

РЕОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРОБНОГО ПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ, СИНТЕЗОВАНОГО НА СУМІШІ ЕНЕРГЕТИЧНО ДЕФІЦИТНИХ СУБСТРАТІВ

*Встановлено, що підтримання нейтрального значення рН у процесі культивування *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 на суміші ацетату і меласи дає змогу суттєво покращити реологічні властивості синтезованого екзополісахариду (ЕПС) етаполану. Динамічна в'язкість розчинів ЕПС підвищується у кілька разів після нагрівання їх до 130 °С (10 хв) з наступним охолодженням до 20 °С. Реологічні характеристики розчинів етаполану, синтезованого на суміші ростових субстратів, значно перевищують властивості розчинів найвідомішого у світі полісахариду ксантану.*

Ключові слова: реологічні властивості, полісахариди, культивування, біосинтез

У попередніх дослідженнях нами була показана можливість інтенсифікації синтезу мікробного екзополісахариду (ЕПС) етаполану у процесі культивування *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 на суміші енергетично нерівноцінних (етанол + глюкоза, фумарат + глюкоза) і енергетично дефіцитних (ацетат + глюкоза) ростових субстратів, встановлено можливість заміни глюкози у змішаному субстраті на дешевший субстрат меласу, розроблено підходи до усунення лімітування С₂-метаболізму в умовах міксотрофного росту продуцента на суміші С₂-С₆-субстратів, встановлено умови культивування продуцента, що забезпечують максимально повну конверсію вуглецю обох субстратів у ЕПС. Ці дослідження дали змогу реалізувати без зниження показ-

*The maintenance of pH neutral level under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on mixture of acetate and molasses allowed to improve rheological properties of exopolysaccharide (EPS) ethapolan. The dynamic viscosity of EPS solutions increased of several fold after heating to 130 °C (10 min) and following cooling to 20 °C. The rheological characteristics of ethapolan synthesized on mixture of growth substrates exceeded the properties of well-known polysaccharide xanthan.*

Key words: rheological properties, polysaccharides, cultivation, biosynthesis

ників синтез етаполану на незабуференому середовищі, в якому вміст солей було знижено у 2—3 рази [1—4].

Відомо, що умови культивування продуцента впливають не тільки на синтез ЕПС, а й на фізико-хімічні властивості кінцевого продукту [5, 6]. У різних умовах культивування може змінюватися хімічний склад ЕПС, їхня молекулярна маса, співвідношення декількох полісахаридів, що впливає на реологічні властивості ЕПС, які визначають практичну значущість цих полімерів. Тому важливою і необхідною умовою розробки біотехнологій мікробних ЕПС є стабільність фізико-хімічних властивостей полісахаридів, а також можливість регуляції властивостей полімерів залежно від області їх практичного використання.

У зв'язку з цим метою даної роботи було дослідження реологічних властивостей полісахариду етаполану, синтезованого на суміші ацетату і меляси.

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 рідких мінеральних середовищах такого складу, (г/л): *середовище 1*: KH_2PO_4 - 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 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; *середовище 2*: KH_2PO_4 - 6,8; KOH - 1,8; KCl - 1,4; NH_4NO_3 - 0,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 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 автолізу та 0,0006% (масова частка) пантотенату кальцію (вітамін В₅). Штам *Acinetobacter* sp. В-7005 є ауксотрофом за цим вітаміном. Як джерело вуглецю та енергії у середовищі 1 використовували суміш ацетату натрію (1,1%, масова частка) і меляси (0,75% за вуглеводами, масова частка). Гідроліз меляси проводили так: 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 використовували негідролізовану мелясу.

Як джерело вуглецю і енергії у середовищі 2 використовували суміш етанолу (0,75%, об'ємна частка) і глюкози (0,75%, масова частка).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (18—24 год), вирощену на середовищах наведеного вище складу, що містили як джерело вуглецю і енергії ацетат натрію (0,7%) або етанол (0,5%, об'ємна частка).

Для підтримання рН на рівні 7,0 і 7,5 у процесі культивування продуцента на середовищі 1 здійснювали підкислення культуральної рідини 10% розчином HCl .

Кількість синтезованих ЕПС визначали ваговим методом після осадження ізопропанолом. Кінематичну в'язкість розчинів етаполану вимірювали на скляному віскозиметрі Освальда ВПЖ-4 при температурі 20 °С. Для приготування розчинів ЕПС культуральну рідину розбавляли дистильованою водою до концентрації 0,05%.

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.

При порівнянні 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 в досліджуваних умовах (за присутності 0,1 М KCl і системі Cu^{2+} — гліцин); η_0 — в'язкість розчину ЕПС в дистильованій воді.

