УДК 579.841: 577.114

SYNTHESIS OF ETHAPOLAN EXOPOLYSACCHARIDE ON THE BASIS OF SUNFLOWER OIL DEPENDING ON INOCULUM QUALITY

T. Pirog, Yu. Olefirenko
National University of Food Technologies

Key words:
Acinetobacter sp. IMB B-7005 Ethapolan Microbial exopolysaccharides Inoculum Precursor of biosynthesis Oil-containing substrates Cultivation

Article history:
Received 25.09.2014
Received in revised form 16.10.2014
Accepted 24.11.2014

Corresponding author:
T. Pirog
E-mail:
tapirog@nuft.edu.ua

ABSTRACT

The effect of nature of carbon and energy source in the medium for inoculum obtaining, as well as exogenous biosynthetic precursors for the formation of microbial exopolysaccharide ethapolan when *Acinetobacter sp*. IMV B-7005 grown in the meduim with sunflower oil was investigated. When adding the strain IMV B-7005 to a medium containing sunflower oil (2 % v/v) glucose (0,05 %) or fumarate (0,05 %) at the beginning of stationary growth phase and when applying the inoculum grown on fumarate and glucose respectively, the concentration of synthesized ethapolan was 10—15 % higher than when using inoculum grown on sunflower oil and 55—85 % higher than using the medium without precursors. The ethapolan concentration under cultivation of *Acinetobacter sp*. B-7005 IMV in a medium containing sunflower oil after adding a mixture of fumarate (0,05 %) and glucose (0,05 %) as precursors was 60—70 % higher in comparison with that in the medium without glucose and fumarate and almost did not depend on the nature of carbon source in the medium for obtaining the inoculum (sunflower seed oil, glucose, fumarate).

СИНТЕЗ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА СОНЯШНИКОВІЙ ОЛІЇ ЗАЛЕЖНО ВІД ЯКОСТІ ІНОКУЛЯТУ

Т.П. Пирог, Ю.Ю. Олефіренко
Національний університет харчових технологій

У статті досліджено вплив природи джерела вуглецю й енергії у середовищі для одержання посівного матеріалу, а також екзогенних попередників біосинтезу на утворення мікробного екзополісахариду етаполану за умов росту Acinetobacter sp. IMB B-7005 на соняшниковій олії. У разі внесення на початку стаціонарної фази росту штаму IMB B-7005 у середовище із соняшниковою олією (2 %, об'ємна частка) глюкози (0,05 %) або фумарату (0,05 %) і застосування інокуляту, вирощеного на фумараті й глюкозі відповідно, концентрація синтезованого етаполану була на 10—15 % вищою, ніж за використання посівного матеріалу, вирощеного на соняшниковій олії, і на

55—85 % вищою, ніж на середовищі без попередників. Концентрація етаполану за умов росту Acinetobacter sp. IMB B-7005 на соняшниковій олії з внесенням як попередників суміші фумарату (0,05 %) і глюкози (0,05 %) була на 60—70 % вищою порівняно з такою ж на середовищі без глюкози і фумарату й практично не залежала від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту (соняшникова олія, глюкоза, фумарат).

Ключові слова: *Acinetobacter sp. IMB B-7005, етаполан, мікробні екзополісахариди, інокулят, попередники біосинтезу, олієвмісні субстрати, культивування.*

Упродовж останніх 20—30 років мікробні екзополісахариди (ЕПС — високомолекулярні екзогенні полімери вуглеводної природи) є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень [1—5]. Здатність розчинів мікробних ЕПС до гелеутворення, емульгування, суспендування, змінення реологічних характеристик водних систем зумовили широке використання цих біополімерів у нафто- і гірничовидобувній, текстильній, харчовій, фармацевтичній, хімічній промисловості, сільському господарстві і медицині. Мікробні ЕПС мають ряд переваг порівняно з полісахаридами рослинного походження. Так, ці біополімери можна отримувати в потрібних об'ємах незалежно від пори року і кліматичних умов. Економічна доцільність використання мікробних ЕПС зумовлена їх позаклітинною природою і високою продуктивністю синтезу на дешевих субстратах [1—5]. На відміну від хімічних полімерів (поліакриламід), мікробні ЕПС стійкі до температурної, окисної, механічної деструкції, але піддаються біологічній деградації і є нетоксичними, що робить екологічно безпечним їх застосування, наприклад, у нафтодобуванні.

