

Пирог, Т. П. Вплив органічних кислот на синтез мікробного полісахариду етаполану на суміші C₂-C₆-субстратів / Т. П. Пирог, С. О. Гарбарчук, О. М. Савчук // Харчова промисловість. – 2012. – № 13. – С. 61–65.

УДК 579.841: 577.114

Т.П. Пирог, доктор біологічних наук

С.О. Гарбарчук, магістрант

О.М. Савчук, магістрант

Національний університет харчових технологій

ВПЛИВ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ НА СИНТЕЗ МІКРОБНОГО ПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ C₂–C₆-СУБСТРАТІВ

*Нейтралізація культуральної рідини органічними кислотами під час культивування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на суміші ацетату і м'яси супроводжувалася підвищенням на 17–40 % показників синтезу етаполану і у 7–9 разів в'язкості його розчинів за присутності катіонів K⁺ і системі Cu²⁺-гліцин порівняно з показниками процесу без регуляції рН. Етаполан з такими властивостями може використовуватися для інтенсифікації нафтовидобутку.*

Ключові слова: *екзополісахариди, інтенсифікація біосинтезу, органічні кислоти, регуляція рН, в'язкість*

У попередніх дослідженнях було встановлено, що під час вирощування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 – продуцента екзополісахариду (ЕПС) етаполану на суміші ацетату і м'яси можна підвищити показники синтезу цільового продукту за таких умов: зниження початкової концентрації субстратів 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 у процесі культивування продуцента [1].

У процесі росту штаму IMB B-7005 на суміші ацетату і меляси спостерігається підвищення рН до 9,0–9,5 (оптимум для синтезу етаполану 7,0–8,0) в результаті транспорту ацетату натрію у клітини симпортом з протоном [1, 2]. Підкислення у процесі культивування розчином соляної кислоти призводить до накопичення у культуральній рідині NaCl і необхідності подальшого діалізу для очищення препарату. Крім того, за присутності NaCl знижується в'язкість розчинів етаполану. Передбачається, що підкислення можна здійснювати внесенням у середовище водорозчинних органічних кислот циклу трикарбонових кислот (ЦТК) – лимонної, бурштинової тощо. У цьому разі можна очікувати не тільки регуляції рН до оптимального для синтезу етаполану рівня, а й підвищення синтезу етаполану за рахунок залучення цих органічних кислот до гліюксилатного циклу (лимонна) і глюконеогенезу (бурштинова) і використання їх як додаткового джерела вуглецю. Крім того, за присутності лимонної кислоти у середовищі культивування штаму IMB B-7005 можна очікувати й покращення реологічних властивостей розчинів етаполану за рахунок збільшення у його складі вмісту жирних кислот (за аналогією з підвищенням синтезу поверхнево-активних ліпідів за присутності цитрату [3, 4]).

У зв'язку з викладеним вище мета роботи полягала у дослідженні регуляції рН у процесі культивування продуцента етаполану на суміші ацетату і меляси органічними кислотами ЦТК.

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

Культивування бактерій здійснювали в колбах на качалці (300 об/хв) при 30 °С упродовж 72–120 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. IMB B-7005 є ауксотрофом за цим вітаміном. Як джерело вуглецю та енергії використовували суміш ацетату натрію (1,1–1,65 %, масова частка) і меляси (0,75–1,13 % за вуглеводами, масова частка).

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 %). Концентрація інокуляту становила 10 %.

Упродовж культивування (кожні 24 год) здійснювали підкислення культуральної рідини до рН 7,0–7,2 10 %-ним розчином соляної, 6 %-ним розчином бурштинової, 8 %-ним розчином щавлевої, 20 %-ним розчином лимонної та 9 %-ним розчином оцтової кислот.

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.

Кінематичну в'язкість 0,1 %-них розчинів етаполану вимірювали на скляному віскозиметрі Оствальда ВПЖ-4 при температурі 20 °С.