Динамічну в'язкість розчинів етаполану вимірювали на ротаційному віскозиметрі «Brookfield» (США) при швидкості обертання циліндра (№ 3) 60 об/хв. Для

виділення ЕПС культуральну рідину обробляли ізопропанолом (1:1), осад ЕПС двічі промивали чистим ізопропанолом, висушували при кімнатній температурі і подрібновали. Для вимірювання динамічної в'язкості готували 0,5 і 1,0% розчини етаполану в 1% розчині KCl . Для порівняння реологічних властивостей етаполану як стандарт використовували полісахарид ксантан виробництва фірми «Sigma».

Раніше було встановлено, що етаполан складається з ацильованого (містить C_{10} - C_{16} -жирні кислоти) і неацильованого компонентів, ідентичних за моносахаридним складом, вмістом глюкуронової і піровиноградної кислот [6]. Завдяки наявності жирних кислот розчинам етаполану притаманна здатність до емульгування, підвищення в'язкості за присутності катіонів, за низьких значень рН, у системі Cu^{2+} — гліцин, що зумовлює практичне використання цього ЕПС нафтовидобувній, хімічній, харчовій промисловості сільському господарстві.

Попередні дослідження показали, що у процесі росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші етанолу і глюкози (середовище 2) синтезується високоацильований етаполан, розчинам якого притаманні необхідні для практичного використання реологічні властивості [6]. Проте середовище 2 є високовартісним, оскільки містить понад 10 г/л мінеральних солей, а також є джерело вуглецю етанол і глюкозу (харчова сировина).

Під час культивування продуцента етаполану на суміші ацетату і меляси спостерігали підвищення рН культуральної рідини від 7,0 до 9,0—9,5, зумовлене транспортом ацетату у клітини шляхом симпорту з протоном [7]. Експерименти показали, що розчин ЕПС, синтезованого в таких умовах, на відміну від етаполану, утвореного на суміші етанолу і глюкози, не підвищували в'язкість за присутності KCl і у системі Cu^{2+} — гліцин (табл. 1).

На нашу думку, це явище можна пояснити високим значенням рН культуральної рідини (9,3) до кінця культивування бактерій на середовищі 1 з ацетатом і мелясою. За таких умов може відбуватися дезацільування етаполану, що й призводить до зниження реологічних характеристик його розчинів, як було показано нами раніше [6]. На користь такого припущення свідчить і той факт, що нейтралізація культуральної рідини, одержаної після вирощування продуцента на суміші ацетату і меляси, не супроводжувалась підвищенням в'язкості етаполану за присутності KCl і у системі Cu^{2+} — гліцин.

Таблиця 1
Залежність кінематичної в'язкості 0,05% розчинів етаполану від значення рН у процесі культивування продуцента на суміші ацетату і меляси

Кінцеве значення рН культуральної рідини	Відносне збільшення кінематичної в'язкості 0,05% розчинів ЕПС,	
	за присутності 0,1 М KCl	у системі Cu^{2+} — гліцин
7,0	150,6 ± 7,5	1433,8 ± 68,5
7,5	144,7 ± 7,0	2853,4 ± 135,1
9,3	5,3 ± 0,25	24,3 ± 1,2
7,0 *	283,7 ± 14,1	3100,4 ± 150,6

Примітка. * — культивування бактерій на суміші етанолу і глюкози (середовище 2).

У зв'язку з цим на наступному етапі здійснювали культивування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на суміші ацетату і меляси за постійного значення рН у процесі росту. Дослідження показали, що розчини етаполану, синтезованого за таких умов, підвищують в'язкість за присутності 0,1 М КСl і у системі Cu^{2+} — гліцин на 140—160 і 1400—3000 % відповідно (табл. 1). Проте слід зазначити, що реологічні характеристики етаполану, синтезованого на середовищі з етанолом і глюкозою, були дещо вищими порівняно з властивостями ЕПС, одержаного на суміші ацетату і меляси (див. табл. 1).

Для порівняння реологічних властивостей етаполану з найвідомішим у світі мікробним полісахаридом ксантаном аналізували динамічну в'язкість розчинів обох ЕПС у 1 % розчині КСl (табл. 2). Саме цей показник використовується виробниками ксантану для його сертифікації.

