobacter* sp. (по предлагаемой заявке и по прототипу), а также 0,1% раствора ксантана фирмы "Sigma" в исследуемых условиях представлена в табл.1.

Таким образом, *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 синтезирует ЭПС, растворы которых обладают способностью существенно повышать вязкость в присутствии катионов, при понижении pH, в системе Cu^{2+} - глицин. Относительное увеличение вязкости растворов ЭПС ИМВ В-7005 в исследуемых условиях выше по сравнению с вязкостью растворов ЭПС по прототипу. Улучшение реологических свойств растворов ЭПС ИМВ В-7005 обусловлено наличием в его составе липидного компонента. Ксантан фирмы "Sigma" не обладает свойствами, характерными для ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005.

Пример 3. Свойства растворов ЭПС *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 после щелочной обработки. Щелочную обработку ЭПС *Acinetobacter* sp., приводящую к отщеплению липидного компонента, проводили, как описано в примере 1. Для выделения ЭПС, не содержащих липидных компонентов, к растворам, полученным после экстракции липидов (пример 1) добавляли изопропанол, осадки ЭПС растворяли в дистиллированной воде, растворы диализовали против дистиллированной воды в течение 5 суток, после чего концентрировали в вакууме. Полученные растворы разбавляли дистиллированной водой до концентрации 0,03% (по углеводам) и исследовали изменение их вязкости в присутствии 0,1М KCl, H^{+} -форме, системе Cu^{2+} -глицин (табл.2).

Таким образом, растворы ЭПС, не содержащих в своем составе липидных компонентов, не структурируются катионами, не повышают вязкость при понижении pH, в системе Cu^{2+} -глицин, т.е. уникальные свойства растворов ЭПС, синтезируемых *Acinetobacter* sp., обусловлены наличием в их составе липидных компонентов.

Вязкость растворов ЭПС *Acinetobacter* sp. и ксан

ЭПС	Относительное увеличение вязкости	
	в 0,1 М KCl	в H^{+} -форме
по предлагаемой заявке	400	1500
по прототипу	250	1200
ксантан фирмы "Sigma"	0	0

Влияние щелочной обработки на вязкость растворов Э

ЭПС	Относительное увеличение вязкости	
	в 0,1 М KCl	в H^{+} -форме
до щелочной обработки	400	1500
после щелочной обработки	0	0