Здатність до синтезу ЕПС виявлено у багатьох мікроорганізмів, проте рівень синтезу цих полімерів коливається в широких межах як для різних продуцентів ЕПС, так і для одного продуцента в різних умовах його культивування [1—5].

В Інституті мікробіології і вірусології НАН України селекціоновано штам бактерій *Acinetobacter sp.* — продуцент комплексного полісахаридного препарату етаполану [1]. Штам зареєстрований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України за номером IMB B-7005. Етаполан завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям можна розглядати як полісахарид мультифункціонального призначення, який може бути використаний у нафтодобувній, харчовій, хімічній промисловості як загущувальний, стабілізувальний, емульгувальний і суспендувальний агент. На основі етаполану розроблено спосіб ізоляції притоку пластових вод, який дає змогу при застосуванні 1 т етаполану видобути додатково до 240 т нафти та знизити її обводнення з 84 до 15 %. З використанням етаполану як головної складової частини розроблено технології виготовлення косметичних кремів під загальною назвою «Екол», технічного мийного засобу «БІМС-1». Завдяки здатності адсорбувати та виводити з організму солі важких металів етаполан може входити до рецептури хлібопродуктів, рекомендованих для профілактичного харчування [1].

Сутєвою перевагою етаполану, порівняно з відомими у світі мікробними екзополісахаридами, є можливість його біосинтезу за умов росту продуцента

на широкому наборі вуглеводних і невуглеводних моно- і змішаних субстратів. Нещодавно було встановлено можливість інтенсифікації синтезу етаполану внесенням у середовище культивування *Acinetobacter sp.* IMB B-7005 із соняшниковою олією екзогенних попередників (глюкоза і фумарат) [6]. У цих дослідженнях посівний матеріал вирощували на середовищі із соняшниковою олією.

Оскільки ефективність мікробних технологій залежить від якості інокуляту, що використовувався, **мета дослідження** полягає у вивченні впливу природи джерела вуглецю у середовищі для одержання посівного матеріалу на синтез етаполану за умов росту *Acinetobacter sp.* IMB B-7005 на соняшниковій олії.

Методи дослідження. *Acinetobacter sp.* IMB B-7005 вирощували на середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 — 6,8; KOH — 0,9; NH_4NO_3 — 0,4; $MgSO_4{\times}7H_2O$ — 0,4; $CaCl_2{\times}2H_2O$ — 0,1; $FeSO_4{\times}7H_2O$ — 0,001. У середовище додатково вносили 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізату та 0,0006 % (масова частка) пантотенату кальцію. Як джерело вуглецю й енергії використовували соняшникову олію (0,8—1,2 %, об'ємна частка). На початку стаціонарної фази росту (72 год) у середовище вносили 0,05 % (масова частка) фумарату у вигляді 10-відсоткового розчину фумарату натрію, 0,05 % (масова частка) глюкози, а також суміш глюкози і фумарату масовою часткою 0,05 %. Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (24 год), вирощену на мінеральному середовищі наведеного вище складу, що містило як джерело вуглецевого живлення соняшникову олію (0,5 %, об'ємна частка), глюкозу (0,05 %, масова частка) фумарат (0,05 %, масова частка). Кількість посівного матеріалу становила 10 %. Культивування здійснювали у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при 30 °С упродовж 120 год.

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з подальшим перерахунком на абсолютно суху біомасу клітин (АСБ) згідно з калібрувальним графіком. Ефективність трансформації вуглецю субстратів в ЕПС оцінювали за такими показниками: кількість синтезованих ЕПС і ЕПС-синтезувальна здатність. Кількість синтезованого екзополісахариду встановлювали ваговим методом: ЕПС осаджували з культуральної рідини ізопропанолом, осад промивали у чистому ізопропанолі і висушували при кімнатній температурі упродовж доби. ЕПС-синтезувальну здатність розраховували як відношення кількості синтезованого ЕПС до біомаси та виражали у г ЕПС/г АСБ.

