

УДК 579.841.31.017.7

**ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ КИСЛОРОДА,  
САХАРОЗЫ И НИТРАТА НА СИНТЕЗ ПОЛИ-β-ОКСИБУТИРАТА  
*RHIZOBIUM PHASEOLI***

© 1995 г. Г. А. Бонарцева, В. Л. Мышкина, Е. Д. Загребя

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Поступила в редакцию 12.12.93 г.

Методом математического планирования эксперимента оптимизированы условия для максимального синтеза поли-β-оксибутирата малоактивным штаммом *Rhizobium phaseoli*. В качестве варьируемых факторов взяты кислород, сахароза и нитрат калия. В результате эксперимента концентрационные соотношения исследуемых факторов были подобраны таким образом, что содержание поли-β-оксибутирата у *R. phaseoli*, штамм А<sub>1</sub> достигало 80% веса сухих клеток.

Ранее нами [1] было показано, что химическая природа используемых источников углерода и азота имеет важное значение для синтеза поли-β-оксибутирата (ПОБ). В зависимости от использованных источников углерода и азота синтез ПОБ можно избирательно индуцировать как у неактивных (что является традиционным), так и у активных штаммов клубеньковых бактерий. В исследованиях были использованы активные и неактивные штаммы клевера, люцерны и фасоли. В качестве источника углерода проверены сахара: глюкоза, арабиноза, маннит, сахароза, а также органические кислоты: янтарная, фумаровая и уксусная. В качестве источников азота были использованы: нитрат калия, серно-кислый аммоний, мочевины, глутамин, глицин и аспарагин. Наилучшие результаты были получены для штаммов группы *R. phaseoli* при выращивании на среде с сахарозой и нитратом. Именно эта группа клубеньковых бактерий отличалась наибольшей способностью к синтезу ПОБ, что было отмечено и в работе Salgado et al. [7]. Между тем уровень накопления ПОБ в клетках многих бактерий, в том числе азотфиксирующих, определяется не только химической природой источников углерода и азота, но и соотношением их концентраций в среде. Дефицит азотных соединений или избыток углеродных субстратов приводит к накоплению ПОБ [8, 11]. В ряде работ отмечается, что наивысшему уровню ПОБ в клетках *Rhizobium* способствует также лимитирование кислородом [5, 7, 9, 10]. В связи с тем, что ПОБ может быть использован в сельском хозяйстве и фармацевтической промышленности [4, 6], закономерен интерес к поиску штаммов – продуцентов ПОБ [1] и к оптимизации условий их выращивания для максимального выхода полимера.

Цель настоящей работы – оптимизировать условия для сверхсинтеза ПОБ в штаммах *R. phaseoli*.

**ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе использовали культуры *R. phaseoli*, штамм А<sub>1</sub> (малоактивный) и штамм А<sub>3</sub> (активный), выделенные из дерново-подзолистой почвы.

Коллекционные штаммы клубеньковых бактерий поддерживали на гороховой среде (г/л): горох – 50, сахароза – 5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0.5, агар – 15, pH 6.8 - 7.0. В опытах микроорганизмы выращивали на агаризованной синтетической среде состава (мг/л): NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O – 150, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 150, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 250, FeЭДТА – 28, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O – 10, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 3, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 2, NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 0.25, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O – 0.04, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O – 0.025, KI – 0.78, биотин – 0.01, пантотеновая кислота – 0.1, *n*-аминобензойная кислота – 0.1, фолиевая кислота – 0.01, рибофлавин – 0.2, В<sub>1</sub> – 0.1, В<sub>6</sub> – 0.1, В<sub>12</sub> – 0.02; агар Дифко – 1.5%, вода дистиллированная, pH 7.0. Концентрация источников азота (KNO<sub>3</sub>) и углерода (сахароза) была в соответствии с вариантами опыта.

Бактерии выращивали на чашках Петри: на поверхность среды в чашку Петри помещали 0.1 мл бактериальной суспензии плотностью по ФЭК-56 М 0.5 (λ = 550 нм, длина оптического пути 1 мм); для получения сплошного равномерного роста на агаре засев проводили шпателем. Культуры выращивали при разных концентрациях кислорода. Для этой цели использовали эксикаторы. Инкубировали в термостате при 28°C в течение 6 сут.

