

REGULATION OF SYNTHESIS AND RHEOLOGICAL PROPERTIES OF ETHAPOLAN MICROBIAL POLYSACCHARIDE

Y. Olefirenko

National University of Food Technologies

Key words:

Exopolysaccharide
Mixed substrates
Exogenous precursors
Rheological properties
Inoculum

Article history:

Received 16.02.2014
Received in revised form
21.02.2014
Accepted 02.03.2014

Corresponding author:

Y. Olefirenko
Email:
np.nuht@ukr.net

ABSTRACT

The possibility of regulation of synthesis and rheological properties of ethapolan in culture medium with adding of exogenous precursors was investigated. Adding of sunflower oil and oleic acid (0.1—0.5 %) into the culture medium with mixed substrates (acetate and molasses, ethanol and glucose, fumarate and molasses) was accompanied by an increase of viscosity of ethapolan solutions in 4 fold both in the presence of KCl and in the Cu²⁺-glycine system, comparing to the rheological properties of ethapolan synthesized in the medium without fatty acids. Using the 0.05 % of glucose was accompanied with the highest synthesis of ethapolan (in 2.2—2.8 fold) when *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 was grown in the medium with sunflower oil (1 %) regardless of the nature of the carbon source in the medium to produce inoculum (glucose, fumarate, sunflower oil). The maximum synthesis of ethapolan was observed when using fumarate (0.05 and 0.1%) as a precursor at the beginning of the process and using inoculum grown on sunflower oil. Under such conditions, the concentration of EPS was in 5—6 times higher than in medium without fumarate.

РЕГУЛЯЦІЯ СИНТЕЗУ І РЕОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МІКРОБНОГО ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ

Ю.Ю. Олефіренко

Національний університет харчових технологій

У статті встановлено можливість регуляції синтезу та реологічних властивостей етаполану внесенням у середовище культивування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 екзогенних попередників. Так, додавання соняшникової олії та олеїнової кислоти (0,1—0,5 %) у середовище культивування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 зі змішаними субстратами (ацетат і меляса, етанол і глюкоза, фумарат і меляса) супроводжувалося підвищенням реологічних властивостей препаратів етаполану до 4 разів як за наявності 0,1 М КСl, так і в системі Cu²⁺-гліцин порівняно з культивуванням продуцента без екзогенних сполук. Використання

0,05 % глюкози як попередника супроводжувалося максимальним підвищенням показників синтезу етаполану (у 2,2—2,8 разів) за умов росту *Acinetobacter sp. ІМВ В-7005* на соняшниковій олії (1 %) незалежно від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту (глюкоза, фумарат, соняшникова олія). Максимальний синтез етаполану на соняшниковій олії за використання як попередника фумарату (0,05 і 0,1 %) досягався за внесення його у середовище на початку процесу і використанні інокуляту, вирощеного на цьому олієвмісному середовищі. За таких умов культивування концентрація ЕПС була у 5—6 разів вищою, ніж на олієвмісному середовищі без фумарату.

Ключові слова: екзополісахарид, змішані субстрати, екзогенні жирні кислоти, реологічні властивості, інокулят.

Штам *Acinetobacter sp. ІМВ В-7005* є продуцентом комплексного полісахаридного препарату етаполану. Даний ЕПС складається із нейтрального і двох кислих компонентів (ацильованого (АП) і неацильованого (НАП)). Останні є ідентичними за молярним співвідношенням D-глюкози, D-галактози, L-рамнози, D-глюкуронової й піровиноградної кислот (3:2:1:1:1) і структурою повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга [1]. Різниця між цими полісахаридами полягає в тому, що ацильований компонент містить жирні кислоти (C₁₂—C₁₈).

Реологічні властивості розчинів етаполану, які визначають його практичну значущість (здатність до емульгування, підвищення в'язкості за наявності одно- і двовалентних катіонів, при зниженні рН, у системі Cu²⁺-гліцин), залежать від співвідношення у його складі ацильованого і неацильованого компонентів, а також від вмісту жирних кислот в ацильованому ЕПС [1].