Властивості розчинів етаполану оцінювали за зміною їх кінематичної в'язкості за присутності 0,1 М KCl та у системі Cu^{2+} -гліцин. Для вивчення поведінки розчинів етаполану в системі Cu^{2+} -гліцин до розчину ЕПС додавали 0,003 М $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ та 0,015 М гліцину; розчин нагрівали до 80 °С і витримували при цій температурі 5 хв, після чого охолоджували.

Для порівняння властивостей розчинів етаполану як критерій оцінки використовували відносне збільшення в'язкості його розчинів, яке визначали за формулою:

$$\text{Відносне збільшення в'язкості} = \frac{\eta_1 - \eta_0}{\eta_0} \times 100\% ,$$

де: η_1 – в'язкість розчину ЕПС у досліджуваних умовах (за присутності 0,1 М КСІ і системі Cu^{2+} -гліцин); η_0 – в'язкість розчину ЕПС у дистильованій воді.

На першому етапі досліджували синтез етаполану на суміші ацетату і меляси з щодобовою нейтралізацією культуральної рідини лимонною, щавлевою і бурштиною кислотами (табл. 1).

Таблиця 1

Синтез етаполану на суміші ацетату (1,1 %) і меляси (0,75 %) за регуляції рН культуральної рідини органічними кислотами

Кислота для регуляції рН	АСБ, г/л	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г АСБ
Без регуляції рН	1,10±0,05	9,2±0,4	8,36±0,43
Лимонна	1,08±0,05	10,8±0,5	10,0±0,5
Бурштинова	1,12±0,05	11,6±0,6	10,4±0,5
Щавлева	1,12±0,05	11,8±0,6	10,5±0,5

Примітка. Початкове значення рН середовища 7,0. У процесі культивування один раз на добу рН доводили розчинами органічних кислот до 7,0–7,2. Для регуляції рН використовували 20 %-ний розчин лимонної, 6 %-ний розчин бурштинової і 8 %-ний розчин щавлевої кислот.

Як видно з наведених у табл. 1 даних, використання органічних кислот для нейтралізації культуральної рідини під час росту штаму ІМВ В-7005 на суміші ацетату і меляси дало змогу підвищити кількість синтезованих ЕПС на 17–28, а ЕПС-синтезувальну здатність – на 20–26

% порівняно з показниками процесу без регуляції рН. Зазначимо, що за внесення органічних кислот не спостерігали підвищення синтезу біомаси.

Експериментальні дослідження і розрахунки дали змогу встановити, що кількість вуглецю, що додатково вноситься у середовище у вигляді розчинів кожної з органічних кислот, становить близько 0,1 г. Цієї кількості вуглецю недостатньо для підвищення синтезу етаполану до 10,8–11,8 г/л (див. табл.1). Отже, збільшення кількості синтезованого за присутності органічних кислот етаполану може бути зумовлене двома причинами: встановленням оптимального для синтезу значення рН і/або посиленням за таких умов глюконеогенезу.

Дещо нижчі показники синтезу етаполану за нейтралізації культуральної рідини лимонною кислотою порівняно з використанням для регуляції рН щавлевої і бурштинової кислот (див. табл. 1) можуть бути зумовлені залученням цитрату переважно до енергетичного, а не конструктивного метаболізму (у циклі трикарбонових кислот на синтез відновлювальних еквівалентів).

Раніше [1] нами було показано, що за нейтралізації упродовж процесу біосинтезу етаполану культуральної рідини розчином соляної кислоти з наступним дробним внесенням ацетату і меляси показники синтезу підвищуються на 30 %. Як засвідчують результати, наведені у даній праці, використання для регуляції рН органічних кислот дає змогу досягти практично таких самих результатів без дробного внесення субстратів, що значно спрощує технологію одержання етаполану.

Оскільки за присутності ацетату натрію в середовищі ферментні системи *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 пристосовані до споживання оцтової кислоти, ми припустили, що можна підвищити кількість синтезованого екзополісахариду, використовуючи для регуляції рН цю органічну кислоту. Подальші експерименти підтвердили наше припущення (табл. 2).

