

Л. В. Куис, аспирант; Р. М. Маркевич, доцент

ВЫДЕЛЕНИЕ, ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ *BACILLUS MUCILAGINOSUS*

The purpose of the given stage of researches consists in allocation, clearing, fractionation and studying exopolysaccharides of *Bacillus mucilaginosus*. Cultivation carried out on a synthetic nutrient medium. Methods of gel-chromatography, ion-exchange chromatography, definition carboxylic groups on Wilson and IR-spectrophotometry were used for analysis. Researched polysaccharide has complex composition and the big molecular weight, it contains two fractions: F1 and F2. Results of definition carboxylic groups on Wilson and IR-spectrophotometry confirm presence carboxylic groups in fraction F2.

Введение. К настоящему времени способность к деструкции силикатных минералов обнаружена у многих микроорганизмов [1]. Особый интерес с точки зрения практического использования представляют бактерии *Bacillus mucilaginosus*. Культуральную жидкость этих бактерий используют для обработки глин и технологических смесей на их основе с целью улучшения качественных показателей при производстве керамических изделий [2, 3]. Влияние культуральной жидкости на свойства сырья большинство исследователей связывает с деструктирующим воздействием на минералы метаболитов этих бактерий (экзополисахаридов и органических кислот).

Об участии низкомолекулярных органических кислот в разрушении силикатных материалов накоплен достаточно большой экспериментальный материал. По способности выносить кремний и алюминий из полевых шпатов эти кислоты расположены в следующем ряду: лимонная – щавелевая > салициловая > пирокатехиновая > галловая > *n*-оксibenзойная > ванилиновая > кофейная [4].

С другой стороны, авторами [5] показано, что интенсивность выноса кремния из кварца под действием культуральной жидкости *Bacillus mucilaginosus* коррелирует с количеством продуцируемого бактериями экзополисахаридом.

Вместе с тем выделенный из культуральной жидкости экзополисахарид сам по себе проявил незначительную самостоятельную выщелачивающую способность серицито-хлоритового сланца, причем у диализованного полисахарида эта способность была ниже, чем у образца, не подвергнутого диализу. Кроме того, на интенсивность выноса кремния в присутствии полисахарида оказывает влияние структура последнего, в частности присутствие уроновых кислот [6]. Авторы этой работы полагают, что происходит комплексное воздействие метаболитов культуральной жидкости на минералы: органические кислоты извлекают кремний и другие элементы из состава минералов и переводят их в растворимое состояние. Роль полисахаридов заключается в способности сорбировать органические кислоты и выщелоченные ионы и тем самым выводить их из реакционной смеси, сдвигая

равновесие и способствуя дальнейшему разрушению минералов.

Имеющиеся сведения о моносакхаридном составе экзополисахаридов *Bacillus mucilaginosus*, молекулярной массе и степени окисленности (соотношении гидроксильных и карбоксильных групп) разрозненны, они зависят от состава среды, в том числе источников углерода и азота, соотношения углерода и азота, значения pH, уровня аэрации и других факторов.

Основная часть. Цель данного этапа наших исследований заключалась в выделении, очистке, фракционировании и изучении экзополисахаридов *Bacillus mucilaginosus*.

Бактерии *Bacillus mucilaginosus* в виде спорового материала получены из лаборатории МолдНИИСтромпроект (г. Кишинев, Молдова).

Для глубинного культивирования бактерий применяли синтетическую питательную среду следующего состава, г/л: сахароза – 5; (NH₄)₂SO₄ – 0,5; K₂HPO₄ – 0,2; MgSO₄ – 0,2; NaCl – 0,1; K₂SO₄ – 0,1.

Культивирование бактерий проводили, как описано в [7].

К концу процесса культивирования наблюдалось сильное подкисление культуральной жидкости (значение pH снижалось до 3,9–4,0) и накапливались экзополисахариды. При использовании данной культуральной жидкости для биообработки глинистого сырья отмечалось существенное изменение технологических свойств шликерных масс [7].

Схема выделения, очистки и анализа экзополисахаридов представлена на рис. 1.

Определение молекулярной массы полисахаридов осуществляли гель-хроматографией [8]. Предварительно проводили диализ пробы против 0,01 М раствора NaCl, затем исследуемую фракцию наносили на колонку (35×2 см) с сефадексом G 200. Элюирование выполняли 0,01 М раствором NaCl со скоростью растворителя 20 мл/ч. Отбирали фракции объемом по 4 мл. Выход полисахаридов из колонки контролировали спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-26 при λ = 230 нм).

