

**THE BIOSYNTHESIS OF MICROBIAL  
EXOPOLYSACCHARIDE ETHAPOLAN IN THE TERMS  
OF 'ACINETOBACTER SP. IMV B-7005 CULTIVATION  
IN THE MEDIUM WITH SUNFLOWER OIL**

**Y. Olefirenko**

*National University of Food Technologies*

<b>Key words:</b>	<b>ABSTRACT</b>
Substrate Exopolysaccharide Exogenous precursor Rheological properties	The possibility of intensification of ethapolan biosynthesis in the culture medium with sunflower oil with adding of exogenous glucose and fumarate was investigated. Addition of glucose (0,05 and 0,1 %) in exponential and stationary growth phases was accompanied by the highest increase (up to 260 %) of the ethapolan biosynthesis, compared with the cultivation of <i>Acinetobacter sp.</i> IMV B-7005 without precursors in the culture medium. Using of fumarate (0,05 – 0,1 %) in exponential and stationary growth phases was accompanied by the increase of ethapolan concentration by 2,4 and 2,6 times respectively, compared with the cultivation of the producer <i>Acinetobacter sp.</i> IMV B-7005 without exogenous precursors in the medium with sunflower oil.
<b>Article history:</b>	
Received 10.12.2012 Received in revised form 20.12.2012 Accepted 15.01.2013	
<b>Corresponding author:</b>	
E-mail: npnuht@ukr.net	

**ОСОБЛИВОСТІ БІОСИНТЕЗУ МІКРОБНОГО  
ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ  
ЗА УМОВ РОСТУ 'ACINETOBACTER SP. IMV B-7005  
НА СОНЯШНИКОВІЙ ОЛІЇ**

**Ю.Ю. Олєфіренко**

*Національний університет харчових технологій*

*Встановлено можливість інтенсифікації синтезу мікробного екзополісахариду (ЕПС) етаполану внесенням у середовище культивування *Acinetobacter sp.* IMV B-7005 із соняшниковою олією екзогенних попередників (глюкоза і фумарат). Додавання глюкози (0,05 і 0,1 %) в експоненційній та стаціонарній фазі росту супроводжувалося максимальним (до 260 %) підвищенням кількості синтезованого етаполану порівняно з культивуванням штаму IMV B-7005 на олії без попередників. Внесення 0,05 і 0,1 % фумарату в експоненційній і стаціонарній фазах росту *Acinetobacter sp.* IMV B-7005 у середовище із соняшниковою олією супроводжувалося підвищенням кількості синтезованого ЕПС у 2,4 і 2,6 рази відповідно порівняно з вирощуванням продуцента без екзогенних попередників у поживному середовищі.*

**Ключові слова:** субстрат, екзополісахарид, екзогенні попередники, реологічні властивості

Штам *Acinetobacter sp.* IMV B-7005 є продуцентом комплексного полісахаридного препарату (ЕПС) етаполану [5]. 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 і піровиноградної кислот (3:2:1:1:1:1) і структурою повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга. Різниця між цими полісахаридами полягає в тому, що ацильований компонент містить жирні кислоти (C<sub>12</sub> – C<sub>18</sub>). 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 Cu<sup>2+</sup>-гліцин), залежать від співвідношення у його складі ацильованого і неацильованого компонентів, а також від вмісту жирних кислот в ацильованому ЕПС [3].

Етаполан є полісахаридом мультифункціонального призначення і може бути використаний у нафтовидобувній, харчовій, хімічній промисловості як згущувальний, стабілізувальний, емульгувальний і суспендувальний агент [5]. Для забезпечення таких властивостей доцільним є використання ЕПС, який має у своєму складі близько 70 – 95 % АП зі ступенем ацилювання 5 – 12 % [4].

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 [1]. 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 рази витрат на сировину для одержання 1 кг етаполану [1].

Недоліком розроблених технологій етаполану на суміші енергетично дефіцитних (ацетат і м'яса) та енергетично нерівноцінних (фумарат і м'яса) субстратів [1, 2] 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 [1].

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 [3].

Літературні дані, щодо впливу екзогенних попередників на властивості клітинних метаболітів [6 – 9] були основою для подальших досліджень, що стосувалися можливості зміни реологічних властивостей ЕПС. У цьому випадку культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 проводили на середовищі зі змішаними субстратами (фумарат і м'яса, етанол і глюкоза, ацетат і м'яса) із додатковим внесенням соняшникової олії на різних фазах росту штаму продуцента [10].