Вплив оцтової кислоти на синтез етаполану на суміші різних концентрацій ацетату натрію і м'ясяи

Концентрація субстратів у суміші , %	Регуляція рН у процесі культивування	АСБ, г/л	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність , г ЕПС/ г АСБ
Ацетат, 1,1+ м'ясяи, 0,75	–	1,10±0,05	9,2±0,4	8,36±0,43
Ацетат, 1,1+ м'ясяи, 0,75	+	1,11±0,05	12,4±0,6	11,2±0,56
Ацетат, 1,65+ м'ясяи, 1,13	–	1,08±0,05	9,5±0,5	8,80±0,44
Ацетат, 1,65+ м'ясяи, 1,13	+	1,15±0,05	12,9±0,6	11,2±0,56

Примітка. Початкове значення рН середовища 7,0. Для регуляції рН до 7,0–7,2 упродовж процесу культивування використовували 9 %-ний розчин оцтової кислоти.

Як видно з наведених у табл. 2 даних, незалежно від концентрації моносубстратів у суміші за нейтралізації культуральної рідини оцтовою кислотою у процесі культивування штаму В-7005 показники синтезу етаполану були вищими порівняно з вирощуванням продуцента без регуляції рН, а також вищими, ніж у разі використання для нейтралізації інших органічних кислот (табл. 1 і 2). Так, за таких умов культивування ЕПС-синтезувальна здатність становила 11,2 г ЕПС/ г АСБ, а кількість синтезованого етаполану досягала 12,4–12,9 г/л (табл. 2). Зазначимо, що ефективність трансформації вуглецю субстратів у цільовий продукт знижувалась за підвищення концентрацій ацетату натрію і м'ясяи у суміші.

Так, у разі збільшення концентрації моноsubstrатів на 50 % кількість синтезованого етаполану підвищилась всього на 0,5 г/л (табл. 2). На нашу думку, це явище зумовлене недостатнім масообміном під час культивування продуцента етаполану в колбах на качалці. У процесі синтезу етаполану значно підвищується в'язкість культуральної рідини, що в свою чергу утруднює перемішування і споживання поживних речовин клітинами бактерій.

Відомо, що умови культивування продуцента впливають не тільки на синтез ЕПС, а й на хімічні властивості кінцевого продукту [5. 6]. У різних умовах культивування може змінюватися хімічний склад ЕПС, молекулярна маса, співвідношення кількох полісахаридів, що впливає на реологічні властивості ЕПС, які визначають практичну значущість цих полімерів. У зв'язку з цим на наступному етапі досліджували реологічні властивості розчинів етаполану, синтезованого на суміші ацетату та меляси за нейтралізації середовища культивування водорозчинними органічними кислотами (табл. 3).

Розчини етаполану, синтезованого під час культивування штаму ІМВ В-7005 на суміші ацетату і меляси з періодичною нейтралізацією культуральної рідини, характеризувалися вищою в'язкістю за присутності 0,1 М КСІ і у системі Cu^{2+} -гліцин порівняно з ЕПС, одержаним у процесі без регуляції рН. Заслугує особливої уваги той факт, що використання органічних кислот для регуляції рН супроводжувалося синтезом етаполану з покращеними реологічними характеристиками. Так, відносне збільшення в'язкості за присутності 0,1 М КСІ і у системі Cu^{2+} -гліцин розчинів етаполану, синтезованого у процесі з нейтралізацією культуральної рідини щавлевою кислотою становить 46,2 і 1156 % відповідно, що у 7–9 разів вище порівняно з в'язкістю розчинів ЕПС, одержаного згідно вихідної технології (без регуляції рН) і у 4 рази вище, ніж у разі використання для регуляції рН соляної кислоти (табл. 3).

**Відносне збільшення в'язкості 0,1% розчинів етаполану,
синтезованого на суміші ацетату натрію і меляси**

Умови культивування	Відносне збільшення кінематичної в'язкості (%) за присутності	
	0,1 М КСІ	Cu ²⁺ -гліцин
Без регуляції рН	5,1±0,2	158±7
Регуляція рН соляною кислотою	10,0±0,5	285±14
Регуляція рН оцтовою кислотою	25,7±1,2	450±22
Регуляція рН щавлевою кислотою	46,2±2,3	1156±57

Примітка. Етаполан осаджували з культуральної рідини ізопропанолом, осад промивали у чистому ізопропанолі і висушували при кімнатній температурі упродовж доби.

