

УДК 581.192.7

СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО СВОЙСТВ*Е.А. Кузнецова, Г.М. Зомитева, Е.А. Кузнецова, К.А. Рыжикова, К.Д. Казакова**Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия*

Несмотря на достигнутые успехи в области биотехнологии микробных полисахаридов, число их, выпускаемое промышленностью, крайне невелико; проблема поиска новых продуцентов и экономичных способов их получения стоит по-прежнему остро.

Особого внимания с этой точки зрения заслуживают микроорганизмами, обитающие на корнях и в прикорневой зоне растений [1]. Из числа таких микроорганизмов в последние годы принято выделять группу «ризобактерий, стимулирующих рост растений» (PGPR). Важное место среди них занимают азотфиксаторы – бактерии рода *Rhizobium*, которые повсеместно распространены в корневой зоне бобовых и других растений [2].

Известно, что для бактерий рода *Rhizobium* очень важным инструментом в колонизации растения хозяина выступает выделение полисахаридной слизи, которая участвует в прикреплении бактериальной клетки к корневому волоску и запускает в клетке корня формирование нитей нодуляции. Для такого процесса необходимо постоянное и обильное выделение экзополисахаридов [3, 4]. Вместе с тем, в литературных источниках недостаточно данных о возможности биотехнологического получения ценных экзополисахаридов ризобий.

Цель исследования – получение препарата экзополисахарида путем микробного синтеза с использованием штамма *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003 и изучение его состава и свойств.

Для выращивания бактерии был использован глубинный периодический способ культивирования в биореакторе MINIFORS 2 на модифицированной жидкой питательной среде PGYL с добавлением 10 г./л маннита и 0,1 % комплекса витаминов (В1, В6, РР, В12, С). Культивирование осуществляли в течение 7 суток при средних значениях температуры 24 °С, содержание кислорода было установлено и контролировалось в биореакторе на уровне 21 % (в условиях непрерывной аэрации), рН среды составляла 7,3. В качестве пеногасителя использовали глицерин.

При изучении динамики роста *R. leguminosarum* В-1003 и продукции экзополисахаридов было установлено, что максимальное значение вязкости наблюдается в середине логарифмической стадии развития культуры. Развитие бактерий в стационарной фазе не сопровождается накоплением экзополисахаридов, о чем свидетельствует стабильное значение кинематической вязкости среды роста в этот период. Поэтому для получения культуры с максимальным показателем кинематической вязкости время инкубации определяется 5–6 сутками.

Выделение экзополисахарида проводили следующим образом: на первом этапе провели фильтрацию культуральной жидкости, но биомасса микроорганизмов представляла собой мелко дисперсную смесь, поэтому сразу было проведено центрифугирование с помощью центрифуги BioSan LMC-4200R при 4 °С, 40 минут, 4000g. После центрифугирования отделили супернатант и внесли в него двойной объем 96 % охлажденного этилового спирта для экстракции экзополисахарида. Сосуд с раствором поместили в холодильник при температуре 3–5 °С на 24 часа. При добавлении этанола к концентрату бесклеточной культуральной жидкости *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003 сразу наблюдалось выпадение белого хлопьеобразного слизистого осадка, количество которого увеличивалось при охлаждении до 4 °С и перемешивании.

Полученный гелеобразный студенистый экзополисахарид высушивали в суховоздушном стерилизаторе ГП-40 СПУ при 37 °С. Полученная плотная сухая корочка измельчалась в порошок в фарфоровой ступке.

Полученный из среды роста *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003 препарат был изучен с целью подтверждения полисахаридной природы. Прежде всего были проведены качественные реакции. При проведении реакции Молиша, основанной на дегидратации углеводов концентрированной серной кислотой, наблюдалось красное окрашивание. Все углеводы и гликопротеины дают положительную реакцию Молиша. Следовательно, полученный препарат имеет углеводную природу. Реакция Троммера также дала положительные результаты на ОН-группы с CuSO_4 , что также говорит о наличии сахаров в исследуемом материале.

Известно, что некоторые экзополисахариды бактерий могут быть образованы из мономеров, содержащих аминогруппу (аминосахаров). Качественной реакцией на свободные аминогруппы является тест с нингидрином. При взаимодействии нингидрина со свободными аминами и аммиаком развивается темно-синее или фиолетовое окрашивание. В наших экспериментах положительная нингидриновая реакция была выявлена в пробах с выделенным полисахаридом.