У попередніх дослідженнях встановлено можливість інтенсифікації синтезу етаполану у процесі культивування *Acinetobacter sp. ІМВ В-7005* на суміші енергетично дефіцитних (ацетат і м'яса) ростових субстратів [2]. Розроблена технологія дала змогу підвищити ефективність процесу біосинтезу не тільки за рахунок використання дешевих джерел вуглецю (ацетату і м'яса замість етанолу і глюкози відповідно), а й у результаті зниження загального вмісту солей у середовищі культивування продуцента з 11 до 2,5 г/л. Так, впровадження цієї технології забезпечує зниження у 3,5 раза витрат на сировину для одержання 1 кг етаполану [2].

Недоліком розроблених технологій етаполану на суміші енергетично дефіцитних (ацетат і м'яса) та енергетично нерівноцінних (фумарат і м'яса) субстратів [2, 3] є підвищення рН (до 9,0—9,8) у процесі культивування за рахунок асиміляції солей органічних кислот (ацетат, фумарат) симпортом з протоном. За такого рН синтезується низькоацильований етаполан, розчинам якого не притаманні необхідні для практичного використання реологічні властивості [2].

Подальші дослідження показали, що реологічні показники розчинів етаполану, синтезованого на суміші ацетату і м'яса, є вищими, ніж аналогічних розчинів ксантану, проте нижчими порівняно з розчинами етаполану, отриманого на суміші етанолу і глюкози [1].

Літературні дані про вплив екзогенних попередників на синтез і властивості мікробних метаболітів [4—6] були основою для подальших досліджень, що стосувалися можливості зміни реологічних властивостей ЕПС. Також раніше було встановлено залежність показників синтезу ЕПС від природи джерела вуглецю у процесі одержання посівного матеріалу [7, 8]. Це зумовлено зміною активності ферментів гліюксилатного циклу та гліюконеогенезу залежно від природи джерела вуглецевого живлення у середовищі для одержання інокуляту [8].

У зв'язку з цим мета даної роботи полягала у дослідженні можливості зміни показників синтезу та реологічних властивостей етаполану внесенням екзогенних попередників у середовище культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005.

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

Культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 здійснювали на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л): середовище 1: KH_2PO_4 — 3, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 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; середовище 2: KH_2PO_4 — 6,8, KOH — 0,9, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,4, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, NH_4NO_3 — 0,4, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001. Як джерело вуглецю й енергії використовували суміш ацетату натрію (1,1 %, масова частка) і меляси (0,75 %, масова частка), фумарату натрію (0,18 %, масова частка) і меляси (0,5 %, масова частка), етанолу (0,75 %, об'ємна частка) і глюкози (0,75 %, масова частка), а також соняшникову олію (1 %, об'ємна частка). У середовище додатково вносили 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізу, 0,006 % пантотенату кальцію (вітамін B_5), ністатин і стрептоміцин у концентрації 400 мкг/мл. На початку процесу культивування, в експоненційній і стаціонарній фазі росту у середовище культивування як попередники біосинтетичних процесів вносили соняшникову олію або олеїнову кислоту у концентрації 0,1—0,5 % (об'ємна частка), глюкозу або фумарат (0,05 і 0,1 %, масова частка). Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі, яке як джерело вуглецю й енергії містило глюкозу, фумарат, соняшникову олію та етанол у концентрації 0,5 %. Інокулят вносили у концентрації 10 % від загального об'єму. Культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30°C упродовж 120 год.

Соняшникова олія містить у своєму складі жирні кислоти загальною молекулярною масою 275—286 г/моль (міристинова (C14:0), пальмітинова (C16:0), пальмітолеїнова (C16:1), стеаринова (C18:0), олеїнова (18:1), лінолева (C18:2), арахідонова (C20:0)) [9]. Передбачалося, що такі C_{10} — C_{18} жирні кислоти можуть включатися у молекулу полісахариду і змінювати реологічні властивості його розчинів [9]. Відомо, що глюкоза входить до складу етаполану і внесення її у середовище культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 може супроводжуватися її безпосереднім включенням в ЕПС. Додавання фумарату у середовище може сприяти посиленню гліюконеогенезу і підвищенню синтезу етаполану. Екзогенні C_4 -дикарбонові кислоти витрачаються в основ-

ному на утворення ЕПС, і таким чином за їх допомогою можна регулювати спрямованість процесів біосинтезу у *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 [2].

