УДК 579.841: 577.114

Особливості синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші фумарату та меляси

Т.П. Пирог, *доктор біологічних наук, завідувач кафедри біотехнології мікробного синтезу, Національний університет харчових технологій*
О.М. Савчук, *магістрант, Національний університет харчових технологій*

Показано можливість заміни глюкози під час культивування продуцента екзополісахариду (ЕПС) етаполану Acinetobacter sp. IMB B-7005 на суміші фумарату і C_6-сполук на дешевший субстрат мелясу. Найвищі показники синтезу ЕПС на суміші фумарату (1,8%) і меляси (0,5% за вуглеводами) спостерігалися у разі виключення з середовища культивування джерела мінерального азоту і використання посівного матеріалу, вирощеного на моносубстраті глюкозі.

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

Показана возможность замены глюкозы при культивировании продуцента экзополисахарида (ЭПС) этаполана Acinetobacter sp. ИМВ B-7005 на смеси фумарата и C_6-соединений на более дешевый субстрат мелассу. Максимальные показатели синтеза ЭПС на смеси фумарата (1,8%) и мелассы (0,5% по углеводам) наблюдались при исключении из среды культивирования источника минерального азота и использовании посевного материала, выращенного на моносубстрате глюкозе.

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

The possibility of replacing the glucose under cultivation of producer exopolysaccharide (EPS) ethapolan Acinetobacter sp. IMV B-7005 on mixture of fumarate and C_6-compounds on cheaper substrate molasse was shown. The highest rates of EPS synthesis on mixture of fumarate (1,8%) and molasses (0,5% carbohydrates) were observed in the case of the exclusion of the mineral nitrogen source from medium cultivation and using inoculum grown on monosubstrate glucose.

Key words: microbial polysaccharide ethapolan, mixotrophic growth, mixture of growth substrates, biosynthesis.

У попередніх дослідженнях [3] було показано можливість синтезу мікробного екзополісахариду (ЕПС) етаполану (продуцент Acinetobacter sp. IMB B-7005 на суміші фумарату натрію і глюкози. Максимальний синтез етаполану (9,3-9,5 г/л) на суміші фумарату (енергетично надлишковий субстрат) і глюкози (енергетично дефіцитний субстрат) відзначався за молярного співвідношення концентрацій фумарату і глюкози 4:1, співвідношення C/N 70,5 і використанні інокуляту, вирощеного на глюкозі.

У працях [1, 2] ми показали, що у процесі росту штаму IMB B-7005 на суміші ацетату і C_6-сполук глюкоза може бути замінена на мелясу. Необхідність такої заміни була зумовлена тим, що при реалізації біотехнологій у промисловому масштабі перевага надається дешевим субстратам, які, як правило, є відходами інших виробництв (харчових, хімічних та ін.).

Меляса якраз і є таким продуктом – відходом цукрового виробництва. Це сиропоподібна рідина темно-бурого кольору зі специфічним запахом, яка містить у своєму складі крім води та мінеральних речовин ще й близько 9 % азотистих сполук та 58-60 % цукрів, що робить її чудовим субстратом для вирощування мікроорганізмів. Відомо, що у біотехнології мелясу використовують для виготовлення спирту, глютамінової та лимонної кислот, а також для вирощування хлібопекарських та кормових дріжджів [5]. У даній технології буде перевірена можливість ще одного застосування меляси у біотехнологічному виробництві – для синтезу промислово цінного продукту – екзополісахариду етаполану. У зв'язку зі своїми емульгувальними властивостями та здатністю змінювати реологічні властивості водних систем етаполан може бути використаний у різних галузях промисловості, зокрема: нафтовидобувній (для ізоляції припливу пластових вод, що збільшує видобуток нафти та істотно зменшує її обводнення); хімічній промисловості та косметології (для виробництва кремів та миючих засобів); рослинництві (для захисту рослин від вірусу тютюнової мозаїки та Х-вірусу картоплі); харчовій промисловості (для виробництво хліба із борошна нижчого ґатунку зі

зменшеним вмістом клейковини) [3].