В результате проведения хроматографии исследуемая фракция полисахаридов вышла в объеме исключения. Ее объединяли и диализовали против 1 · 10⁻³ М раствора *трис*-HCl (pH 7,5).

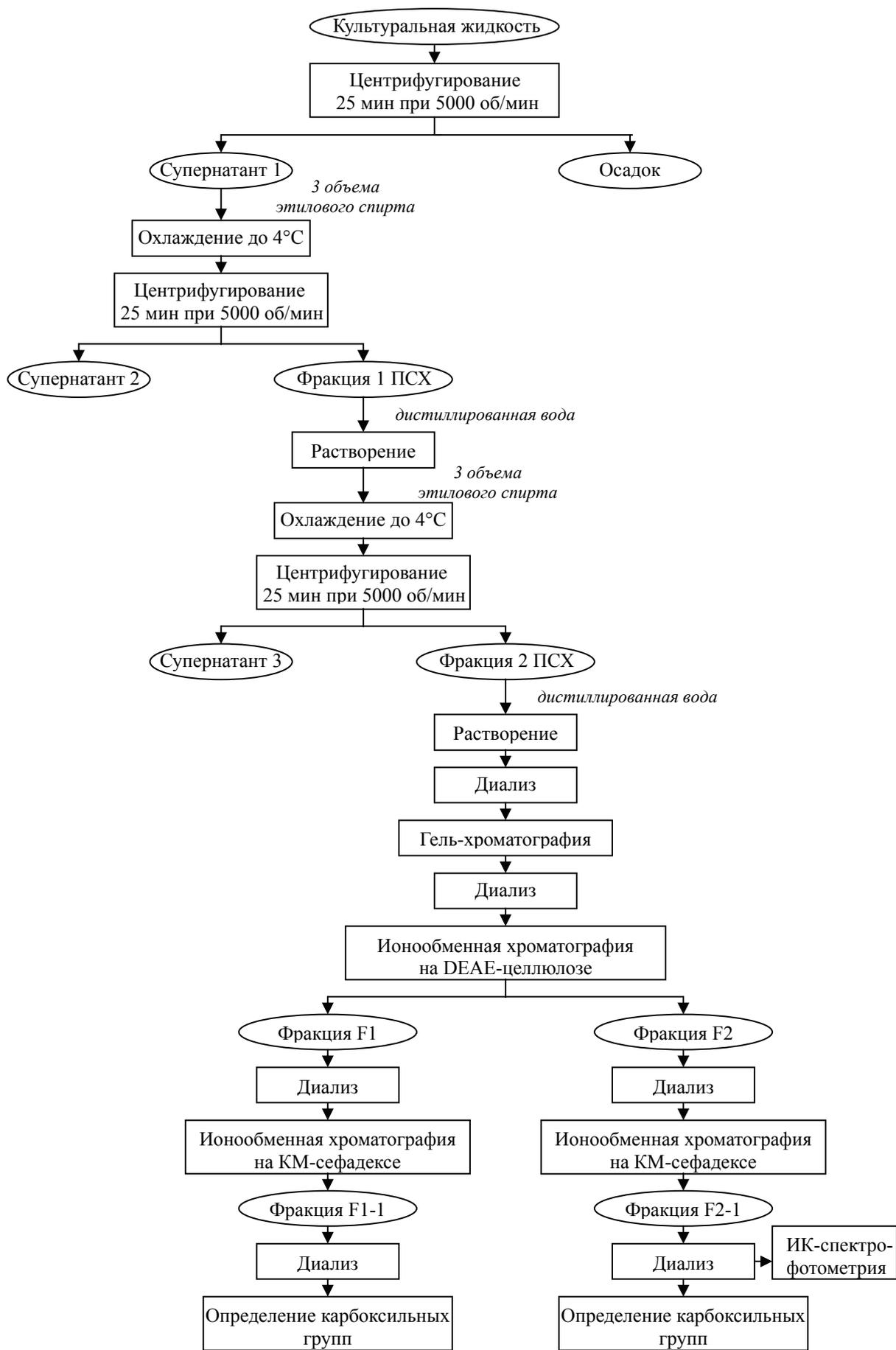


Рис. 1. Схема выделения, очистки, фракционирования и анализа экзополисахаридов

Для определения степени гомогенности проводили фракционирование экзополисахарида методом ионообменной хроматографии [9] с применением ионообменных смол на полисахаридной основе: анионите (DEAE-целлюлоза) и катионите (КМ-сефадекс), в которых функциональные ионообменные группы связаны с гидроксильными группами моносахаридных остатков.