Синтез ЕПС оцінювали за такими показниками: концентрація ЕПС, концентрація біомаси (АСБ), ЕПС-синтезувальна здатність [7]. Дослідження реологічних властивостей проводили з використанням двох форм препаратів етаполану: 0,05 % розчин культуральної рідини та 0,05 % розчин етаполану попередньо осаджений з постферментаційної культуральної рідини органічними розчинниками (ізопропанол, етанол) і висушений при кімнатній температурі. Реологічні властивості розчинів етаполану визначали за ступенем збільшення в'язкості за присутності 0,1 М КСl та у системі Cu^{2+} -гліцин, що є індивідуальною властивістю даного ЕПС.

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з подальшим перерахунком на абсолютно суху біомасу згідно з калібрувальним графіком [7]. Кількість синтезованих ЕПС — ваговим методом після осадження ізопропанолом [7]. ЕПС-синтезувальну здатність визначали як відношення кількості синтезованого ЕПС до АСБ та виражали у г ЕПС/г АСБ [7].

На початкових етапах досліджень культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 здійснювали у середовищі з ацетатом і мелясою з використанням соняшникової олії й олеїнової кислоти як попередників. У цьому разі спостерігали зміну реологічних властивостей етаполану. Так, максимальне підвищення в'язкості препаратів етаполану як за наявності 0,1 М КСl, так і в системі Cu^{2+} -гліцин спостерігали за внесення у середовище з ацетатом і мелясою 0,1 % соняшникової олії на початку процесу, або 0,1 — 0,3 % олеїнової кислоти впродовж культивування. У цьому разі в'язкість розчинів етаполану була в 1,2—2,7 раза вищою порівняно з вирощуванням продуцента на середовищі без жирних кислот.

Внесення 0,3 % соняшникової олії або 0,1—0,5 % олеїнової кислоти на початку процесу культивування штаму ІМВ В-7005 на суміші етанолу і глюкози супроводжувалося підвищенням в 1,1 — 2,1 раза (табл. 1) в'язкості розчинів етаполану за наявності 0,1 М КСl і в системі Cu^{2+} -гліцин порівняно з вирощуванням бактерій на середовищі без екзогенних попередників.

Таблиця 1. Вплив екзогенних попередників на реологічні властивості препаратів етаполану, синтезованого на етанолі та глюкозі

Концентрація попередників, % (об'ємна частка)	Відносне збільшення кінематичної в'язкості за внесення попередників, (% від контролю)			
	соняшникова олія		олеїнова кислота	
	за наявності КСl	у системі Cu^{2+} -гліцин	за наявності КСl	у системі Cu^{2+} - гліцин
0,1	125±6	189±9	110±6	168±8
0,3	189±9	329±16	125±6	168±8
0,5	100±5	189±9	126±6	211±10

Примітка: Контроль (100 %) — реологічні властивості етаполану, синтезованого на середовищі без попередників.

У разі додавання 0,1 — 0,3 % соняшникової олії у стаціонарній фазі росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші фумарату і меляси або 0,5 % олеїнової

кислоти на початку процесу спостерігали підвищення в'язкості розчинів етаполану за наявності 0,1 М КСІ та в системі Cu^{2+} -гліцин у 1,2—3,9 рази порівняно з показниками культивування на середовищі без жирних кислот.

Важливо зазначити, що внесення екзогенних жирних кислот у середовище за умов росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші ростових субстратів супроводжувалося підвищенням реологічних характеристик не тільки розчинів очищених препаратів етаполану, а й розчинів культуральної рідини, що містить етаполан.

Використання соняшникової олії як екзогенного попередника біосинтетичних процесів за умов росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші ростових субстратів супроводжувалося зміною не тільки реологічних властивостей препаратів етаполану, а й підвищенням концентрації ЕПС та біомаси. Це дало змогу припустити, що використання соняшникової олії як джерело вуглецю й енергії дасть змогу підвищити показники синтезу етаполану штамом ІМВ В-7005. До того ж застосування олії у біотехнологічному виробництві дасть змогу вирішити питання, пов'язані з утилізацією відпрацьованої рослинної олії.

