

Т.П. ПИРОГ, доктор біологічних наук
Н.В. ЛАЩУК
Б.М. ЗБОРОВСЬКА
Національний університет харчових технологій

СИНТЕЗ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ В УМОВАХ МІКСОТРОФНОГО РОСТУ *ACINETOBACTER* SP. УКМ В-7005 НА СУМІШІ С₂-СПОЛУК І МЕЛЯСИ

Показано можливість підвищення синтезу екзополісахариду етаполану в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на суміші С₂-субстратів (етанол, ацетат) і меляси. Встановлено залежність синтезу етаполану від способу підготовки меляси і посівного матеріалу. Нейтралізація меляси після її гідролізу і стерилізації, використання інокуляту, вирощеного на ацетаті, дали змогу знизити у 2–3 рази (до 0,025–0,015 моль/л) молярність буферу, у 2–4 рази (до 4,8–2,5 г/л) вміст солей у середовищі культивування і забезпечити синтез 8,5–9,7 г/л етаполану з виходом від субстрату і біомаси 65–68 % і 4–9 г/г відповідно.

Ключові слова: мікробний полісахарид етаполан, міксотрофний ріст, суміш ростових субстратів, біосинтез

Показана возможность повышения синтеза экзополисахарида этаполана в условиях миксотрофного роста *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на смеси С₂-субстратов (этанол, ацетат) и мелассы. Установлена зависимость синтеза этаполана от способа подготовки мелассы и посевного материала. Нейтрализация мелассы после ее гидролиза и стерилизации, использование инокулята, выращенного на ацетате, дали возможность снизить в 2–3 раза (до 0,025–0,015 моль/л) молярность буфера, в 2–4 раза (до 4,8–2,5 г/л) содержание солей в среде культивирования и обеспечить синтез 8,5–9,7 г/л этаполана с выходом от субстрата и биомассы 65–68 % и 4–9 г/г соответственно.

Ключевые слова: микробный полисахарид этаполан, миксотрофный рост, смесь ростовых субстратов, биосинтез

Штам *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 є продуцентом комплексного полісахаридного препарату (ЕПС) етаполану [1]. Етаполан складається з нейтрального і двох кислих компонентів, один з яких ацильований. Ацильований і неацильований полісахариди ідентичні за молярним співвідношенням D-глюкози, D-манози, D-галактози,

L-рамнози, D-глюкуронової і піровиноградної кислот (3:2:1:1:1) та структурою повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга. Різниця між цими ЕПС полягає в тому, що ацильований полісахарид містить жирні кислоти (С₁₂–С₁₈) [3]. Етаполан є полісахаридом мультифункціонального призначення і може бути використаний у нафтовидобувній, харчовій, хімічній

© Т.П. Пирог, Н.В. Лащук, Б.М. Зборовська, 2007

промисловості як загущувальний, стабілізувальний, емульгувальний і суспендувальний агент [1, 3].

Раніше нами була встановлена можливість підвищення синтезу етаполану в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на суміші енергетично нерівноцінних (етанол+глюкоза) і енергетично дефіцитних (ацетат+глюкоза) субстратів [2, 4, 6, 7]. Слід зазначити, що у літературі відсутні дані про інтенсифікацію синтезу вторинних метаболітів (у тому числі й мікробних полісахаридів) на суміші ростових субстратів. Наші дослідження показали можливість заміни глюкози під час культивування продуцента на суміші етанолу і глюкози на дешевший субстрат мелясу [2]. Проте ці результати були одержані у процесі вирощування продуцента етаполану на середовищі з високим вмістом солей (понад 9 г/л) і високою молярністю буфера (0,05 моль/л). Зниження у два рази молярності буфера у середовищі культивування супроводжувалось суттєвим зниженням показників синтезу етаполану як на суміші етанолу і меляси, так і на моносубстраті меляси [2]. Водночас в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на незабуференому середовищі з ацетатом натрію і глюкозою (на відміну від культивування бактерій на суміші етанолу і глюкози, а також етанолу і меляси) не спостерігали зниження синтезу ЕПС [7].