**Таблица 1.** Влияние различных концентраций кислорода, сахарозы, нитратов на синтез ПОБ в клетках активного ( $A_3$ ) и малоактивного ( $A_1$ ) штаммов *R. phaseoli*. Полный факторный эксперимент  $2^3$ 

Вариант	$O_2, X_1$	Сахароза, $X_2$	$KNO_3, X_3$	Выход процесса, ПОБ в % от веса сухой биомассы клетки ( $y$ )		Коэффициент регрессии ( $b_i$ )		Факторы и их взаимодействие
	Уровни			$A_1$	$A_3$	$A_1$	$A_3$	
	+ 20% - 2%	+ 0.5% - 0.2%	+ 0.075% - 0.025%					
1	-	-	-	31.6	29.1	19.00	17.89	"Г"
2	+	-	-	23.5	17.9	-1.93	-3.64	" $X_1$ "
3	-	+	-	26.9	32.0	4.57	4.74	" $X_2$ "
4	+	+	-	31.2	22.0	-0.05	-0.14	" $X_1X_2$ "
5	-	-	+	1.0	4.2	-9.30	-7.36	" $X_3$ "
6	+	-	+	1.6	1.4	-0.97	-1.66	" $X_1X_3$ "
7	-	+	+	24.2	20.8	3.83	2.99	" $X_2X_3$ "
8	+	+	+	12.0	15.7	-3.15	-0.44	" $X_1X_2X_3$ "
9 сред.	11%	0.35%	0.05%	25.4	21.9			

**Таблица 2.** Влияние различных концентраций кислорода, сахарозы, нитратов на урожай биомассы активного ( $A_3$ ) и малоактивного ( $A_1$ ) штаммов *R. phaseoli*. Полный факторный эксперимент  $2^3$ 

Вариант	$O_2, X_1$	Сахароза, $X_2$	$KNO_3, X_3$	Выход процесса, урожай биомассы, мг сухой биомассы/мл		Коэффициент регрессии ( $b_i$ )		Факторы и их взаимодействие
	Уровни			$A_1$	$A_3$	$A_1$	$A_3$	
	+ 20% - 2%	+ 0.5% - 0.2%	+ 0.075% - 0.025%					
1	-	-	-	0.48	0.35	0.65	0.45	"Г"
2	+	-	-	0.48	0.25	-0.04	-0.05	" $X_1$ "
3	-	+	-	0.60	0.35	0.18	0.12	" $X_2$ "
4	+	+	-	0.76	0.35	-0.02	-0.09	" $X_1X_2$ "
5	-	-	+	0.51	0.41	0.07	0.14	" $X_3$ "
6	+	-	+	0.41	0.35	-0.08	-0.02	" $X_1X_3$ "
7	-	+	+	1.17	0.92	0.08	0.09	" $X_2X_3$ "
8	+	+	+	0.76	0.69	-0.06	-0.03	" $X_1X_2X_3$ "
9 сред.	11%	0.35%	0.05%	0.86	0.60			

Количественное определение ПОБ проводили ИК-спектрофотометрически с использованием метода Фирордта [2]. Для определения содержания ПОБ в клетках биомассу бактерий смывали с агаризованной среды 15 мл водопроводной воды, измеряли оптическую плотность суспензии, клетки центрифугировали и дважды промывали стерильной водопроводной водой. Отмытую биомассу лиофилизировали, тщательно перемешивали и перемалывали с КВг, затем прессовали таблетки для снятия ИК-спектров. Спектры снимали на спектрофотометре ИК-20 (щелевая программа – 4, скорость регистрации –  $160 \text{ см}^{-1}/\text{м}$ ).

Оптимизацию среды для сверхсинтеза ПОБ проводили с использованием метода математического планирования эксперимента [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве факторов, влияющих на процесс накопления ПОБ в клетках бактерий, были взяты: кислород, источник углерода (сахароза) и источник азота ( $KNO_3$ ). Был поставлен полный факторный эксперимент (ПФЭ)  $2^3$  с использованием трех переменных на двух уровнях концентраций (табл. 1):  $X_1$  – кислород (+ 20%, - 2%);  $X_2$  – сахароза (+ 0.5%, - 0.2%);  $X_3$  –  $KNO_3$  (+ 0.075%, - 0.025%). В табл. 1 приведен план факторного эксперимента и выход процесса ( $y$ ) – накопление ПОБ в клетках активного и малоактивного штаммов *R. phaseoli*. Подсчет коэффициентов регрессии дает возможность оценить влияние на процесс каждого отдельного фактора и его