Незалежно від моменту внесення фумарату і глюкози при культивуванні *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на соняшниковій олії з використанням інокуляту, вирощеного на глюкозі, спостерігали підвищення кількості синтезованого етаполану у 1,1—2,6 рази порівняно з вирощуванням бактерій на середовищі без попередників (табл. 2). При цьому максимальна кількість ЕПС досягалася за додавання 0,05 % глюкози та 0,1 % фумарату у стаціонарній фазі росту продуцента.

Таблиця 2. Синтез етаполану *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 за внесення попередників у середовище із соняшниковою олією

Концентрація попередника, % (масова частка)	Момент внесення попередника (фаза росту)	Кількість синтезованого ЕПС, г/л (% від контролю)	
		глюкоза	фумарат
0,05	Лаг-фаза	242±12	114,3±6
	Експоненційна	214,3±11	243±12
	Стаціонарна	257±13	221,4±11
0,1	Лаг-фаза	171,4±9	164,3±8
	Експоненційна	193,8±10	214,3±11
	Стаціонарна	157±8	257±13

Примітка. Контроль (100 %) — показники синтезу етаполану на середовищі без попередників (фумарат і глюкоза). Посівний матеріал вирощений на середовищі із глюкозою.

У разі використання інокуляту, вирощеного на соняшниковій олії, внесення екзогенних попередників на всіх фазах росту штаму ІМВ В-7005 супроводжувалося підвищенням показників синтезу етаполану у 2—6 разів порівняно з такими на олієвмісному середовищі без фумарату і глюкози (табл. 3). Проте застосування фумарату як попередника біосинтетичних процесів виявилось ефективнішим порівняно з глюкозою. Так, внесення 0,05 % фумарату на початку процесу культивування дало змогу підвищити кількість синтезованого етаполану у 6 разів порівняно з вирощуванням продуцента на середовищі без цього попередника.

Таблиця 3. Вплив екзогенних сполук (глюкоза і фумарат) на синтез етаполану за умови росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на соняшниковій олії

Концентрація попередника, % (масова частка)	Момент внесення попередника (фаза росту)	Кількість синтезованого ЕПС, г/л (% від контролю)	
		глюкоза	фумарат
0,05	Лаг-фаза	264±13	604±30
	Експоненційна	283±14	245±12
	Стаціонарна	264±13	283±14
0,1	Лаг-фаза	208±10	519±26
	Експоненційна	208±10	377±19
	Стаціонарна	283±14	236±12

Примітка. Контроль (100 %) — показники синтезу етаполану на середовищі без глюкози і фумарату. Посівний матеріал вирощений на середовищі із соняшnikовою олією.

Культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на соняшниковій олії із внесенням попередників у разі використання інокуляту, вирощеного на фумараті, також дало змогу підвищити показники синтезу етаполану. Так, незалежно від концентрації та моменту внесення глюкози і фумарату спостерігали збільшення кількості утвореного ЕПС у 2—2,8 раза порівняно з вирощуванням штаму ІМВ В-7005 на олієвмісному середовищі без екзогенних сполук. При цьому максимальне підвищення показників синтезу етаполану спостерігали у разі використання глюкози як попередника біосинтетичних процесів. Внесення 0,05 і 0,1 % даної сполуки у стаціонарній фазі росту штаму ІМВ В-7005 супроводжувалося утворенням найбільшої кількості ЕПС.