Мета даної роботи – дослідити можливість заміни глюкози на мелясу під час культивування продуцента етаполану на суміші фумарату і C_6-сполук і встановити умови культивування, що забезпечують підвищення синтезу полісахариду на цьому змішаному субстраті.

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 144 год. на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л): середовище 1: KH_2PO_4 – 3; NH_4Cl – 0,4; $MgSO_4{-}7H_2O$ – 0,4; $CaCl_2{-}2H_2O$ – 0,1; $FeSO_4$ – $7H_2O$ – 0,001; середовище 2: KH_2PO_4 – 3; $MgSO_4{-}7H_2O$ – 0,4; $CaCl_2$ – $2H_2O$ – 0,1; $FeSO_4$ – $7H_2O$ – 0,001. У середовища додатково вносили 0,5% (об'ємна частка) дріжджового автолізату, 0,0006% (масова частка) пантотенату кальцію (вітамін B_5), ністатин та стрептоміцин у концентрації 400 мкг/мл.

Як джерело вуглецю та енергії використовували суміш фумарату натрію (1,8%, масова частка) і меляси (0,5% за вуглеводами), а також суміш фумарату натрію і глюкози (1,8% та 0,5% відповідно). Фумарат натрію вносили у середовище у вигляді 10%-ного розчину.

Початкове pH середовища становило 7,0 (перед внесенням посівного матеріалу середовище підлужнювали 10%-ним розчином калій гідроксиду).

Для запобігання піноутворення в кожну колбу вносили 0,1 мл емульсії піногасника (на 100 мл середовища).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (24 – 48 год.), вирощену на середовищах 1 та 2, які як джерело вуглецю та енергії містили глюкозу (0,5%), мелясу (0,5%), фумарат (0,7%) та суміш фумарату і меляси (0,56 і 0,063% відповідно). Концентрація інокуляту становила 10%.

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

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 переносили на попередньо зважений на аналітичних вагах паперовий фільтр і висушували упродовж доби при кімнатній температурі.

ЕПС-синтезувальну здатність визначали як відношення кількості синтезованих ЕПС до АСБ та виражали в г ЕПС/г АСБ.

Зазначимо, що літературні і наші власні експериментальні дані свідчать про перспективність використання суміші ростових і неростових субстратів для інтенсифікації як росту мікроорганізмів, так і синтезу практично цінних метаболітів [4]. Причому до недавнього часу у літературі в основному були відомості про підвищення тільки синтезу біомаси на змішаних субстратах, і стосувалися вони достатньо обмеженої групи мікроорганізмів, які є об'єктами конкретних промислових технологій. Це насамперед дріжджі *Saccharomyces cerevisiae,* молочнокислі бактерії, бактерії-деструктори важкодоступних органічних сполук. І на теперішній час основні дослідження з цієї проблеми присвячені дріжджам-сахароміцетам у зв'язку з використанням їх для одержання біоетанолу з рослинної біомаси. У даному разі основні зусилля дослідників спрямовані на вирішення проблеми одночасної утилізації дріжджами глюкози і ксилози. Разом з тим останніми роками з'явилися дані про інтенсифікацію синтезу на змішаних субстратах амінокислоти валіну (продуцент *Corynebacterium glutamicum* [6]), антибіотика пеніциліну (продуцент *Penicillium chrysogenum* [8]). Цікаво зазначити, що на сьогодні рослинна біомаса розглядається не тільки як перспективний субстрат для одержання біоетанолу, а й як сировина для виробництва мікробного полі-

Таблиця 1

Синтез етаполану за умов росту Acinetobacter sp. IMB B-7005 на суміші фумарату і C_6-сполук

Середовище культивування	Субстрат	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г біомаси
1 (без NH_4Cl)	Фумарат + глюкоза	9,3±0,45	11,6±0,58
	Фумарат + меляса	10,5±0,50	6,5±0,32
2 (без NH_4Cl)	Фумарат + меляса	11,0±0,55	15,7±0,78

Примітка. Інокулят вирощений на середовищі 1.