Соняшникова олія містить у своєму складі жирні кислоти загальною молекулярною масою 275 – 286 г/моль (міристинова (C<sub>14:0</sub>), пальмітинова (C<sub>16:0</sub>), пальмітоолеїнова (C<sub>16:1</sub>), стеаринова (C<sub>18:0</sub>), олеїнова (18:1), лінолева (C<sub>18:2</sub>), арахідонова (C<sub>20:0</sub>)). Передбачалося, що такі C<sub>10</sub> – C<sub>18</sub> жирні кислоти можуть включатися у молекулу полісахариду і змінювати реологічні властивості його розчинів [6].

У ході досліджень було встановлено, що використання соняшникової олії супроводжувалося зміною не тільки реологічних властивостей препаратів етаполану, а й підвищенням кількості синтезованого ЕПС та біомаси продуцента [10]. Це дало змогу припустити, що використання соняшникової олії як джерело вуглецю та енергії дасть змогу підвищити біосинтетичні показники *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005.

Слід зазначити, що використання соняшникової олії дуже поширене у побуті. Важливим постає питання про утилізацію використаної олії. Одним із таких підходів є можливість її використання для процесу культивування продуцентів практично цінних вторинних метаболітів. Це є одним із перспективних напрямків у біотехнології.

Мета роботи полягала у дослідженні можливості інтенсифікації синтезу етаполану *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на соняшковій олії.

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 бактерій здійснювали у колбах на качалці (300 об/хв) при 30 °С протягом 120 год на рідкому мінеральному середовищі наступного складу (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 6,8;  $\text{KOH}$  — 0,9;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  — 0,4;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 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.

Продукт етаполану — природний ауксотроф, який для росту потребує пантотенову кислоту та неідентифікований ростовий фактор, що міститься у дріжджовому автолізаті [2]. Тому у середовище додатково вносили 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізату та 0,0006 % (масова частка) пантотенату кальцію (вітамін  $\text{B}_3$ ).

Як джерело вуглецю та енергії використовували соняшникову олію (1 %, об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі, яке як джерело вуглецю та енергії містило 0,5 % глюкози. Концентрація посівного матеріалу становила 10 % ( $10^4$  –  $10^5$  клітин/мл).

На початку процесу культивування, в експоненційній і стаціонарній фазі росту у середовище культивування як попередники біосинтетичних процесів вносили глюкозу або фумарат у концентрації 0,05 і 0,1 % (масова частка).

Відомо, що глюкоза входить до складу етаполану і внесення її у середовище культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 може супроводжуватися її трансформацією в ЕПС. Додавання фумарату у середовище може привести до посилення глюконеогенезу і підвищення синтезу етаполану. Екзогенні  $\text{C}_4$ -дикарбонові кислоти витрачаються в основному на утворення ЕПС, і таким чином за їх допомогою можна регулювати спрямованість процесів біосинтезу у *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 [1].

Синтез ЕПС оцінювали за такими показниками: концентрація ЕПС, концентрація біомаси (АСБ), ЕПС-синтезувальну здатність та реологічні властивості препаратів етаполану [11].

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком [11]. Кількість синтезованих ЕПС — ваговим методом після осадження ізопропанолом [11]. ЕПС-синтезувальну здатність визначали як відношення кількості синтезованого ЕПС до АСБ та виражали у г ЕПС/г АСБ [11].

Реологічні властивості розчинів етаполану визначали за ступенем збільшення в'язкості за присутності 0,1 М  $\text{KCl}$  та у системі  $\text{Cu}^{2+}$ -гліцин.

Здатність збільшувати в'язкість у системі  $\text{Cu}^{2+}$ -гліцин є індивідуальною властивістю етаполану: обробка його розчинів неорганічними солями супроводжується утворенням осаду ЕПС, який переходить у розчин за присутності хелатоутворюючого агента — гліцину [1].

Для вивчення поведінки етаполану у системі  $\text{Cu}^{2+}$ -гліцин до його розчину додавали 0,003 М  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , потім 0,015 М гліцину. Розчин нагрівали до 80 °С і витримували при цій температурі 5 хв, охолоджували на повітрі до 20 °С.

При визначенні в'язкості розчинів етаполану за присутності 0,1 М  $\text{KCl}$  у розчин етаполану додавали сухий хлорид калію до кінцевої концентрації 0,1 М, перемішували до повного розчинення солі і витримували протягом однієї години.

