

УДК 579.841: 577.114

Т.П. Пирог, доктор біологічних наук

О.М. Савчук, студентка

Ф.В. Мучник, кандидат біологічних наук

Національний університет харчових технологій

ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ МІКРОБНОГО ПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ АЦЕТАТУ І МЕЛЯСИ

*Встановлено, що зниження у середовищі культивування *Acinetobacter sp. B-7005* – продуцента екзополісахариду етаполану початкової концентрації ацетату і меляси до 25 % їхнього загального вмісту з наступним дробним внесенням субстратів у процесі вирощування продуцента до кінцевої концентрації 1,1–1,48 % ацетату і 0,75–1,0 % меляси, а також підтримання рН на рівні 7,5 супроводжувалося підвищенням показників синтезу етаполану на 20–45 % порівняно з вихідною технологією.*

Ключові слова: *екзополісахариди, інтенсифікація біосинтезу, дробне внесення субстратів, культивування*

*Установлено, что снижение в среде культивирования *Acinetobacter sp. B-7005* – продуцента экзополисахарида этаполана начальной концентрации ацетата и мелассы до 25 % от их общего содержания с последующим дробным внесением субстратов в процессе выращивания продуцента до конечной концентрации 1,1–1,48 % ацетата и 0,75–1,0 % мелассы, а также поддержание рН на*

уровне 7,5 сопровождалось повышением показателей синтеза этаполана на 20–45 % по сравнению с исходной технологией.

Ключевые слова: экзополисахариды, интенсификация биосинтеза, дробное внесение субстратов, культивирование

The Acinetobacter sp. B-7005 (producer of exopolysaccharide ethapolan) cultivation conditions on mixture of acetate and molasses providing the increasing of synthesis indices were established. Decreasing of both substrates initial concentration to 25 % total content in medium following its fractional addition to final concentration of 1,1–1,48 % acetate and 0,75–1,0 % molasses, pH 7,0 maintenance were accompanied by increasing (20–45 %) ethapolan synthesis as compared to basic technology.

Key words: exopolysaccharides, biosynthesis intensification, fractional addition of substrates, cultivation

У попередніх дослідженнях було встановлено можливість інтенсифікації синтезу мікробного екзополісахариду (ЕПС) етаполану у процесі культивування *Acinetobacter sp. B-7005* на суміші енергетично дефіцитних (ацетат + меляса) ростових субстратів [1]. Розроблена технологія дала змогу здешевити процес біосинтезу етаполану не тільки за рахунок використання дешевих джерел вуглецю (ацетату і меляси замість етанолу і глюкози відповідно), а й в результаті зниження загального вмісту солей у середовищі культивування продуцента з 11 до 2,5 г/л. Так, згідно цієї технології витрати на сировину для одержання 1 кг етаполану є у 3,5 раза нижчими порівняно з вихідною.

Подальші експерименти показали, що реологічні показники розчинів етаполану, синтезованого в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter sp. B-7005* на середовищі мінімального складу з дешевими джерелами вуглецю і енергії (ацетат + меляса) є вищими, ніж

аналогічних розчинів ксантану, проте нижчими порівняно з розчинами етаполану, утворюваного на суміші етанолу і глюкози [2].

Підвищення концентрації катіонів калію до 22 мМ у середовищі з ацетатом і мелясою, нейтралізація середовища для одержання інокуляту і біосинтезу ЕПС, використання посівного матеріалу з експоненційної фази росту, вирощеного на моносубстраті ацетаті натрію, дали змогу підвищити показники синтезу етаполану і його реологічні властивості [2, 3].

Під час культивування продуцента етаполану на суміші ацетату і меляси спостерігається підвищення рН культуральної рідини від 7,0 до 9,0–9,5, зумовлене транспортом ацетату у клітини симпортом з протоном [4]. У той же час оптимальним значенням рН для синтезу етаполану у процесі вирощування штаму В-7005 на етанолі є 7,0–8,0 [5]. Очевидно, що підтримання оптимального для синтезу ЕПС значення рН у процесі культивування штаму В-7005 дасть змогу підвищити показники синтезу етаполану.

Раніше [1] було показано, що за умов росту штаму В-7005 на суміші етанолу і глюкози зниження початкової концентрації субстратів з наступним дробним внесенням у процесі культивування супроводжувалося збільшенням концентрації ЕПС.

У зв'язку з викладеним вище мета роботи полягала у дослідженні можливості інтенсифікації синтезу етаполану на суміші ацетату і меляси за дробного внесення субстратів і регуляції рН упродовж процесу культивування продуцента.

Як об'єкт досліджень використовували ЕПС-синтезувальний штам бактерій *Acinetobacter* sp. 12S, депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером В-7005.