У зв'язку з цим мета цієї роботи — реалізація синтезу етаполану на незабуференому середовищі мінімального складу з етанолом і мелясою, а також дослідження можливості заміни глюкози на мелясу у процесі культивування продуцента на суміші ацетату і C_6 -субстрату.

Як об'єкт досліджень використовували ЕПС-синтезувальний штам бактерій *Acinetobacter* sp. 12S, депонований в Українській колекції мікроорганізмів під номером В-7005.

Культивування здійснювали в колбах на качалці (220 об/хв) при 30 °С, рН 6,8—7,0 упродовж 16—96 год на рідких мінеральних середовищах такого складу, (г/л): середовище 4: KH_2PO_4 — 6,8; КОН — 1,8; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,4; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0,1; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,001; середовище 5: аналогічне середовищу 4, в якому концентрація KH_2PO_4 і КОН знижена у два рази; середовище 6: аналогічне середовищу 5, в якому відсутній КОН; середовище 7: аналогічне середовищу 6, в якому концентрація KH_2PO_4 знижена до 2 г/л. Характеристика середовищ наведена у табл. 1.

Таблиця 1

Характеристика середовищ для вирощування *Acinetobacter* sp. В-7005

Номер середовища	Концентрація, г/л		Загальний вміст солей, г/л	Молярність буфера, моль/л
	KH_2PO_4	КОН		
4	6,8	1,8	9,1	0,05
5	3,4	0,9	4,8	0,025
6	3,4	0	3,9	0,025
7	2,0	0	2,5	0,015

У середовища додатково вносили 0,5% (за об'ємом) дріжджового автолізу та 0,0006 % пантотенату кальцію (вітамін B_5). Штам *Acinetobacter* sp. В-7005 є ауксотрофом за цим вітаміном. Середовища 4 і 5 були

використані нами при дослідженні синтезу етаполану на суміші етанолу і меляси [2], тому у даній роботі ми притримуємося їх попередньої нумерації. Середовища 6 і 7 розроблено на основі середовища 5. В усіх середовищах відсутнє джерело мінерального азоту, можливість виключення якого за наявності у середовищі меляси була показана у роботі [2].

Як джерело вуглецю та енергії використовували суміш етанолу і меляси у співвідношенні 1:1 (0,5 або 0,75 % за об'ємом: 0,5 або 0,75 мас. % за вуглеводами, відповідно), а також суміш ацетату натрію (1,1 мас. %) і меляси (0,75 мас. % за вуглеводами), ацетату калію (1,3 мас. %) і меляси (0,75 мас. % за вуглеводами). Концентрації ацетату натрію і ацетату калію були еквімолярні за вуглецем концентрації етанолу (0,75 % за об'ємом). Гідроліз меляси проводили таким чином: до 100 г меляси додавали дистильовану воду до кінцевого об'єму 200 мл, в отриманий розчин вносили 20 мл 1 н H_2SO_4 , після чого стерилізували при температурі 112 °С упродовж 30 хв. В одному з варіантів досліду використовували мелясу, яку після стерилізації нейтралізували 10 % розчином КОН.

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (18—24 год), вирощену на відповідних середовищах 4—7, що містили як джерело вуглецю і енергії етанол 0,5 % (за об'ємом), ацетат натрію (0,7 мас. %) або ацетат калію (0,8 мас. %).

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу клітин (АСБ) відповідно до калібрувального графіка. Ефективність трансформації вуглецю субстратів у ЕПС оцінювали за такими показниками: кількість синтезованих ЕПС, вихід ЕПС від субстрату, ЕПС-синтезувальна здатність. Кількість синтезованих полісахаридів встановлювали ваговим методом. ЕПС-синтезувальну здатність встановлювали як відношення кількості синтезованих ЕПС до біомаси і виражали в г ЕПС/г АСБ.