Таблиця 2

Зміна показників синтезу етаполану на безазотному середовищі з фумаратом і мелясою

Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	АСБ, % від контролю	ЕПС, % від контролю	ЕПС-синтезувальна здатність, % від контролю
Глюкоза	37±1,8	105±5,3	284±14,2
Меляса	57±2,8	114±5,7	196±9,8
Фумарат	54±2,7	118±5,9	217±10,8
Фумарат + меляса	76±3,8	110±5,5	139±6,9

Примітка. За 100 % прийнято показники росту і синтезу ЕПС на середовищі 1. Інокулят вирощений на середовищі 2.

сахариду ксантану (продуцент *Xanthomonas campestris*) [7]. У зв'язку з цим проводяться дослідження росту і синтезу *X. campestris* на суміші глюкози і ксилози, а також встановлення умов культивування бактерій, які б забезпечили максимальну трансформацію вуглецю обох вуглеводів у полісахарид [7]. Проте дотепер авторам не вдалося вирішити проблему ефективного засвоєння *X. campestris* ксилози з суміші з глюкозою. Разом з тим за умов росту продуцента на суміші глюкози і ксилози синтезувався ксантан з покращеними реологічними властивостями [7].

На першому етапі ми досліджували синтез етаполану на суміші фумарату і глюкози, фумарату і меляси з використанням посівного матеріалу, вирощеного на глюкозі (**табл. 1**).

Як видно з наведених у **таблиці 1** даних, заміна глюкози на мелясу у середовищі 1 супроводжувалася незначним (на 8-9%) підвищенням кількості синтезованого етаполану, проте у цьому разі спостерігали суттєве зростання рівня біомаси, що призвело до зниження ЕПС-синтезувальної здатності майже у два рази (з 11,6 до 6,5 г ЕПС/ г біомаси).

Ми припустили, що це явище зумовлене наявністю у середовищі 1 як мінерального джерела азоту (у вигляді з NH_4Cl), так і азоту, що входить до складу меляси. Відомо, що меляса містить до 1,8% азоту, третя частина якого перебуває у формі бетаїну, що практично не засвоюється мікроорганізмами. Отже, концентрація доступного для бактерій азоту меляси становить близько 0,8-1,2%. Враховуючи концентрацію меляси у середовищі культивування Acinetobacter sp. IMB B-7005 (0,5% за вуглеводами), вміст «мелясного» азоту (за елементом N) середовищі 1 становить 0,1 г/л. Така сама кількість азоту міститься в 0,4 г/л NH_4Cl. Отже, рівень біомаси за умов росту продуцента етаполану на середовищі 1 з фумаратом і мелясою повинен бути удвічі вищим, ніж на аналогічному середовищі з фумаратом і глюкозою. Власне, ці теоретичні розрахунки й були підтверджені експериментально (див. **табл. 1**).

Таким чином, для підвищення ефективності синтезу етаполану у разі використання як субстрату суміші фумарату і меляси культивування Acinetobacter sp. IMB B-7005 слід здійснювати на середовищі 2, яке не містить мінерального джерела азотного живлення. Наступні дослідження підтвердили цей висновок. Дані, наведені у **таблиці 1**, засвідчують, що під час вирощування продуцента етаполану на середовищі 2 з фумаратом і мелясою ЕПС-синтезувальна здатність підвищувалася у 2,4 рази порівняно з культивуванням на середовищі 1.

У **таблиці 2** наведено дані відносного збільшення показників росту і синтезу етаполану на середовищі 2 за використ-

Таблиця 3

Залежність синтезу етаполану на суміші фумарату і меляси від способу підготовки посівного матеріалу

Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	ЕПС, % від контролю	ЕПС-синтезувальна здатність, % від контролю
Меляса	110±5,5	57±2,8
Фумарат	115±5,7	62±3,1
Фумарат + меляса	115±5,7	55±2,7

Примітка. Культивування і одержання інокуляту здійснювали на середовищі 2. За 100% прийнято показники росту і синтезу ЕПС у разі використання глюкози як джерела вуглецю для одержання посівного матеріалу.

тання посівного матеріалу різної якості.

