

Т.П. ПИРОГ, доктор біологічних наук  
Г.О. ІВАНУШКІНА, магістрант  
С.О. ГАРБАРЧУК, студент  
Національний університет харчових технологій

## МОДИФІКАЦІЯ ВАГОВОГО МЕТОДУ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ

*Модифіковано ваговий метод кількісного визначення мікробного екзополісахариду етаполану, який дає змогу суттєво скоротити тривалість аналізу. Замість висушування осаду етаполану упродовж доби при кімнатній температурі здійснюється висушування у сушильній шафі при 60 °С упродовж 40 хв з наступною витримкою (30 хв) при кімнатній температурі перед зважуванням*

**Ключові слова:** мікробний полісахарид етаполан, ваговий метод, кількісне визначення

*Модифицирован весовой метод количественного определения микробного экзополисахариды этаполана, позволяющий существенно сократить продолжительность анализа. Вместо высушивания осадка этаполана в течение суток при комнатной температуре осуществляется высушивание в сушильном шкафу при 60 °С в течение 40 мин с последующей выдержкой (30 мин) при комнатной температуре перед взвешиванием*

**Ключевые слова:** микробный полисахарид этаполан, весовой метод, количественное определение.

Для визначення кількості синтезованих мікробних екзополісахаридів (ЕПС) зазвичай користуються ваговим методом, описаним у праці [1]. Суть цього методу полягає у визначенні маси осаду полісахариду, одержаного після обробки культуральної рідини змішуваними з водою органічними розчинниками (етанол, ацетон, ізопропанол). Такий метод особливо доцільний для визначення кількості високомолекулярних полісахаридів (500—1000 кДа), які у процесі осадження розчинниками дуже швидко утворюють щільний осад, який можна відділити від водно-спиртової (чи водно-ацетонової) суміші простою декантацією. У разі ж використання методу для аналізу відносно низькомолекулярних полісахаридів необхідно враховувати, що формування осаду таких

ЕПС може відбуватися упродовж кількох годин (іноді й доби), зазвичай при температурі 4 °С. Крім того, для відділення осаду низькомолекулярних ЕПС необхідним є центрифугування водно-спиртової суміші. Ці обставини зумовлюють збільшення тривалості процесу аналізу і зниження його точності. Проте більшість відомих мікробних полісахаридів (ксантан, пулулан, гелан тощо) є високомолекулярними і для їх аналізу ваговий метод використовується дуже широко.

У своїх дослідженнях з розроблення технологій синтезу мікробного полісахариду етаполану на різних вуглецевих субстратах [2—4] ми також застосовували метод, описаний у праці [1]. Слід зазначити, що даний метод є доступним, простим у виконанні, не потребує

складного обладнання. Недоліком вагового методу визначення ЕПС є його тривалість, оскільки висушування осаду ЕПС на попередньо зваженому паперовому фільтрі відбувається упродовж доби при кімнатній температурі. У той же час при проведенні певних досліджень, які потребують швидких результатів, наприклад, культивування продуцента у ферментаторі (тривалість такого процесу як правило не перевищує 36—48 год) необхідно здійснювати технологічний контроль процесу в режимі «online». Для подібних експериментів відомий ваговий метод кількісного визначення ЕПС виявляється непридатним.

У зв'язку з цим мета даної роботи полягала у модифікації вагового методу визначення кількості етаполану для скорочення тривалості аналізу.

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

Культивування бактерій здійснювали в колбах на качалці (300 об/хв) при 30 °С упродовж 96 год на рідкому мінеральному середовищі такого складу, (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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 середовище додатково вносили 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізату та 0,0006 % (масова частка) пантотенату кальцію (вітамін  $\text{B}_5$ ). Як джерело вуглецю та енергії використовували суміш ацетату натрію (1,1 %, масова частка) і меляси (0,75 % за вуглеводами, масова частка). Кислотну обробку меляси з метою гідролізу сахарози здійснювали, як описано раніше [5]. Для доведення рН середовища до 7,0 після внесення розчину меляси здійснювали підлучення стерильним 10 % розчином КОН.

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 (0,7 %). Кількість посівного матеріалу становила 1—10 % від об'єму середовища, що засівається.

Кількість синтезованого етаполану (вміст ЕПС у культуральній рідині) визначали відомим [1] і модифікованим нами ваговим методом. Згідно класичного вагового методу до певного об'єму культуральної рідини (зазвичай 10—15 мл) додавали 1,5—2 об'єми ізопропанолу, осад ЕПС переносили на попередньо зважений на аналітичних вагах паперовий фільтр і висушували упродовж доби при кімнатній температурі до постійної маси. Кількість ЕПС ( $K_{\text{ЕПС}}$ , г/л) визначали за формулою:

$$K_{\text{ЕПС}} = \frac{\Phi_1 - \Phi_0}{V} \times 1000,$$

де  $\Phi_1$  — наважка фільтра з осадом ЕПС, г;  $\Phi_0$  — наважка фільтра, г;  $V$  — об'єм культуральної рідини, з якого осаджували ЕПС, мл.

У нашій модифікації осад ЕПС, одержаний після обробки культуральної рідини ізопропанолом, пере-

носили на попередньо зважений на аналітичних вагах паперовий фільтр і висушували у сушильній шафі (60 °С) упродовж 20, 40 і 60 хв. Перед зважуванням фільтр з осадом ЕПС витримували при кімнатній температурі упродовж 15, 30 і 45 хв. В одному з варіантів перед перенесенням на паперовий фільтр осад полісахариду промивали у чистому ізопропанолі.

Вибір температури висушування етаполану (60 °С) під час модифікації вагового методу його кількісного визначення зумовлений тим, що така температура ще забезпечує стабільність реологічних характеристик цього полісахариду [6].