Результати показали, що культивування продуцента етаполану на незабуференому середовищі 5 з етанолом і мелясою супроводжувалось суттєвим зниженням показників синтезу ЕПС порівняно з вирощуванням на середовищі 4 (табл. 2).

Таблиця 2

Синтез етаполану на суміші етанолу і меляси на середовищах з різною молярністю буфера

Середовище культивування	Джерело вуглецю у середовищі культивування	АСБ, г/л	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г АСБ	Вихід ЕПС від субстрату, %
4	Етанол, 0,5% + меляса, 0,5%	1,5	6,6	4,4	73,3
	Етанол, 0,75% + меляса, 0,75%	2,5	9,3	3,72	68,9
5	Етанол, 0,5% + меляса, 0,5%	0,85	3,67	4,32	40,8
	Етанол, 0,75% + меляса, 0,75%	1,32	5,27	4,02	39,0

Примітки: 1. Посівний матеріал вирощений на відповідних середовищах з етанолом. 2. Концентрація меляси наведена у % за вуглеводами.

Слід зазначити, що під час культивування бактерій на незабуференому середовищі з мелясою кількість синтезованих ЕПС, ЕПС-синтезувальна здатність, вихід ЕПС від субстрату були також у 1,5 раза нижчими порівняно з вирощуванням на середовищах з високою молярністю буфера. Ці дані можуть свідчити про те, що в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. B-7005 на суміші етанолу і меляси має місце лімітування не тільки C_2 , а й C_6 -метаболізму. Проте ймовірно, що зниження синтезу етаполану на незабуференому середовищі 5 з етанолом і мелясою може бути зумовлене низьким початковим значенням рН середовища за рахунок використання не нейтралізованої після стерилізації (так званої "кислої") меляси з рН 4,0—4,5.

Дійсно, початкове значення рН середовища з такою мелясою становило 5,8—6,0, що є неоптимальним для росту *Acinetobacter* sp. B-7005 і синтезу ЕПС [1]. У наступних експериментах здійснювали вирощування продуцента етаполану на суміші етанолу і нейтралізованої меляси (табл. 3). Як видно з наведених даних, кількість синтезованих ЕПС на середовищі з етанолом і нейтралізованою мелясою була майже у 1,6 раза вища, ніж на середовищі з "кислою" мелясою. Цікаво зазначити, що при використанні нейтралізованої меляси спостерігається виявлена раніше [2, 6, 7] закономірність збільшення всіх показників процесу культивування при використанні інокуляту з ацетату (замість інокуляту з етанолу). Отже, при нейтралізації меляси можлива реалізація синтезу етаполану в умовах міксотрофного росту продуцента на незабуференому середовищі 5 з етанолом і мелясою, в якому концентрація солей знижена майже у 2 рази (до 4,8 г/л).

Таблиця 3

Вплив способу підготовки меляси на ріст *Acinetobacter* sp. B-7005 і синтез етаполану на суміші етанолу і меляси

Джерело вуглецю при біосинтезі ЕПС	Джерело вуглецю при одержанні інокуляту	pH _{кін}	АСВ, г/л	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г АСВ
Етанол, 0,75% + меляса, 0,75% (без нейтралізації)	Етанол	5,7	1,32	5,27	4,02
	Ацетат	6,3	1,30	5,60	4,31
Етанол, 0,75% + меляса, 0,75% (нейтралізована)	Етанол	6,9	1,80	8,35	4,64
	Ацетат	7,0	1,85	8,95	4,84

Примітки: 1. Одержання посівного матеріалу і біосинтез ЕПС здійснювали на середовищі 5. 2. Концентрація меляси наведена у % за вуглеводами.