Ці дані ще раз підтверджують, що виключення з середовища культивування продуцента етаполану мінерального джерела азотного живлення супроводжувалося зниженням рівня біомаси і підвищенням показників синтезу полісахариду. Причому така закономірність спостерігалася незалежно від способу підготовки посівного матеріалу.

Виявилось цікавим, що найвища ЕПС-синтезувальна здатність була досягнута у разі використання інокуляту, вирощеного на глюкозі, а найнижча – із застосуванням посівного матеріалу, одержаного на середовищі з фумаратом і мелясою. У даних експериментах посівний матеріал вирощували на середовищі 1. Оскільки на середовищі 2 (без мінерального азоту) показники синтезу етаполану підвищувалися порівняно з культивуванням бактерій на середовищі 1, ми припустили, що можна досягти ще більшої ефективності процесу, якщо з середовища для одержання посівного матеріалу виключити мінеральний азот. Отже, на наступному етапі визначали оптимальний спосіб підготовки посівного матеріалу, що забезпечує максимальний синтез етаполану на суміші фумарату і меляси (**табл. 3**).

Як видно з наведених у таблиці 3 даних, у разі використання інокуляту, вирощеного на мелясі, фумараті або їх суміші, спостерігали підвищення на 10-17 % кількості синтезованого етаполану, проте у цьому разі суттєво (на 38-45%) знижувалася ЕПС-синтезувальна здатність порівняно із застосуванням посівного матеріалу, вирощеного на глюкозі.

ВИСНОВКИ

Отже, в результаті проведеної роботи встановлено, що за умов росту Acinetobacter sp. IMB B-7005 на суміші фумарату і меляси кількість синтезованого етаполану збільшується на 8-9 % порівняно з культивуванням на суміші фумарату та глюкози, тобто використання дешевшого субстрату є вигіднішим для виробництва. Вилучення джерела мінерального азоту із середовища культивування супроводжувалося зниженням у два рази рівня біомаси, підвищенням кількості синтезованого етаполану на 5-18%, а ЕПС-синтезувальної здатності – на 39-184%. Найвищі показники синтезу етаполану на суміші фумарату і меляси досягалися у разі використання інокуляту, вирощеного на моносубстраті глюкозі.

Список використаних джерел

1. *Пирог Т.П., Савчук О.М., Мучник Ф.В.* Інтенсифікація синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші ацетату і меляси // Харчова промисловість. – 2010, № 9.– С. 52–54.

2. *Пирог Т.П., Іванушкіна А.О., Гарбарчук С.О.* Синтез полісахариду етаполану на суміші ацетату і меляси залежно від умов культивування Acinetobacter sp. B-7005 // Наукові праці НУХТ. – 2011 (У друці).

3. *Пирог Т.П., Корж Ю.В.* Етаполан – мікробний екзополісахарид мультифункціонального призначення // Біополімери і клітина. – 2006. – Т. 22, № 3. – С. 171-183.

4. *Подгорский В.С., Иутинская Г.О., Пирог Т.П.* Интенсификация технологий микробного синтеза. К. : Наук. думка, 2010. – 327 с.

5. *Щербаков А.О.* Технології переробки та використання вторинних матеріальних ресурсів / ресурсозберігаючі технології /. Навч. посібник – Тернопіль: Астон, 1997. – 291 с.

6. *Krause F.S., Henrich A., Blombach B., Kramer R., Eikmanns B.J., Seibold G.M.* Increased glucose utilization in Corynebacterium glutamicum by use maltose, and its applications for the improvement of L-valine productivity // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 76, № 1. – P. 370-374.

7. *Zhang Z., Chen H.* Fermantation performance and structure characteristics of xanthan produced by Xanthomonas campestris with a glucose/xylose mixture // Appl. Biochem. Biotechnol. - 2010. – Vol. 160. – P. 1653-1663.

8. *Zhao Z., Kuijvenhoven K., van Gulik W.M., Heijnen J.J., van Winden W.A., Verheijen P.J.T.* Cytosolic NADPH balancing in Penicillium chrysogenum cultivated on mixtures of glucose and ethanol // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2011. – Vol. 89, № 1. – P. 63-72.