Культивування бактерій здійснювали в колбах на качалці (300 об/хв) при 30 °С упродовж 96 год на рідкому мінеральному такого складу

(г/л): KH_2PO_4 – 3,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001.

У середовища додатково вносили 0,5% (об'ємна частка) дріжджового автолізату та 0,0006 % (масова частка) пантотенату кальцію (вітамін B_5). Штам *Acinetobacter* sp. B-7005 є ауксотрофом за цим вітаміном. Як джерело вуглецю та енергії використовували суміш ацетату натрію (1,1 і 1,48 %, масова частка) і меляси (0,75 і 1,0 % за вуглеводами, масова частка).

Під час дослідження синтезу етаполану за дробного внесення субстратів початкова концентрація ацетату становила 0,28 і 0,37 % (масова частка), а меляси 0,19 і 0,25 % (масова частка за вуглеводами). Через 24, 48 і 72 год культивування здійснювали дробне внесення субстратів порціями по 0,28 чи 0,37 % ацетату і 0,19 чи 0,25 % меляси до кінцевої концентрації 1,1 (1,48) % ацетату і 0,75 (1,0) % меляси відповідно.

Початкове значення рН середовища становило 7,0; 7,5 і 8,0. У процесі культивування один раз на добу здійснювали підкислення культуральної рідини 10 %-ним розчином соляної кислоти до відповідного значення рН. В одному з експериментів рН упродовж процесу підтримували на рівні 7,5 і 8,0 за початкового значення рН середовища 7,0.

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної (18–20 год) фази росту, вирощену на середовищі наведеного вище складу, що містило як джерело вуглецю і енергії ацетат натрію (0,5 %). Концентрація інокуляту становила 10 %.

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу (АСБ) у відповідності з калібрувальним графіком. Кількість синтезованих ЕПС визначали ваговим методом після осадження ізопропанолом. ЕПС-

синтезувальну здатність визначали як відношення кількості синтезованих ЕПС до АСБ та виражали в г ЕПС/г АСБ.

Швидкість окиснення ацетату натрію інтактними клітинами *Acinetobacter* sp. В-7005 встановлювали за швидкістю поглинання кисню у реакційній суміші полярографічним методом за допомогою електроду закритого типу на полярографі ППТ-1 при температурі 28–30 °С, оптимальній для росту бактерій. Питому швидкість поглинання кисню виражали у нмоль $O_2 \cdot хв^{-1} \cdot мг^{-1} \cdot клітин$. Концентрація ацетату натрію становила 10 мМ.

Для визначення швидкості дихання клітини штаму В-7005 після культивування на рідкому середовищі (18–20 год, експоненційна фаза росту), центрифугували (4000 г, 15 хв, 4 °С). Одержаний осад клітин двічі відмивали від залишків середовища 0,05 М трис-фосфатним буфером, центрифугуючи (4000 г, 15 хв, 4 °С). Відмиті клітини ресуспендували у буфері та інкубували на качалці упродовж 1 год (30 °С, 220 об/хв). Інкубацію клітин у буфері (голодування клітин) проводили для зниження рівня ендogenous дихання.

На першому етапі досліджували вплив дробного внесення ацетату і меляси, а також регуляції рН на синтез етаполану за умов росту штаму В-7005 на суміші різних концентрацій субстратів. Результати наведено у табл. 1.

За дробного внесення субстратів (незалежно від концентрації субстратів і нейтралізації культуральної рідини упродовж культивування) спостерігали підвищення ЕПС-синтезувальної здатності продуцента на 15–45 %. За нижчої концентрації ацетату і меляси кількість синтезованого етаполану підвищувалася (на 30 %) тільки у разі одночасного дробного внесення субстратів і регуляції рН. За умов росту штаму В-7005 на середовищі з вищою концентрацією субстратів спостерігали інтенсифікацію синтезу етаполану у всіх досліджуваних варіантах.

Таблиця 1

Залежність синтезу етаполану на суміші ацетату і меляси від дробного внесення субстратів і регуляції рН

Концентрація субстратів, %	Регуляція рН у процесі культивування	ЕПС, % від контролю	ЕПС-синтезувальна здатність, % від контролю
Ацетат, 1,1 + меляса, 0,75	–	100	132
	+	130	145
Ацетат, 1,48 + меляса, 1,0	–	120	115
	+	140	145

Примітка. Контроль – без регуляції рН; субстрати у вказаних концентраціях добавлені у середовище на початку процесу культивування. Контроль прийнято за 100 % Початкове значення рН середовища 7,0. У процесі культивування один раз на добу рН доводили 10 %-ним розчином соляної кислоти до 7,0, після чого здійснювали дробне внесення субстратів, як описано вище.