Висновки

У результаті дослідження встановлено можливість регуляції синтезу та реологічних властивостей етаполану додаванням у середовище *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 екзогенних попередників на різних стадіях процесу культивування. Внесення екзогенних жирних кислот (соняшnikова олія і олеїнова кислота — 0,1—0,5 %) у середовище зі змішаними субстратами дозволило отримати етаполан, розчини якого характеризувалися вищою майже в 4 рази в'язкістю, ніж ЕПС, синтезований на середовищі без попередників. Дослідження впливу природи джерела вуглецю при одержанні інокуляту на показники синтезу етаполану за умов росту продуцента на соняшниковій олії показало, що незалежно від джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту, найвищі показники синтезу етаполану досягалися за внесення 0,05 % глюкози на всіх етапах культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 (підвищення показників у 2,2—2,8 раза порівняно з культивуванням без глюкози). Додавання фумарату (0,05—0,1 %) на початку процесу культивування дало змогу максимально (у 5—6 разів) підвищити кількість синтезованого ЕПС за умови використання посівного матеріалу, вирощеного на соняшниковій олії.

Література

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

2. Підгорський В.С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог — К.: «Наукова думка», — 2010. — 327 с
3. Пирог Т.П. Особенности синтеза экзополисахарида этаполана на смеси энергетически дефицитных ростовых субстратов / Т.П. Пирог, Н.В. Высятецкая, Ю.В. Корж // Микробиология. — 2007. — Т. 76, № 1. — С. 32—38.
4. Kim P. Biological modification of the fatty acid group in an emulsan by supplementing fatty acids under conditions inhibiting fatty acid biosynthesis / P. Kim, D. Oh, J. Lee // J. Biosci. Bioeng. — 2000. — Vol. 90, N 3. — P. 308—312.
5. Poli A. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities / A. Poli, G. Anzelmo, B. Nicolaus // Mar. Drugs. — 2010. — Vol. 8, N 3. — P. 1779—1802.
6. Ruiz-Ruiz C. An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophila* strain B100 selectively induced apoptosis in human T leukaemia cells / C. Ruiz-Ruiz, G. Srivastava, D. Garranza // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — Vol. 89, N 2. — P. 345—355.
7. Пирог Т.П. Інтенсифікація синтеза екзополісахариду етаполана на смеси ростовых субстратов / Т.П. Пирог, М.А. Коваленко, Ю.В. Кузьминская, Т.П. Криштаб // Микробиология. — 2003. — Т. 72, № 1. — С. 26—32.
8. Пирог Т.П. Синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші етанолу і меляси / Т.П. Пирог, Ю.В. Корж, Н.В. Лащук, Б.М. Зборовська // Мікробіол. журн. — 2006. — Т. 68, № 3. — С. 3—14.
9. Dams-Kozłowska H. Modification and application of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 exopolysaccharide, the emulsan complex and its components / H. Dams-Kozłowska, M. Mercaldi, D. Kaplan // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — P. 201—210.

РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА И РЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРОБНОГО ЕКЗОПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА

Ю.Ю. Олефиренко

Национальный университет пищевых технологий

*В статье установлена возможность регуляции синтеза и реологических свойств экзополисахарида этаполана внесением в среду культивирования *Acinetobacter sp.* ИМВ В-7005 экзогенных предшественников. Так, внесение подсолнечного масла и олеиновой кислоты (0,1—0,5 %) в среду культивирования *Acinetobacter sp.* ИМВ В-7005 на смеси субстратов (ацетат и меласса, этанол и глюкоза, фумарат и меласса) сопровождалось повышением реологических свойств препаратов этаполана до 4 раз как в присутствии 0,1М КСl, так и в системе Cu^{2+} -глицин по сравнению с культивированием продуцента без экзогенных веществ. Исползования 0,05 % глюкозы как предшественника сопровождалось максимальным повышением показателей синтеза этаполана (у 2,2—2,8 раза) при условии роста *Acinetobacter sp.* ИМВ В-7005 на подсолнечном масле (1 %) независимо от природы источника уг-*

лерода в среде для получения инокулята (глюкоза, фумарат, подсолнечное масло). Максимальный синтез этаполана на подсолнечном масле при использовании как предшественника фумарата (0,05 и 0,1 %) получали при внесении его в среду в начале процесса и использовании инокулята, который выращивали на этой маслосодержащей среде. При таких условиях культивирования концентрация ЭПС была в 5—6 раз выше, чем на маслосодержащей среде без фумарата.

Ключевые слова: экзополисахарид, смесь субстратов, экзогенные предшественники, реологические свойства, инокулят.