Висновки. Отже, в результаті проведеної роботи показано ефективність використання органічних кислот (оцтова, лимонна, бурштинова, щавлева) для регуляції рН культуральної рідини упродовж вирощування продуцента етаполану на суміші ацетату натрію та меляси. Найвищі показники синтезу етаполану (12,4–12,9 г/л ЕПС проти 9,2 г/л у варіанті без підкислення), спостерігалися у разі застосування для нейтралізації середовища оцтової кислоти. За таких умов культивування синтезується етаполан, розчини якого характеризуються покращеними реологічними характеристиками, що визначають його практичну значущість.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П. Интенсифікація синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші ацетату і меляси / Т.П. Пирог, О.М. Савчук, Ф.В. Мучник // Харчова промисловість. – 2010, № 9. – С. 52-54.
2. 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.
3. Van Bogaert I.N. Microbial production and application of sophorolipids / I.N. Van Bogaert, K. Saerens, C. de Muynck, D. Develter, W. Soetaert, E.J. Vandamme // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 76, № 1. – P. 23–34.
4. Пирог Т.П. Влияние фумарата и цитрата на образование поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 / Т.П. Пирог, Д.А. Тарасенко // Биотехнология. – 2008, № 3. – С. 48-55.
5. Пирог Т.П. Вплив умов культивування мікроорганізмів-продуцентів екзополісахаридів на їхній синтез та фізико-хімічні властивості / Т.П. Пирог, Ю.В. Кузьмінська // Біополімери і клітина. – 2003. – Т. 19, №5. – С. 393–413.
6. Fialho A. M. Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives / A.M. Fialho, L.M. Moreira, A.T. Granja, A.O. Popescu, K. Hoffmann, I. Sá-Correia // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 79, № 6. – P. 889–900.

Нейтрализация культуральной жидкости органическими кислотами при культивировании Acinetobacter sp. ИМВ В-7005 на смеси ацетата и мелассы сопровождалась повышением на 17–40 % показателей синтеза этаполана и в 7–9 раз вязкости его растворов в присутствии K^+ и системе Cu^{2+} -глицин по сравнению с показателями

процесса без регуляции pH. Этаполан с такими свойствами может использоваться для интенсификации нефтедобычи.

Ключевые слова: экзополисахариды, интенсификация биосинтеза, органические кислоты, регуляция pH, вязкость

Pirog T.P., Garbarchuk S.O., Savchuk O.N.

THE INFLUENCE OF THE ORGANIC ACIDS ON SYNTHESIS OF MICROBIAL POLYSACCHARIDE ETHAPOLANE ON THE C₂-C₆-SUBSTRATES MIXTURE

The Acinetobacter sp. IMV B-7005 cultivation conditions on mixture of acetate and molasses providing the maximal transformation of the substrate carbon in the microbial exopolysaccharide ethapolan were established.

The use of the soluble organic acids (acetic, citric, succinic, oxalic) for neutralization of cultural liquid under Acinetobacter sp. IMV B-7005 cultivation on mixture of acetate and molasses was accompanied by increasing (17–40 %) of ethapolan synthesis indices and enhancing (7–9 fold) the viscosity its solutions in the presence of 0,1 M K⁺ and Cu²⁺-glycine system as compared to process realization without pH regulation. Maximal of ethapolan synthesized quantity (12,4–12,9 g/l) were obtained when acetic acid was used for neutralization of Acinetobacter sp. IMV B-7005 cultural liquid. Ethapolan with improved rheological properties can be used for the oil recovery intensification.

Key words: exopolysaccharides, biosynthesis intensification, organic acids, regulation of pH, viscosity

Одержана редколлегією 19.11.10 р.