У наступних експериментах аналізували залежність синтезу етаполану від дробного внесення субстратів, початкового рН середовища і значення рН, до якого здійснювали щодобове підкислення культуральної рідини (табл. 2). Як видно з наведених у табл. 2 даних, підкислення культуральної рідини до 7,5 (8,0) за початкового рН середовища, рівного 7,0, дало змогу підвищити кількість утворюваного етаполану на 16–25 %. У той же час підвищення початкового значення рН середовища до 7,5 (8,0) з наступним підтриманням його на такому самому рівні у процесі культивування продуцента супроводжувалося зниженням концентрації синтезованого етаполану на 30–40 %.

Такі результати виявилися несподіваними, оскільки раніше [5] було встановлено, що максимальний синтез етаполану на етанолі спостерігається за рН 7,0–8,0. Ми припустили, що зниження показників

Таблиця 2

Синтез етаполану на суміші ацетату натрію (1,1 %) і меляси (0,75 %) залежно від значення рН

Значення рН, підтримуване у процесі культивування	ЕПС (% від контролю) за початкового рН середовища	
	7,0	7,5 (8,0)
7,5	125	70
8,0	116	60

Примітка. Контроль (100 %) – початкове значення рН середовища і рН, підтримуване у процесі культивування 7,0. Тривалість культивування – 96 год.

синтезу етаполану на суміші ацетату і меляси за вищих значень рН може бути зумовлене особливостями транспорту ацетату у клітини штаму В-7005. Для перевірки цього припущення на наступному етапі аналізували швидкість окиснення ацетату інтактними клітинами бактерій за різних значень рН (табл. 3).

Як видно з наведених у табл. 3 даних, незалежно від використовуваних ростових субстратів (ацетат чи суміш ацетату і меляси) швидкість окиснення ацетату інтактними клітинами штаму В-7005 максимальна за рН 7,0. За підвищення рН інкубаційної суміші до 7,5–8,0 швидкість окиснення ацетату знижується на 30–50 %. Клітини, вирощені на ацетаті, окиснюють цей субстрат з вищою швидкістю, ніж клітини, вирощені на змішаному субстраті. Одержані результати підтверджують наше припущення про залежність транспорту ацетату у клітини штаму В-7005 від рН середовища і вплив таких транспортних процесів на синтез етаполану.

**Залежність швидкості окиснення ацетату натрію
інтактними клітинами *Acinetobacter* sp. B-7005 від рН**

Джерело вуглецю у середовищі культивування	рН інкубаційної суміші	Швидкість окиснення ацетату, нмоль $O_2 \cdot x \cdot v^{-1} \cdot mg^{-1}$ клітин
Ацетат натрію, 1,1 %	7,0	125,0±6,1
	7,5	83,3±4,2
	8,0	65,9±3,2
	8,5	40,8±2,3
Ацетат натрію, 1,1 % + м'яса, 0,75 %	7,0	97,3±4,5
	7,5	66,9±3,8
	8,0	43,5±2,6
	8,5	32,5±1,6

Примітка. Відмивання клітин і визначення швидкості окиснення ацетату натрію (10 мМ) здійснювали у 0,05 М трис-фосфатному буфері.

Висновки. Отже, в результаті проведеної роботи встановлено, що під час вирощування штаму B-7005 на суміші ацетату і м'яса можна підвищити показники синтезу етаполану за таких умов: зниження початкової концентрації ацетату і м'яса у середовищі до 25 % їхнього загального вмісту і нейтралізація середовища (рН 7,0) з наступним дробним внесенням субстратів і підтриманням рН на рівні 7,5 у процесі культивування продуцента.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Лащук Н.В.* Вдосконалення технології мікробного екзополісахариду етаполану на суміші ростових субстратів. Автореф.

дис...канд. техн. наук. – Київ: Національний університет харчових технологій, 2008. – 24 с.

2. *Пирог Т.П., Іванушкіна А.О.* Реологічні властивості мікробного полісахариду етаполану, синтезованого на суміші енергетично дефіцитних субстратів // Наукові праці НУХТ. – 2009, № 28. – С. 13–16.

3. *Пирог Т.П., Іванушкіна А.О., Гарбарчук С.О.* Синтез полісахариду етаполану на суміші ацетату і меляси залежно від умов культивування *Acinetobacter* sp. В-7005 // Наукові праці НУХТ. – 2010 (У друці).

4. *Пирог Т.П., Высятецкая Н.В. Корж Ю.В.* Особенности синтеза экзополисахарида этаполана на смеси энергетически дефицитных ростовых субстратов // Микробиология. – 2007. – Т.76, № 1. – С. 32–38.

5. *Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э.* Микробный синтез экзополисахаридов на C₁–C₂-соединениях. К.: Наук. думка, 1992. – 212 с.

Одержана редколлегією 02.03.10 р.