На наступному етапі досліджували синтез етаполану у процесі культивування продуцента на суміші ацетату і меляси. У цих експериментах нейтралізацію меляси не проводили з метою запобігання надмірного залуження культуральної рідини, оскільки у процесі культивування бактерій на суміші ацетату і глюкози споживання ацетату супроводжувалось підвищенням рН до 8,8—9,2 [7], а

оптимум рН для синтезу етаполану становить 7,0—8,0 [1, 3]. Дані, наведені у табл. 4, свідчать, що показники синтезу етаполану на середовищі 5 з ацетатом і мелясою практично не відрізняються від одержуваних на аналогічному середовищі з етанолом і нейтралізованою мелясою (див. табл. 3), а також з ацетатом натрію і глюкозою [7]. Раніше було показано, що у процесі культивування *Acinetobacter* sp. B-7005 на суміші ацетату і глюкози показники синтезу етаполану були значно вищими за наявності у змішаному субстраті ацетату натрію порівняно з ацетатом калію [7].

Таблиця 4

Показники росту *Acinetobacter* sp. B-7005 і синтезу етаполану на суміші ацетату і меляси

Джерело вуглецю у середовищі культивування	Джерело вуглецю при одержанні інокуляту	АСВ, г/л	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г АСВ	Вихід ЕПС від субстрату, %
Ацетат калію, 1,3 % + меляса, 0,75 %	Етанол	1,3	8,0	6,15	53,3
	Ацетат калію	1,2	8,65	7,21	57,7
Ацетат натрію, 1,1 % + меляса, 0,75 %	Етанол	1,4	8,45	6,04	56,3
	Ацетат натрію	1,0	9,25	9,25	61,7

Примітки: 1. Одержання інокуляту і біосинтез ЕПС здійснювали на середовищі 5. 2. Концентрація меляси наведена у % за вуглеводами. 3. У роботі використовували не нейтралізовану після стерилізації ("кислою") мелясою. 4. При визначенні виходу ЕПС від субстрату для ацетату калію (натрію) розрахунок здійснювали за CH_3COO^- .

У роботі [7] нами було висловлено припущення про можливу участь Na^+ у створенні іонних градієнтів на мембрані, необхідних для генерації енергії протон-рушійної сили, яка використовується для транспорту ацетату в клітини продуцента етаполану. Результати цієї роботи показують, що під час культивування бактерій на суміші ацетату натрію і меляси, а також ацетату калію і меляси показники синтезу етаполану є практично однаковими (див. табл. 4).

До кінця культивування *Acinetobacter* sp. B-7005 на середовищі 5 з ацетатом і мелясою рН підвищувалось до 8,8—9,0. Ми припустили, що виключення з середовища КОН (лужної складової буферу) дасть змогу зсунути рН до оптимального для синтезу етаполану рівня і таким чином збільшити кількість ЕПС. Проте у процесі культивування продуцента етаполану на середовищі 6 (без КОН) не спостерігали росту бактерій і синтезу ЕПС, при цьому рН культуральної рідини становило 4,9—5,2. Раніше нами було показано, що при рН нижче 5,5 ацетат не транспортується у клітини *Acinetobacter* sp. B-7005 [5]. Тому з метою підвищення початкового значення рН середовища 6 (за умови відсутності КОН) знижували у ньому вміст KH_2PO_4 (середовище 7). Встановлено, що при використанні інокуляту, вирощеного на етанолі, рівень біомаси на середовищі 7 становив 1,0—1,3 г/л, а кількість ЕПС не перевищувала 6,6—6,8 г/л, тобто показники синтезу етаполану були нижчими, ніж на середовищі 5 (див. табл. 3). Слід зазначити, що початкове значення рН середовища 7

становило близько 6,0, що є також неоптимальним для транспорту ацетату у клітини продуцента етаполану [5]. Водночас при використанні посівного матеріалу, вирощеного на ацетаті, кількість синтезованих ЕПС на середовищі 7 підвищувалась до 8,0—8,2 г/л.

