

"Complevit" as a substitute of pantothenate for *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 - producer of exopolysaccharide ethapolan

Mykola Ivahniuk, Natalia Gritsenko, Tetyana Pirog

National University of food technologies, Kyiv, Ukraine

Abstract

Keywords:

Exopolysaccharides
Biosynthesis
Growth factors
Calcium
Pantothenate

Article history:

Received 04.07.2014
Received in revised form 08.08.2014
Accepted 02.09.2014

Corresponding author:

Mykola Ivahniuk
E-mail:
Ivahniuk@mail.ru

Introduction. Today, microbial exopolysaccharides (EPS) are the subject of intense theoretical and applied researches. One of the most promising EPS is ethapolan, synthesized by *Acinetobacter* sp. IMV B-7005. The producer of ethapolan is auxotroph for calcium pantothenate, industrial production of which is absent in Ukraine and Russia too. In this regard researches to find vitamin's complexes which can be substitutes of pantothenate were done.

Research Methods. Cultivation of strain was performed on liquid medium with sunflower oil (1%, v/v) and ethanol (1%, v/v). As a source of pantothenate was used multivitamin complex "Complevit."

Results and discussions. It was found that the optimum concentration of pantothenate in "Complevit" composition is 0,00085–0,00095 %. Under cultivation of IMV B-7005 strain in the oil- and ethanol-containing medium with such concentration of pantothenate amount of ethapolan synthesized was 5.1 and 9.4 g/l, respectively.

Conclusion. Thus, the obtained results prove the possibility of using vitamin's complex "Complevit" as a source of pantothenate for producer of EPS – *Acinetobacter* sp. IMV B-7005.

УДК 579.841: 577.114

Вступ

Екзополісахариди мікробного походження (ЕПС) – високомолекулярні екзогенні продукти біосинтезу мікроорганізмів, що мають ряд переваг порівняно з хімічними аналогами: стійкість до механічної деструкції, температури і низьких значень рН, нетоксичність і біодеградабельність [5].

Штам *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 є продуцентом комплексного полісахаридного препарату етаполану. 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) і структурою повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга [1, 6, 7]. Різниця між цими полісахаридами полягає в тому, що ацильований компонент містить жирні кислоти (C_{12} – C_{18}). 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^{2+} -гліцин), залежать від співвідношення у його складі ацильованого і неацильованого компонентів, а також від вмісту жирних кислот в ацильованому ЕПС [1, 6, 7].

У праці [3] автори показали, що C_{10} – C_{18} жирні кислоти можуть включатися у молекулу полісахариду і змінювати реологічні властивості його розчинів. Соняшникова олія містить у своєму складі жирні кислоти загальною молекулярною масою 275–286 г/моль (міристинова ($C_{14:0}$), пальмітинова ($C_{16:0}$), пальмітоолеїнова ($C_{16:1}$), стеаринова ($C_{18:0}$), олеїнова (18:1), лінолева ($C_{18:2}$), арахідонова ($C_{20:0}$) [2].

У попередніх дослідженнях було встановлено, що використання соняшникової олії як попередника біосинтезу етаполану на суміші ростових субстратів супроводжувалося підвищенням не тільки реологічних властивостей етаполану, а й збільшенням кількості синтезованого ЕПС [6]. Подальші дослідження показали можливість використання соняшникової олії як джерела вуглецю та енергії для синтезу мікробного полісахариду етаполану [4].

Слід зазначити, що соняшникова олія широко використовується як в побуті, так і в харчовій промисловості, а також в закладах громадського харчування для смаження. Тому важливою є проблема утилізації відпрацьованої (пересмаженої) олії. Одним з шляхів вирішення цієї проблеми є використання відпрацьованої олії як ростового субстрату для продуцентів практично цінних мікробних метаболітів.

Раніше було встановлено, що продуцент етаполану є ауксотрофом за пантотенатом кальцію (вітамін B_5) [7].

Проте нині промислове виробництво цього вітаміну призупинилося як в Україні, так і в Росії, тому актуальним є пошук препаратів, які б стали його заміною для забезпечення потреб ауксотрофного штаму ІМВ В-7005.

Мета даної роботи – дослідження можливості заміни дефіцитного пантотенату кальцію на мультівітамінний препарат «Комплевіт», що містить в своєму складі пантотенат.