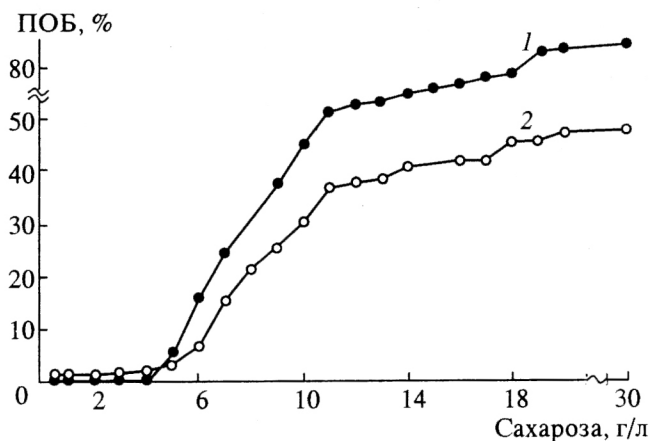


Рис. 1. Содержание ПОБ (% от веса сухой биомассы) в клетках *R. phaseoli* при движении по градиенту увеличения концентрации сахаразы в среде. 1 – малоактивный штамм  $A_1$ , 2 – активный штамм  $A_3$ .

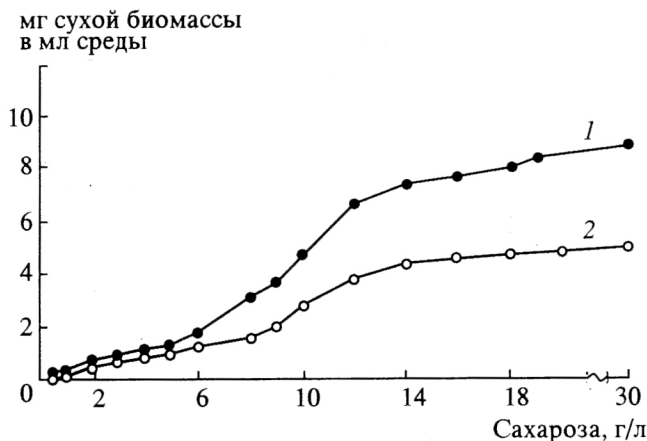


Рис. 2. Урожай биомассы *R. phaseoli* при движении по градиенту увеличения концентрации сахаразы в среде. 1 – штамм  $A_1$ , 2 – штамм  $A_3$ .

взаимодействие с другими факторами. Из таблицы видно, что влияние кислорода, сахаразы и нитрата калия на накопление ПОБ в клетках обоих штаммов почти одинаково. Кислород имеет небольшой статистически значимый отрицательный эффект на накопление ПОБ, однако на штамме  $A_3$  увеличение концентрации его в среде сказывается более существенно (выход ПОБ снижается сильнее).  $X_2$  (сахароза) имеет одинаковый положительный эффект на оба штамма, т.е. увеличение в среде концентрации сахаразы способствует накоплению ПОБ у обоих штаммов.  $X_3$  ( $KNO_3$ ) имеет высокий отрицательный эффект на оба штамма, причем на малоактивном штамме  $A_1$  его отрицательное влияние выражено сильнее – уменьшение в среде нитрата калия способствует значительному увеличению содержания ПОБ в большей степени у малоактивного

штамма. Таким образом, максимальному накоплению ПОБ в диапазоне заданных концентраций исследуемых факторов способствует небольшое снижение концентрации кислорода, повышение уровня сахаразы и значительное снижение уровня нитрата калия в среде.

Максимальное содержание ПОБ отмечено у малоактивного штамма при соотношении С : N 20 : 1 и 8 : 1 при использовании двух заданных уровней кислорода (2%, 20%); у активного штамма при соотношении С : N 20 : 1 при использовании только нижнего уровня кислорода (2%).

Минимальное содержание ПОБ у того и у другого штаммов отмечено при соотношении С : N 3 : 1, кислород существенной роли здесь не играет.

В исследуемой системе (табл. 1) отмечено наличие значимого положительного взаимодействия положительного фактора  $X_2$  – сахаразы и отрицательного фактора  $X_3$  – нитрата. Как известно, при наличии положительного взаимодействия отрицательного и положительного факторов эффект отрицательного фактора ослабляется при повышении уровня положительного, а эффект положительного фактора усиливается при повышении уровня отрицательного фактора [3]. Следовательно, увеличение в среде концентрации сахаразы может приводить к усилению синтеза ПОБ при использовании достаточно высоких концентраций нитратов в среде. Данное обстоятельство может играть существенную роль для разработки промышленного регламента получения ПОБ, так как для производства важна не только способность производственного штамма к сверхсинтезу продукта, но и высокий съём биомассы с ферментера, а этого для клубеньковых бактерий нельзя достигнуть при низких концентрациях  $NO_3^-$  в среде.