Кінематичну в'язкість досліджуваних розчинів вимірювали на скляному віскозиметрі Оствальда.

Для порівняння реологічних властивостей етаполану, синтезованого у різних умовах, як критерій оцінки використовували відносне збільшення в'язкості його розчинів.

Встановлено, що культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на середовищі із соняшниковою олією за присутності 0,05 % глюкози супроводжувалося підвищенням кількості синтезованого етаполану у 2,1 – 2,6 рази порівняно із вирощуванням продуцента у середовищі без попередника (табл. 1). При цьому, максимальна кількість ЕПС досягалася за внесення глюкози у стаціонарній фазі росту продуцента.

Додавання 0,05 % глюкози у процесі культивування штаму ІМВ В-7005 на середовищі із олією дало змогу підвищити ЕПС-синтезувальну здатність у 1,5 – 1,8 рази порівняно з вирощуванням продуцента на середовищі без глюкози.

## МІКРОБІОЛОГІЯ

**Таблиця 1. Синтез етаполану *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 за внесення глюкози у середовище із соняшниковою олією**

Концентрація глюкози, % (масова частка)	Момент внесення глюкози	Кількість синтезованого ЕПС, г/л (% від контролю)	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г АСБ (% від контролю)
0,05	Початок процесу	242±12	164,7±8
	Експоненційна фаза	214,3±11	153±8
	Стаціонарна фаза	257±13	182,4±9
0,1	Початок процесу	171,4±9	138,2±7
	Експоненційна фаза	193,8±10	88,2±4,4
	Стаціонарна фаза	157±8	100±5

*Примітки.* Контроль (100 %) — показники синтезу етаполану на середовищі без глюкози.

Внесення 0,1 % глюкози у процесі культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на соняшниковій олії супроводжувалося підвищенням показників синтезу етаполану у 1,6 – 1,9 рази (табл. 1) порівняно з вирощуванням продуцента без цього екзогенного попередника у середовищі. Максимальна кількість полісахариду утворювалася при додаванні 0,1 % глюкози в експоненційній фазі росту штаму ІМВ В-7005. Проте, максимальну ЕПС-синтезувальну здатність (138 %) спостерігали при внесенні глюкози на початку процесу культивування порівняно з вирощуванням продуцента без попередника.

Додавання 0,05 % фумарату на різних стадіях росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 супроводжувалося підвищенням кількості утвореного етаполану на 14 – 143 % (табл. 2) порівняно з культивуванням штаму ІМВ В-7005 на олії без попередника. Максимальне підвищення показників синтезу ЕПС спостерігали за внесення 0,05 % фумарату у експоненційній фазі росту продуцента.

**Таблиця 2. Вплив екзогенного фумарату на синтез етаполану за умови росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на соняшниковій олії**

Концентрація фумарату, % (масова частка)	Момент внесення фумарату	Кількість синтезованого ЕПС, г/л (% від контролю)	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г АСБ (% від контролю)
0,05	Початок процесу	114,3±6	94±5
	Експоненційна фаза	243±12	223,5±11
	Стаціонарна фаза	221,4±11	211,8±11
0,1	Початок процесу	164,3±8	170,6±9
	Експоненційна фаза	214,3±11	153±8
	Стаціонарна фаза	257±13	182,4±9

*Примітки.* Контроль (100 %) — показники синтезу етаполану на середовищі без фумарату.

Додавання 0,1 % попередника у процесі культивування штаму ІМВ В-7005 на соняшниковій олії супроводжувалося зростанням кількості утвореного полісахариду у 1,6 – 2,6 рази (табл. 2) порівняно з культивуванням продуцента на середовищі без фумарату. Максимальний показник було отримано при внесенні 0,1 % попередника у стаціонарній фазі росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 (257 % від контролю).

Додавання 0,1 % фумарату у стаціонарній фазі росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на соняшниковій олії супроводжувалося також і максимальними показниками ЕПС-синтезувальної здатності (табл. 2).

Дослідження реологічних властивостей препаратів етаполану за присутності 0,1 М КСІ та у системі  $\text{Cu}^{2+}$ -гліцин показало підвищення останніх у разі внесення як 0,05 % глюкози, так і 0,05 % фумарату у стаціонарній фазі росту продуцента на соняшниковій олії (табл. 3).