Матеріали і методи

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

Культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 –6,8; KOH –0,9; $MgSO_4 \times 7H_2O$ –0,4; $CaCl_2 \times 2H_2O$ –0,1; NH_4NO_3 –0,4; $FeSO_4 \times 7H_2O$ –0,001.

Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол і соняшкову олію у концентрації 1 % (об'ємна частка). У середовище додатково вносили 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізату, ністатин та стрептоміцин у концентрації 400 мкг/мл, а також «Комплевіт» в концентрації 0,0006–0,00105 % (масова частка в перерахунку на пантотенат).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % етанолу або соняшникової олії. Кількість посівного матеріалу становила 10 % від об'єму середовища.

Культивування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °C упродовж 120 год.

Ріст штаму і синтез ЕПС оцінювали за такими показниками.

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу (АСБ) у відповідності з калібрувальним графіком [4].

Кількість синтезованого етаполану визначали ваговим методом. Для цього до певного об'єму культуральної рідини (зазвичай 10–15 мл) додавали 1,5–2 об'єми ізопропанолу, осад ЕПС промивали чистим ізопропанолом і висушували при кімнатній температурі упродовж 24 год [4].

ЕПС-синтезувальну здатність визначали як відношення концентрації ЕПС до концентрації АСБ та виражали у г ЕПС/г АСБ [4].

Реологічні властивості 0,05 % розчинів культуральної рідини, що містить етаполан, визначали за ступенем збільшення в'язкості за присутності 0,1 М КСІ та у системі Cu^{2+} -гліцин.

Здатність збільшувати в'язкість у системі 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, що забезпечує підвищення в'язкості розчину модифікованого полісахариду порівняно з нативним розчином тієї ж концентрації, а також стабілізацію отриманого розчину при тривалому зберіганні [6, 7].

Для вивчення поведінки етаполану у системі 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 °C і витримували при цій температурі 5 хв, охолоджували на повітрі до 20 °C [6, 7].

При визначенні в'язкості розчинів етаполану за присутності 0,1 М КСІ у розчин етаполану додавали сухий хлорид калію до кінцевої концентрації 0,1 М, перемішували до повного розчинення солі і витримували упродовж однієї години.

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

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

$$((\eta_1 - \eta_0) / \eta_0) \times 100 \%$$

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

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за Лакіним [8]. Результати дослід у відповідності з t-критерієм Стьюдента виявилися статистично достовірними при 5 %-му рівні значимості.

Результати та обговорення

Під час пошуку вітамінних препаратів, що могли б стати заміною пантотенату кальцію для культивування продуцента етаполану, основними критеріями відбору були: високий вміст пантотенату, низька вартість та відсутність потенційних інгібіторів мікробного росту (наприклад, іонів металів).

Тому на першому етапі досліджень аналізували склад таких мультивітамінних препаратів як Кангавітес (США), Береш-Гравіда (Угорщина), Вітрум (США), Велмен (Росія) та Комплевіт (Україна). Усі ці препарати містили у своєму складі достатню кількість пантотенату кальцію (10–20 мг).

Для подальшої роботи було обрано «Комплевіт», оскільки він містить найбільшу кількість пантотенату (20 мг в одній капсулі) та вартість препарату є невисокою. Крім того, в його складі концентрація металів є незначною (Fe^{3+} – 1,4 мг, Zn^{2+} – 1,7 мг, Cu^{2+} – 0,3 мг).

На наступному етапі встановлювали оптимальну концентрацію пантотенату у складі «Комплевіту» для синтезу етаполану на середовищі з соняшниковою олією (табл. 1).

Як видно з наведених даних, за концентрації пантотенату у складі «Комплевіт» 0,00085 %, кількість синтезованого екзополісахариду досягала 5,1 г/л, а ЕПС-синтезувальна здатність – 5,6 гЕПС/гАСБ. Це свідчить про те, що джерело вуглецю витрачається в основному на синтез цільового продукту, а не на утворення біомаси. Внесення пантотенату у концентраціях понад 0,00095 % призводило до зниження показників синтезу.