У попередніх досліджах одержання посівного матеріалу і біосинтез ЕПС здійснювали на середовищах однакового складу (за винятком джерела вуглецю і енергії). У наступних експериментах інокуляту вирощували на середовищі 5, а біосинтез етаполану проводили на середовищі 7 (при використанні “кислої” меляси) або за умови нейтралізації меляси одержання посівного матеріалу і культивування бактерій здійснювали на середовищі 7. В обох варіантах при одержанні інокуляту як джерело вуглецю і енергії використовували ацетат натрію. Встановлено, що при культивуванні продуцента етаполану на суміші ацетату натрію і нейтралізованої меляси показники синтезу ЕПС підвищувались до рівня, одержуваного на середовищі 5 (див. табл. 3 і 5).

Таблиця 5

Синтез етаполану на суміші ацетату натрію (1,1 %) і меляси (0,75 %) залежно від способу підготовки меляси і посівного матеріалу

Середовище для одержання інокуляту	Спосіб підготовки меляси	АСВ, г/л	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г АСВ	Вихід ЕПС від субстрату, %
5	Без нейтралізації	1,2	5,4	4,5	36,0
	Нейтралізація	1,3	6,5	5,0	43,3
7	Без нейтралізації	1,2	8,4	7,0	56,0
	Нейтралізація	1,2	9,7	8,1	64,7

Примітки: 1. Біосинтез ЕПС здійснювали на середовищі 7. 2. Концентрація меляси наведена у % за вуглеводами. 3. Як джерело вуглецю і енергії при одержанні інокуляту використовували ацетат натрію. 4. При визначенні виходу ЕПС від субстрату для ацетату натрію розрахунок здійснювали за CH_3COO^- .

Слід зазначити, що у процесі вирощування *Acinetobacter* sp. В-7005 на суміші ацетату і меляси ЕПС-синтезувальна здатність досягала 8—9 г ЕПС / г АСВ, що у два рази вище порівняно з культивуванням продуцента на суміші етанолу і меляси (див. табл. 2—5).

Висновки. У результаті проведених дослідів встановлено умови культивування продуцента етаполану на суміші C_2 -субстратів (етанол, ацетат) і меляси, що дають змогу реалізувати синтез цього ЕПС на незабуференому середовищі, в якому загальний вміст солей знижено до 4,8—2,5 г/л (майже у 4 рази порівняно з базовим середовищем) і таким чином суттєво знизити собівартість кінцевого продукту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C_1 - C_2 -соединениях. — К.: Наук. думка, 1992. — 212 с.
2. Лащук Н.В., Пирог Т.П. Регуляция метаболизма *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 в условиях миксотрофного роста на суміші C_2 - C_3 -субстратів // Тез. доп. I Міжн. конф. “Молодь і поступ

біології” (11—14 квітня 2005 р., Львів). — Л.: СПОЛОМ, 2005.— С. 7.

3. Пирог Т.П. Принципи регуляції складу і фізико-хімічних властивостей екзополісахаридів, синтезованих *Acinetobacter* sp.: Автореф. дис... д-ра біол. наук. — Київ, 1999. — 450 с.

4. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на смеси этанола и глюкозы // Микробиология. — 2003. — Т.72. — № 3. — С.348—355.

5. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Регуляция метаболизма ацетата у штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // Прикл. биохимия и микробиология. — 2003. — Т.39. — № 2. — С.180—188.

6. Пирог Т.П., Лащук Н.В. Регуляция C_2 -метаболизма в условиях миксотрофного роста продуцента полисахарида етаполана на смеси C_2 - C_3 -субстратов // Матер. Междунар. науч.-практ. конф. “Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран содружества” (25-28 мая 2005 г., Минск — Нарочь, Республика Беларусь). — Минск, РИВШ, 2005. — С. 182—183.

Одержана редколлегиею 17.12.05 р.