В первом случае хроматографию осуществляли на колонке (35×2 см), заполненной DEAE-целлюлозой и уравновешенной $1 \cdot 10^{-3}$ М буферным раствором *трис*-HCl (pH 7,5).

Полисахарид в уравновешивающем буферном растворе вносили в колонку сверху. Элюирование проводили $1 \cdot 10^{-3}$ М раствором *трис*-HCl со скоростью растворителя 30 мл/ч. Отбирали фракции объемом по 4 мл. Детектирование осуществляли спектрофотометром СФ-26 при $\lambda = 230$ нм. После выхода первого хроматографического пика элюирование проводили 0,6 М раствором KCl (pH 7,5) в элюирующем буферном растворе.

На рис. 2 показана хроматограмма разделения полисахаридов.

В результате выделены две фракции полисахарида: F1 и F2. Пробы каждой из них объединяли, диализовали против $1 \cdot 10^{-3}$ М раствора *трис*-HCl (pH 6,5). Затем фракции разделяли на КМ-сефадексе при тех же условиях, используя растворы с pH 6,5.

Данный эксперимент подтвердил однородность полученных ранее фракций F1, F2, после поочередного их разделения были выделены недиссоциирующие при pH 6,5 фракции F1-1 и F2-1.

Далее пробы этих фракций объединяли, диализовали против дистиллированной воды и определяли наличие карбоксильных групп по Вильсон [10]. Метод основан на обратном титровании карбоксильных групп гидрокарбонатом натрия.

Результаты анализа подтвердили наличие карбоксильных групп во фракции F2-1 и их отсутствие во фракции F1-1.

Полученный ИК-спектр полисахарида представлен на рис. 3.