Максимальный урожай биомассы у обоих штаммов отмечен в варианте 7 (табл. 2) на минимальном уровне кислорода ( $X_1$ ) и максимальном сахаразы ( $X_2$ ) и нитратов ( $X_3$ ), причем его величина в этом варианте значительно превышает урожай биомассы в других вариантах. Полученные экспериментальные результаты подтверждаются расчетом коэффициентов регрессии ( $b_i$ ) факторного эксперимента: наличие в системе двух положительных факторов  $X_2$  (сахарозы) и  $X_3$  (нитратов) и положительное взаимодействие их  $X_2X_3$ . Данное положение справедливо для обоих штаммов.

Используемые концентрации углерода и азота в ПФЭ были низки, их низкий уровень необходим был для теоретического установления необходимого соотношения С : N с целью максимального синтеза ПОБ. Поэтому далее было проведено движение по возрастающему градиенту концентрации сахаразы в среде с целью максимального

накопления ПОБ в клетках. Исходя из полученных результатов ПФЭ 2<sup>3</sup>, вели движение по градиенту возрастающих концентраций сахарозы в среде при фиксированном уровне нитрата калия и кислорода, тем самым задавая различные соотношения С : N в среде и используя высокие концентрации источника углерода для максимального выхода биомассы (рис. 1, 2). Полученные результаты полностью подтвердили результаты ПФЭ. Высокий уровень ПОБ был достигнут при соотношении С : N, равном 10 : 1, и устойчиво стабилизировался до С : N 20 : 1 и выше. Интересно отметить, что активные штаммы клубеньковых бактерий накапливают ПОБ (рис. 1) при очень низких концентрациях углеродных субстратов в питательной среде – при этих концентрациях малоактивные штаммы не образуют ПОБ. В то же время при высоких концентрациях углеродных субстратов в среде содержание ПОБ в клетках малоактивных штаммов значительно выше, чем у активных. Максимальное содержание ПОБ у малоактивного штамма *R. phaseoli* A<sub>1</sub> достигает 80% от веса сухих клеток. Выход биомассы в этих условиях у малоактивного штамма существенно превышает выход биомассы активного штамма (рис. 2).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бонарцева Г.А., Мышкина В.Л., Загреба Е.Д. // Микробиология. 1994. Т. 63. Вып. 1. С. 78.
2. Загреба Е.Д., Савенков В.В., Гиновска М.К., Якобсон Ю.О. Микробная конверсия. Рига: Зинатне, 1990. С. 139.
3. Максимов В.Н., Федоров В.Д. Применение методов математического планирования эксперимента. М.: Изд-во МГУ, 1969. С. 121.
4. Braunegg G., Korneti L. // Biotechnol. Lett. 1984. V. 6. № 12. P. 825.
5. Encarnacion S., Willms K., Mora J. // 9th International Congress on Nitrogen Fixation. Program and Abstracts. Cancun. Mexico, 1992. P. 502.
6. Lafferty R., Braunegg G., Korneti L. et al. // Proc. III eur. congr. biotechnol. Munchen, 1984. V. 1. P. 521.
7. Salgado M., Mora Y., Leija A. et al. // 9th International Congress on Nitrogen Fixation. Program and abstracts. Cancun. Mexico, 1992. P. 161.
8. Tal S., Okon J. // Canad. J. Microbiol. 1985. V. 31. № 7. P. 608.
9. Tombolini R., Nuti M.P. // FEMS Microbiol. Lett. 1989. V. 60. P. 299.
10. V'ries W., Stam H., Duys J.G. et al. // Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol. 1986. V. 52. P. 85.
11. Zevenhuizen L.P.T.M. // Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. and Serol. 1981. V. 47. P. 481.

Рецензент Д.И. Никитин

## Influence of Various Oxygen, Sucrose, and Nitrate Concentrations on Poly-β-Oxybutyrate Synthesis in *Rhizobium phaseoli*

G. A. Bonartseva, V. L. Myshkina, and E. D. Zagreba

*Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences,  
Leninskii pr. 33, Moscow, 117071 Russia*

**Abstract** – The conditions for a maximal poly-β-oxybutyrate synthesis in a poor-active strain of *Rhizobium phaseoli* have been optimized by the method of mathematical planning of the experiment. Oxygen, sucrose, and potassium nitrate were taken as variable factors. As the result of the experiment the ratios of the factors investigated have been selected so that poly-β-oxybutyrate content in the strain A<sub>1</sub> of *R. phaseoli* reached 80% of dry cell weight.