При цьому, показники зростали у 3 – 9,9 рази при дослідженні розчинів ЕПС у відповідних тест-системах порівняно з препаратами етаполану, де ЕПС отримували у середовищі культивування штаму ІМВ В-7005 без екзогенних попередників (глюкоза і фумарат).

## МІКРОБІОЛОГІЯ

Таблиця 3. Реологічні властивості етаполану, синтезованого на соняшниковій олії з додаванням глюкози і фумарату

Попередник	Відносне збільшення кінематичної в'язкості, % від контролю	
	за присутності KCl	у системі Cu <sup>2+</sup> -гліцин
Глюкоза	325±16	325±16
Фумарат	990±50	310±15

*Примітки.* Глюкозу і фумарат (0,05 %) вносили у середовище із соняшnikовою олією у стаціонарній фазі росту продуцента. Контроль (100 %) — реологічні властивості етаполану на середовищі без екзогенних попередників.

### Висновок

У результаті виконання роботи встановлено можливість інтенсифікації синтезу етаполану додаванням у середовище із соняшnikовою олією екзогенних попередників (глюкоза і фумарат). Показано залежність показників синтезу від концентрації і моменту внесення попередників біосинтезу у середовище культивування із соняшnikовою олією. Так, додавання 0,05 % глюкози у стаціонарній фазі росту штаму ІМВ В-7005 дало змогу підвищити кількість синтезованого ЕПС у 2,6 рази. Максимальна концентрація етаполану (257 % від контролю) у разі використання як попередника фумарату досягалася при внесенні його у концентрації 0,1 % у стаціонарній фазі росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005. За додавання 0,05 % як глюкози, так і фумарату у стаціонарній фазі росту продуцента синтезувався етаполан, реологічні властивості якого у 9,9 раз перевищували такі етаполану, одержаного за умов росту бактерій на середовищі без попередників.

### Література

1. Підгорський В.С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог — К.: «Наукова думка», — 2010. — 327 с
2. Пирог Т.П. Особенности синтеза экзополисахарида етаполана на смеси энергетически дефицитных ростовых субстратов / Т.П. Пирог, Н.В. Высятецкая, Ю.В. Корж // Микробиология. — 2007. — Т. 76, № 1. — С. 32 – 38.
3. 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.
4. Пирог Т.П. Етаполан — мікробний екзополісахарид мультифункціонального призначення / Т.П. Пирог, Ю.В. Корж // Біополімери і клітина. — 2006. — № 3. — С. 1 – 15.
5. Пирог Т.П. Синтез екзополісахариду етаполану в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на суміші С<sub>2</sub>-сполук і м'яса / Т.П. Пирог, Н.В. Лашук, Б.М. Зборовська // Харчова промисловість. — 2007. — № 5. — С. 26 – 29.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Ruiz-Ruiz C. An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophila* strain B100 selectively induced apoptosis in human T leukemia cells / C. Ruiz-Ruiz, G. Srivastava, D. Garranza // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — Vol 89, N 2. — P. 345 – 355.

10. Олефіренко Ю.Ю. Вплив екзогенних попередників на реологічні властивості мікробного полісахариду етаполану / Ю.Ю. Олефіренко // Ukrainian Food Journal. — 2012. — Т. 1, № 2. — С. 31 – 35.

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

## **ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА МИКРОБНОГО ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА ПРИ УСЛОВИИ РОСТА 'ACINETOBACTER SP. ИМВ В-7005 НА ПОДСОЛНЕЧНОМ МАСЛЕ**

**Ю.Ю. Олефіренко**

*Национальный университет пищевых технологий*

*Установлена возможность интенсификации синтеза микробного экзополисахарида (ЭПС) этаполана внесением в среду культивирования Acinetobacter sp. ИМВ В-7005 с подсолнечным маслом экзогенных предшественников (глюкоза и фумарат). Добавление глюкозы (0,05 и 0,1 %) в экспоненциальной и стационарной фазе роста сопровождалось максимальным (до 260 %) повышением количества синтезированного этаполана по сравнению с культивированием штамма ИМВ В-7005 на масле без предшественников. Внесение 0,05 и 0,1 % фумарата в экспоненциальной и стационарной фазах роста Acinetobacter sp. ИМВ В-7005 в среду с подсолнечным маслом сопровождалось повышением количества синтезированного ЭПС в 2,4 и 2,6 раза соответственно по сравнению с выращиванием продуцента без экзогенных предшественников в питательной среде.*

**Ключевые слова:** субстрат, экзополисахарид, экзогенные предшественники, реологические свойства