Таблиця 2

Вплив рН середовища культивування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 з ацетатом і мелясою на динамічну в'язкість розчинів синтезованого етаполану

Кінцеве значення рН культуральної рідини	Концентрація розчинів ЕПС у 1 % КСl, %	Динамічна в'язкість, мПа·с
7,0	0,5	1050 ± 52
	1,0	3100 ± 150
7,5	0,5	1200 ± 60
	1,0	3300 ± 160
9,5	0,5	465 ± 23
	1,0	1800 ± 90
Ксантан (контроль)	1,0	1500 ± 80
Етаполан, синтезований на суміші етанолу і глюкози (середовище 2, рН 7,0)	0,5	3000 ± 150

Як видно з наведених у табл. 2 даних, динамічна в'язкість розчинів етаполану, синтезованого як на суміші етанолу і глюкози, так і на суміші ацетату і меляси, є вищою, ніж в'язкість розчину ксантану. Звертає на себе увагу той факт, що в'язкість 0,5 % розчину етаполану, утвореного на середовищі з ацетатом і мелясою за умови підтримання рН на рівні 7,5 у процесі культивування, є практично такою, як і в'язкість 1 % розчину ксантану (1200 і 1500 мПа·с відповідно). Слід також зазначити, що в'язкість 0,5 % розчину етаполану, синтезованого на середовищі 2 з етанолом і глюкозою, у два рази вища порівняно з 1 % розчином ксантану. Порівняння реологічних характеристик розчинів етаполану, синтезованого за різних умов культивування продуцента, показує, що вони є найнижчими для ЕПС, утвореного на середовищі з ацетатом і мелясою без регуляції рН під час культивування продуцента (440—480 і 1700—1900 мПа·с для 0,5 і 1,0 % розчинів етаполану відповідно).

Попередні дослідження [8] показали, що в'язкість розчинів етаполану суттєво збільшується у процесі нагрівання їх до температури 80—90 °С упродовж 10 хв з наступним охолодженням до 20 °С. Слід зазначити, що за таких умов в'язкість розчинів ксантану знижується, тобто етаполан є термостійкішим порівняно з ксантаном [8]. Наші експерименти показали, що короткотривала термообробка розчинів етаполану, синтезованого на суміші ацетату і меляси без регуляції рН у процесі куль-

тивування продуцента, дає змогу підвищити реологічні характеристики його розчинів (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив термообробки на динамічну в'язкість розчинів етаполану, синтезованого на суміші ацетату і меляси

Режим термообробки	Концентрація розчинів ЕПС у 1 % КСl, %	Динамічна в'язкість, мПа·с
Без термообробки	0,5	465 ± 23
	1,0	1800 ± 90
Нагрівання до 90 °С з наступним охолодженням до 20 °С	0,5	490 ± 23
Нагрівання до 130 °С з наступним охолодженням до 20 °С	0,5	1530 ± 75

Примітка. Кінцеве значення рН культуральної рідини під час синтезу етаполану становило 9,3.

Як видно з даних, наведених у табл. 3, нагрівання 0,5 % розчинів етаполану до температури 130 °С з наступним охолодженням до 20 °С супроводжується підвищенням їх динамічної в'язкості у три рази.

Висновки. Таким чином, у результаті проведеної роботи встановлено, що реологічні показники розчинів етаполану, синтезованого в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на середовищі мінімального складу з дешевими джерелами вуглецю і енергії (ацетат + меляса) є вищими, ніж аналогічних розчинів ксантану. В'язкість розчинів етаполану, синтезованого на суміші ацетату і меляси підвищується за умови підтримання рН у процесі культивування продуцента на рівні 7,0—7,5.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Лащук Н.В., Зборовська Б.М. Синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші етанолу і меляси // Мікробіол. журн. — 2006. — Т. 68, № 3. — С. 3—15.
2. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьмінська Ю.В. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополісахаридов *Acinetobacter* sp на смеси этанола и глюкозы // Микробиология. — 2003. — 72, № 3. — С. 348—355.
3. Пирог Т.П., Высятецкая Н.В., Корж Ю.В. Особенности синтеза экзополісахарида етаполана на смеси энергетически дефицитных ростовых субстратов // Микробиология. — 2007. — Т. 76, № 1. — С. 32—38.
4. Пирог Т.П., Высятецкая Н.В., Корж Ю.В. Образование экзополісахарида етаполана при выращивании *Acinetobacter* sp. B-7005 на смеси фумарата и глюкозы // Микробиология. — 2007. — Т. 76, № 6. — С. 790—796.
5. Margaritis A., Pace G.W. Microbial polysaccharides // Comprehens. Biotechnol. — Oxford. etc. Pergamon press, 1985. — Vol.3. — P. 1005—1044.
6. Пирог Т.П., Кузьмінська Ю.В. Вплив умов культивування мікроорганізмів-продуцентів екзополісахаридів на їхній синтез та фізико-хімічні властивості // Біополімери і клітина. — 2003. — 19, № 5. — С. 393—413.
7. Пирог Т.П., Лащук Н.В., Зборовська Б.М. Синтез екзополісахариду етаполану в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. УКМ B-7005 на суміші C_2 -