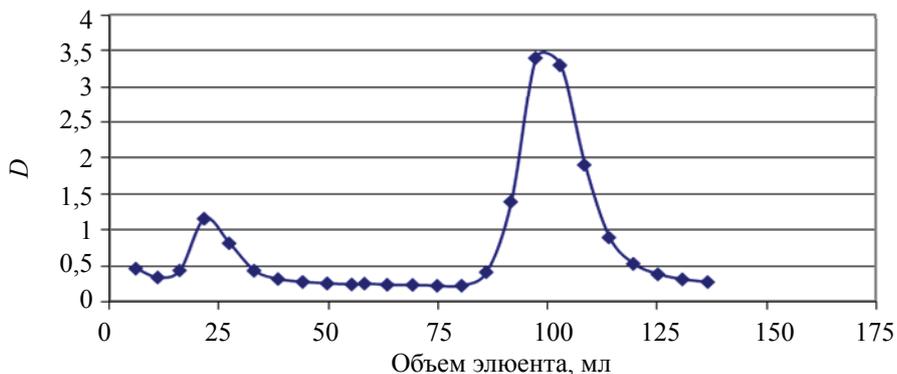


Рис. 2. Хроматограмма разделения полисахаридов

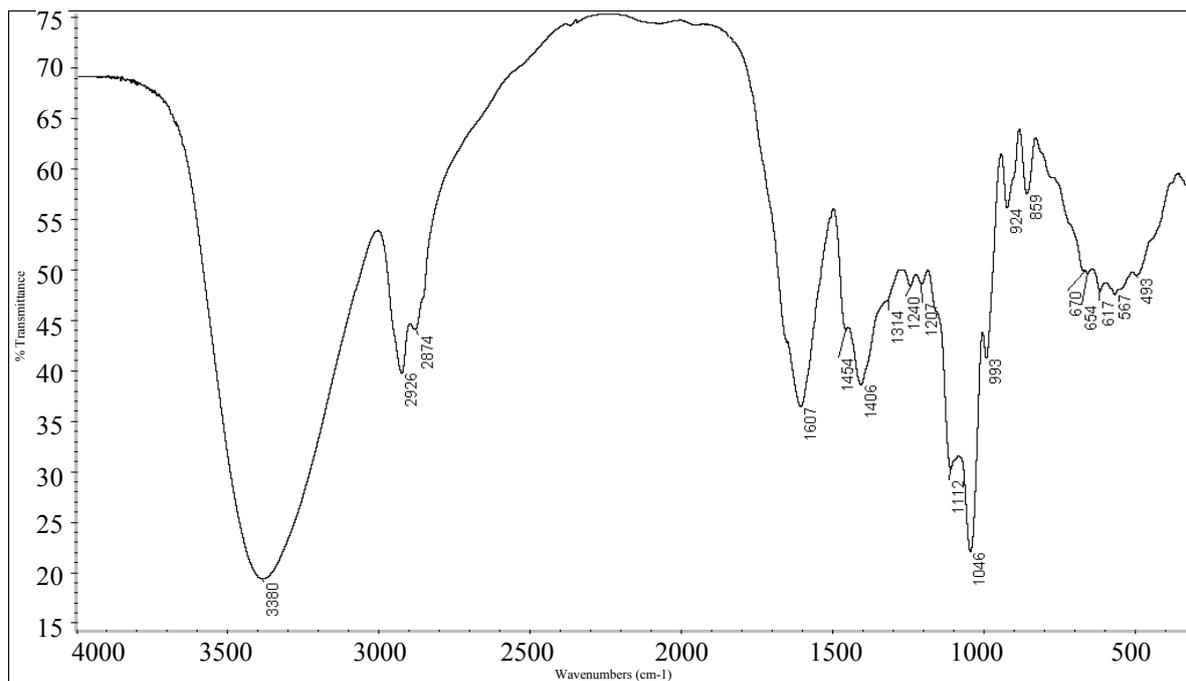


Рис. 3. ИК-спектр фракции F2-1

Спектр имеет следующие полосы поглощения: в области 3000–2800 см⁻¹ проявляются полосы поглощения валентных колебаний С–С-связей; в области 3600–3200 см⁻¹ имеется широкая полоса гидроксильных групп; ассиметричные валентные колебания С–О–С-связей проявляются в области 1150–1000 см⁻¹; валентные колебания карбонильных групп карбоксила имеют интенсивную полосу 1600–1720 см⁻¹. Исследуемый экзополисахарид является α-сахаром, так как имеет полосу в области 850–860 см⁻¹ [11].

Заключение. Результаты гель-хроматографии указывают на большую молекулярную массу (больше 200 000 Да) анализируемого полисахарида. Основываясь на результатах ионообменной хроматографии, можно говорить о сложном составе исследуемого полисахарида, состоящего из двух фракций: фракция F1 не содержит функциональных групп, диссоциирующих при рН 7,5; фракция F2 имеет в своем составе функциональные группы, диссоциирующие при рН 7,5, что свидетельствует об ее анионном характере (полисахарид может содержать карбоксильные группы). Это предположение подтверждают результаты определения карбоксильных групп по Вильсон и ИК-спектрофотометрии.

Литература

1. Каравайко, Г. И. Микробная деструкция силикатных минералов / Г. И. Каравайко // Сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии им. Виноградского. – Москва, 2004. – Вып. 12: Юбилейный сборник к 30-летию института. – С. 172–196.
2. Власов, А. С. Биологические методы обогащения минерального сырья и технологических смесей при производстве керамики / А. С. Власов // Химия и технология силикатных и тугоплавких неметаллических материалов. – 1989. – № 3. – С. 155–165.
3. Влияние условий микробиологической обработки глинистого сырья Беларуси на его качественные характеристики / Р. М. Маркевич [и др.] // Материалы. Технологии. Инструменты. – 2005. – № 4. – С. 86–89.
4. Малиновская, И. М. Влияние экзополисахарида *Bacillus mucilaginosus* на деструкцию хлорита и кварца в растворе органических кислот / И. М. Малиновская, В. С. Подгорский // Микробиологический журнал. – 1988. – Т. 50, № 5. – С. 21–25.
5. Белканова, Н. П. Разрушение силоксанной связи кварца *Bacillus mucilaginosus* / Н. П. Белканова, Г. И. Каравайко, З. А. Авакян // Микробиология. – 1985. – № 1. – С. 27–30.
6. Роль полисахарида *Bacillus mucilaginosus* в процессе деструкции силикатных минералов / И. М. Малиновская [и др.] // Микробиология. – 1990. – Т. 59, вып. 1. – С. 70–78.
7. Новый штамм бактерий рода *Bacillus* и его воздействие на качественные характеристики глины / Л. В. Куис [и др.] // Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология орган. в-в. – 2007. – Вып. XV. – С. 205–207.
8. Остерман, Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л. А. Остерман. – М.: Наука, 1985. – С. 126–137.
9. Методы химии углеводов / пер. с англ.; под ред. Н. К. Кочеткова. – М.: Мир, 1967. – 512 с.
10. Оболенская, А. В. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы / А. В. Оболенская, З. П. Ельницкая, А. А. Леонович. – М.: Экология, 1991. – 320 с.
11. Беллами, Л. Инфракрасные спектры молекул / Л. Беллами; под ред. Д. Н. Шигорина. – М.: Издательство иностранной литературы, 1957. – 444 с.