Таблиця 1
Залежність синтезу етаполану на соняшниковій олії від концентрації пантотенату

Джерело пантотенату	Концентрація пантотенату, % (масова частка)	Показники синтезу		
		АСБ, г/л	ЕПС, г/л	г ЕПС / г АСБ,
Пантотенат кальцію	0,0006	1,98±0,10	1,0±0,05	0,5±0,03
«Комплевіт»	0,0006	3,26±0,16	4,0±0,20	1,3±0,07
	0,00075	2,27±0,11	4,6±0,23	2,1±0,10
	0,00085	0,89±0,05	5,1±0,26	5,6±0,32
	0,00095	0,69±0,03	3,6±0,20	5,2±0,30
	0,00105	0,7±0,04	2,9±0,15	4,3±0,20

Низьку концентрацію ЕПС (1 г/л, див. табл.1) за використання звичайного пантотенату кальцію можна пояснити частковою втратою його фізіологічних властивостей упродовж тривалого терміну зберігання (понад 5 років).

Показники синтезу етаполану на середовищі з етанолом за внесення пантотенату у вигляді «Комплевіту» наведено в табл. 2.

Одержані результати засвідчують, що оптимальна концентрація цього вітаміну у складі «Комплевіту» за таких умов росту продуцента становила 0,00095 %. При цьому концентрація ЕПС досягла 9,2 г/л, а ЕПС-синтезувальна здатність – 7,9 гЕПС/гАСБ. За внесення джерела пантотенату в концентрації, вищій за 0,00095 %, як і у разі культивування на соняшниковій олії, збільшення синтезу ЕПС не спостерігали.

Таблиця 2
Вплив концентрації пантотенату на синтез етаполану за умов росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на етанолі

Джерело пантотенату	Концентрація пантотенату, % (масова частка)	Показники синтезу		
		АСБ, г/л	ЕПС, г/л	г ЕПС / г АСБ,
Пантотенат кальцію	0,0006	0,6±0,03	1,0±0,05	0,5±0,02
«Комплевіт»	0,0006	0,8±0,04	5,2±0,20	1,6±0,08
	0,00075	0,95±0,05	5,7±0,30	6±0,30
	0,00085	1,22±0,06	6,6±0,33	5,4±0,27
	0,00095	1,16±0,07	9,2±0,46	7,9±0,39
	0,00105	0,84±0,04	8,6±0,43	9,5±0,47

З наведених даних (див. *табл. 1 і 2*) видно, що оптимум пантотенату для синтезу етаполану на етанолі вищий, ніж на соняшниковій олії (0,00095 і 0,00085 % відповідно). Виясненню причин, що зумовлюють це явище, будуть присвячені наші подальші дослідження.

Оскільки основною властивістю етаполану є його здатність збільшувати в'язкість водних розчинів, то наступним завданням було визначення реологічних властивостей ЕПС, синтезованих на середовищі з «Комплевітом» як джерелом пантотенату (*табл. 3*).

Таблиця 3
Реологічні властивості розчинів етаполану

Джерело пантотенату	Концентрація пантотенату, % (масова частка)	В'язкість 0,05 % розчину культури рідини (мм/с ²), після вирощування продуцента на середовищі з	
		соняшnikовою олією	етанолом
Пантотенат кальцію	0,0006	3,4±0,17	2,3±0,12
«Комплевіт»	0,0006	1,4±0,07	2,6±0,13
	0,00075	2,07±0,10	2,3±0,12
	0,00085	2,07±0,10	6,7±0,34
	0,00095	1,55±0,08	6,6±0,33
	0,00105	1,55±0,08	6,7±0,34

З даних, наведених у *табл. 3*, видно, що реологічні властивості етаполану, синтезованого за умов росту продуцента на соняшниковій олії з «Комплевітом», були нижчими, ніж на етанолі. Крім того, використання «Комплевіту» як джерела

пантотенату у середовищі з олією призводило до зниження в'язкості етаполану порівняно із застосуванням звичайного пантотенату. У той же час, реологічні властивості розчину етаполану, синтезованого на етанолі з використанням «Комплевіту», були вищими, ніж за використання звичайного пантотенату (6,7 і 2,3 мм/с² відповідно).

Висновки:

Таким чином, у результаті проведеної роботи показано можливість використання вітамінного препарату «Комплевіт» як замітника пантотенату кальцію у середовищі культивування ауксотрофного штаму *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 – продуцента мікробного полісахариду етаполану. Встановлено оптимальну концентрацію пантотенату (0,00085–0,00095 %, масова частка) у складі «Комплевіту», що забезпечує максимальні показники синтезу етаполану на середовищі з соняшниковою олією та етанолом.