Следующим этапом в процессе идентификации было исследование порошка полученного полисахарида методом ИК-спектроскопии.

Как известно, ИК-область условно делят на ближнюю в диапазоне волновых чисел 4000–12500 см⁻¹, в которой наблюдается электронные и колебательные переходы; основную и среднюю от 625 до 4000 см⁻¹, связанную в основном с колебаниями молекул; и дальнюю от 50 до 625 см⁻¹, в которой наблюдаются вращательные переходы, колебания в тяжелых молекулах, в ионных и молекулярных кристаллах, некоторые электронные переходы в твердых телах, крутильные и скелетно-деформационные колебания в сложных молекулах, например, в биополимерах.

На рисунке 1 приведены ИК-спектры полученного препарата экзополисахарида – продукта синтеза бактерии *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003.

В ИК-спектре препарата присутствуют полосы поглощения, характерные для валентных колебаний – СН₃ группы (1459 см⁻¹), для гидроксильных групп, связанных водородной связью (2361 см⁻¹), имеются свободные спиртовые группы – ОН (3856 см⁻¹). Также обнаружены полосы поглощения валентных колебаний – С-С – связей с структуре углеводородного скелета углеводов (1090 см⁻¹), колебаний кратных связей – С=С- (1637–1655 см⁻¹) и наличие полос поглощения, характерных для групп – NH₂ (3449 см⁻¹).

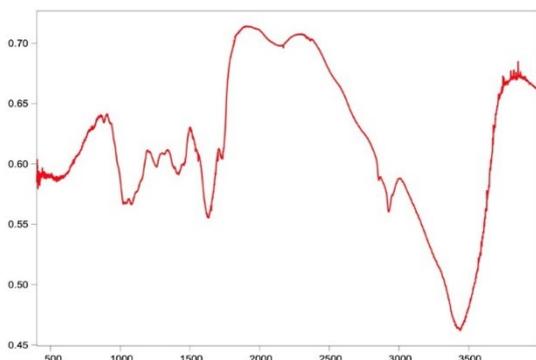


Рисунок 1 – ИК-спектры препарата экзополисахарида *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003

Проведенные исследования позволяют предположить, что полученный экзометаболит имеет углеводную природу и является экзополисахаридом.

Можно также предположить, что экзополисахарид в своем составе содержит функциональные группы, например, диаминогруппы, которые поперечными сшивками, соединены с глюкозными остатками эфирными связями.

Также был проведен кислотный гидролиз экзополисахарида *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003. Для гидролиза легкогидролизуемых полисахаридов использовали обработку 2 % раствором соляной кислоты при температуре 100 °С в течение 3 часов. В результате гидролиза получили 89,5 % редуцирующих сахаров. Таким образом, экзополисахарид бактерии *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003 является легкогидролизуемым

полисахаридом. После проведения гидролиза экзополисахарида методом тонкослойной хроматографии с использованием пластинок Силуфол определили моносахаридный состав экзополисахарида. Установлено, что в состав экзополисахарида бактерии *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003 входят глюкоза, мальтоза и ксилоза.

Таким образом, в результате культивирования ризобактерии *Rhizobium leguminosarum* ВКМ В-1003 получен и выделен экзополисахарид, в котором выявлены альдегидные группы (реакция Молиша) и свободные ОН-группы (реакция Троммера). Также обнаружено с помощью нингидриновой пробы наличие аминогрупп в полисахариде. Проведение исследований методом ИК-спектрометрии показало, что в полисахариде имеются – СН₃, – ОН, – С-С-, – С=С- и – NH₂ группы. Установлено, что полисахарид является легкогидролизуемым. Идентификация углеводов в гидролизате полисахарида методом тонкослойной хроматографии позволила выявить в качестве мономеров глюкозу, мальтозу и ксилозу.

Литература

- Феоктистова Н.В. и др. Ризосферные бактерии // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2016. – № 2. – С. 207–224.
- Frayse N, Courdec F, Poinso V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium-legume* symbiosis // European Journal of Biochemistry – 2003. – v. 270. – PP.1365–1380
- Laus M, et al. novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin // Molecular Microbiology -2006 – V.59. – PP.1704–1713
- Angus, A.A., Hirsch A.M. Biofilm Formation in the Rhizosphere: Multispecies Interactions and Implications for Plant Growth // Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere. – 2013 – V. 2. – P. 701–712