На першому етапі досліджень визначали оптимальну тривалість висушування осаду етаполану і його витримки перед зважуванням (табл. 1). Як видно з наведених у табл. 1 даних, висушування осаду ЕПС упродовж 40 хв з наступною витримкою при кімнатній температурі упродовж 30 хв дає змогу коректно оцінити кількість етаполану, яка співпадає з визначеною класичним ваговим методом (10,90 і 10,95 г/л відповідно). Висушування упродовж 20 хв є недостатнім для видалення вологи з осаду ЕПС, а висушування упродовж 60 хв — навпаки, призводить до надмірного видалення з нього вологи.

Таблиця 1

Визначення тривалості висушування осаду етаполану і його витримки перед зважуванням для вагового методу кількісного визначення полісахариду

Тривалість висушування осаду ЕПС при 60 °С, хв	Тривалість витримки перед зважуванням, хв	Кількість ЕПС, г/л
20	15	11,35±0,57
	30	11,85±0,59
	45	12,00±0,60
40	15	10,65±0,53
	30	10,90±0,59
	45	10,90±0,59
60	15	10,20±0,51
	30	10,55±0,53
	45	10,70±0,54

Примітка Кількість етаполану, визначена класичним ваговим методом, становила 10,95 г/л.

Раніше [6] нами було встановлено, що у процесі синтезу етаполану відбувається структурування його розчинів одновалентними катіонами, які містяться у середовищі культивування продуцента, що супроводжується суттєвим підвищенням в'язкості культуральної рідини. Проте під час осадження полісахариду (обробка культуральної рідини органічними розчинниками) частина таких мінеральних компонентів (катіонів) вивільнюється з ЕПС. Крім того, під час обробки культуральної рідини органічними розчинниками разом з полісахаридом в осад можуть потрапляти мінеральні солі, які входять до складу поживного середовища. Наявність катіонів і солей в осаді етапо-

лану суттєво завищує результати кількісного визначення цього полісахариду. У зв'язку з цим ми припустили, що можна підвищити точність кількісного визначення етаполану, якщо після осадження здійснити промивання осаду ЕПС у чистому органічному розчинникові.

Як видно з наведених у табл. 2 даних, одно- і дворазове промивання осаду етаполану в чистому ізопропанолі супроводжувалося зниженням маси осаду ЕПС у середньому на 10 %. Отже, для одержання коректних результатів під час кількісного визначення етаполану необхідним етапом має бути промивання осаду у чистому ізопропанолі, і тільки після цього осад ЕПС може бути висушений.

Таблиця 2

### Результати кількісного визначення етаполану залежно від способу осадження полісахариду

Етап промивання осаду ЕПС у чистому розчиннику	Кількість процедур промивання осаду ЕПС	Кількість ЕПС, г/л
—	—	10,90±0,55
+	Одна	9,85±0,49
	Дві	9,80±0,9

**Примітки 1.** Кількість етаполану визначали модифікованим нами методом. **2.** « — » — етап і процедура відсутня.

На заключному етапі порівнювали результати класичного і модифікованого нами методу кількісного визначення етаполану, синтезованого на суміші ацетату і меляси залежно від концентрації посівного матеріалу. Результати досліджень наведено у табл. 3. Отже, кількість етаполану, визначена класичним і модифікованим нами методом, є однаковою.

Таблиця 3

### Кількісне визначення етаполану класичним і модифікованим ваговими методами

Концентрація посівного матеріалу, %	Кількість етаполану (г/л), визначена різними методами	
	Класичним	Модифікованим
1	2	3
1	9,30±0,47	9,30±0,47
3	10,85±0,54	10,90±0,55
5	10,95±0,55	10,90±0,55
7	10,90±0,55	11,00±0,55
10	11,0±0,56	10,95±0,56

**Примітка** Промивання осаду ЕПС у чистому ізопропанолі перед перенесенням на паперовий фільтр не здійснювали.

**Висновки.** У результаті проведеної роботи модифіковано ваговий метод визначення вмісту мікробного екзополісахариду етаполану у культуральній рідині. З метою скорочення тривалості аналізу замість висушування осаду ЕПС упродовж доби при кімнатній температурі пропонується його висушування упродовж 40 хв при температурі 60 °С, після чого витримка при кімнатній температурі упродовж 30 хв і зважування на аналітичних вагах. Для підвищення точності методу кількісного визначення етаполану після осадження ЕПС перед висушуванням осад слід промити у чистому органічному розчинникові.

1. Williams A.G., Wimpenny W.T. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in continuous culture // J. Gen. Microbiol. — 1978. — V.104, № 1. — P. 47 — 57.

2. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В., Криштаб Т.П. Интенсификация синтеза экзополисахаридов етаполана на смеси ростовых субстратов // Микробиология. — 2003. — Т.72, № 1. — С. 26—32.

3. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Лащук Н.В. Влияние способа приготовления посевного материала на синтез экзополисахаридов етаполана // Биотехнология. — 2005. — № 5. — С. 29—36.

4. Пирог Т.П., Выятецкая Н.В., Корж Ю.В. Особенности синтеза экзополисахаридов етаполана на смеси энергетически дефицитных ростовых субстратов // Микробиология. — 2007. — Т.76, № 1. — С. 32—38.

5. Пирог Т.П., Лащук Н.В., Зборовська Б.М. Синтез экзополисахаридов етаполану в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на суміші C<sub>2</sub>-сполук і меляси // Харчова промисловість. — 2007. — № 5. — С. 26—29.

6. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-соединениях. К.: Наук. думка, 1992. — 212 с.

Одержана редколлегиею 04.09.08 р.