Література

1. Пирог Т.П., Іванушкіна А.О. (2009), Реологічні властивості мікробного полісахариду етаполану, синтезованого на суміші енергетично дефіцитних субстратів, *Наукові праці НУХТ*, Т. 42 № 28, С. 13–16.
2. Dams-Kozłowska H., Mercaldi M., Kaplan D. (2008), Modification and application of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 exopolysaccharide, the emulsan complex and its components, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 16 № 5, pp. 201–210.
3. Ruiz-Ruiz C., Srivastava G., Garranza D. (2010), An exopolysaccharide produced by the novel halophilic bacterium *Halomonas stenophila* strain B100 selectively induced apoptosis in human T leukaemia cells, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 89 №2, pp. 345–355.
4. Пирог Т.П., Олефіренко Ю.Ю. (2013), Особливості синтезу мікробного полісахариду етаполану за умов росту *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на соняшниковій олії, *Наукові праці НУХТ*, Т.45 №8, С. 43–49.
5. Rigouin C., Delbarre-Ladrat C., Ratiskol J. (2011), Screening of enzymatic activities for the depolymerisation of the marine bacterial exopolysaccharide HE800, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, V.10 №107, pp. 53–62.
6. Олефіренко Ю.Ю. (2012), Вплив екзогенних попередників на реологічні властивості мікробного полісахариду етаполану, *Ukrainian Food Journal*, Т. 1 № 2, С. 31–35.
7. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. (2010), *Інтенсифікація технологій мікробного синтезу*, Київ.
8. Лакин Г.Ф. (1990), *Биометрия*, Москва.

**«Комплевит» – заменитель пантотената для *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 -
продуцента экзополисахарида этаполана**

Николай Ивахнюк, Наталья Гриценко, Татьяна Пирог
Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина

Введение. На сегодняшний день микробные экзополисахариды (ЭПС) являются объектом интенсивных теоретических и прикладных исследований. Одним из перспективных ЭПС является этаполан, синтезированный *Acinetobacter* sp. IMB B-7005. Продуцент этаполана – ауксотроф по пантотенату кальция, промышленное производство которого в Украине и России отсутствует. В связи с этим проводили исследования по поиску витаминных препаратов – заменителей пантотената.

Методы исследования. Культивирование штамма осуществляли на жидкой среде с подсолнечным маслом (1 % об.) и этанолом (1 % об.). В качестве источника пантотената использовали мультивитаминный комплекс «Комплевит».

Результаты и обсуждение. Установлено, что оптимальной для синтеза этаполана концентрацией пантотената в составе «Комплевита» является 0,00085–0,00095 %. При внесении такой концентрации пантотената в среду культивирования *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 с подсолнечным маслом и этанолом концентрация синтезированного полисахарида составляла 5,1 и 9,4 г/л соответственно.

Вывод. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности использования витаминного комплекса «Комплевит» в качестве источника пантотената для продуцента ЭПС *Acinetobacter* sp. IMB B-7005.

Ключевые слова: экзополисахариды, биосинтез, факторы роста, пантотенат кальция.

**«Комплевіт» як заміник пантотенату для *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 – продуцента
екзополісахариду етаполану**

Микола Івахнюк, Наталія Гриценко, Тетяна Пірог
Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

Вступ. На сьогоднішній день мікробні екзополісахариди (ЕПС) є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень. Одним з найперспективніших ЕПС є етаполан, синтезований *Acinetobacter* sp. IMB B-7005. Продуцент етаполану є ауксотрофом за пантотенатом кальцію, промислове виробництво якого в Україні та Росії відсутнє. У зв'язку з цим проводили дослідження з пошуку вітамінних препаратів – заміників пантотенату.

Методи досліджень. Культивування штаму здійснювали на рідкому середовищі із соняшниковою олією (1 %, об'ємна частка) та етанолом (1 %, об'ємна частка). Як джерело пантотенату використовували мультивітамінний комплекс «Комплевіт».

Результати та обговорення. У процесі досліджень встановлено, що оптимальною для синтезу етаполану концентрацією пантотенату у складі «Комплевіту» є 0,00085–0,00095 % (масова частка). За внесення такої концентрації пантотенату у середовище культивування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 з соняшниковою олією та етанолом концентрація синтезованого полісахариду становила 5,1 і 9,4 г/л відповідно.

Висновок. Отже, отримані результати свідчать про можливість використання вітамінного комплексу «Комплевіт» як джерела пантотенату для продуцента ЕПС *Acinetobacter* sp. IMB B-7005.

Ключові слова: екзополісахариди, біосинтез, фактори росту, пантотенат кальцію.