Результати і обговорення. Зазвичай у біотехнологічних процесах з метою скорочення тривалості лаг-фази й одержання інокуляту процес виробничого біосинтезу здійснюють на середовищах однакового складу (з одним і тим самим джерелом вуглецевого живлення). Наші попередні дослідження [1] показали, що під час культивування *Acinetobacter sp.* B-7005 не тільки на суміші C_2—C_6-субстратів, а й на моносубстраті глюкозі найвищі показники синтезу етаполану спостерігалися за використання інокуляту, вирощеного на C_2-сполуках. Встановлено, що застосування такого посівного матеріалу призводить до посилення глюконеогенетичної гілки обміну речовин у клітинах продуцента етаполану, а отже, й підвищення синтезу ЕПС. Крім того, використання інокуляту, вирощеного на ацетаті, дало змогу усунути лімітування метаболізму ацетату під час культивування *Acinetobacter sp.* B-7005 на етанолі, а також суміші етанолу і глюкози [1].

У табл. 1 наведено результати синтезу етаполану на середовищі із соняшниковою олією і використання як попередника біосинтезу глюкози залежно від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання посівного матеріалу.

Таблиця 1. **Вплив глюкози (0,05 %) і природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту на синтез етаполану на середовищі з різним вмістом соняшникової олії**

Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	Концентрація соняшникової олії, %	ЕПС (г/л), % від контролю
Соняшникова олія	0,8	155
	0,9	165
	1,0	170
	1,1	170
	1,2	150
Фумарат	0,8	170
	0,9	180
	1,0	185
	1,1	180
	1,2	170

Примітка. Контроль (100 %) — показники синтезу ЕПС на середовищі без глюкози. У процесі визначення концентрації ЕПС похибка не перевищувала 5 %.

Результати, наведені у табл. 1, засвідчують, що найвищі показники синтезу спостерігалися за концентрації соняшникової олії у середовищі 1,0 % і використанні інокуляту, вирощеного на фумараті. Слід зазначити, що незалежно від способу підготовки посівного матеріалу, у разі внесення глюкози в олієвмісне середовище, концентрація ЕПС була на 50—85 % вищою порівняно з показниками культивування без додавання попередника.

У наступних експериментах як попередник біосинтезу використовували фумарат, а інокулят вирощували на середовищі із соняшниковою олією і глюкозою (табл. 2).

Таблиця 2. **Вплив фумарату (0,05 %) і природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту на синтез етаполану на соняшниковій олії**

Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	Концентрація соняшникової олії, %	ЕПС (г/л), % від контролю
Соняшникова олія	0,8	130
	0,9	140
	1,0	145
	1,1	145
	1,2	130
Глюкоза	0,8	140
	0,9	150
	1,0	155
	1,1	150
	1,2	140

Примітка. Контроль (100 %) — показники синтезу ЕПС на середовищі без фумарату. У процесі визначення концентрації ЕПС похибка не перевищувала 5 %.

За таких умов культивування концентрація синтезованого ЕПС була на 30—55 % вищою, ніж на середовищі без фумарату і досягала максимуму за концентрації олії 1,0 %, а показники синтезу були практично однаковими за використання інокуляту, вирощеного як на олії, так і на глюкозі (табл. 2).

У табл. 3 наведено дані про утворення етаполану за використання як попередників біосинтезу суміші фумарату і глюкози та посівного матеріалу, вирощеного на олії, глюкозі або фумараті.

Дані, наведені у табл. 3, засвідчують, що за внесення суміші фумарату і глюкози в олієвмісне середовище показники синтезу етаполану практично не залежали від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту.

Таблиця 3. **Синтез етаполану на соняшниковій олії (1,0 %) за наявності глюкози (0,05 %) і фумарату (0,05 %) залежно від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту**

Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	ЕПС (г/л), % від контролю	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г біомаси
Глюкоза	165	116
Фумарат	160	105
Соняшникова олія	170	110

Примітка. Контроль (100 %) — показники синтезу ЕПС на середовищі без глюкози і фумарату. У процесі визначення концентрації ЕПС і ЕПС-синтезувальної здатності похибка не перевищувала 5 %.

Позитивний вплив посівного матеріалу, вирощеного на фумараті або глюкозі, на синтез етаполану за умов росту продуцента на соняшниковій олії може бути пояснений тим, що глюкоза входить до складу цього полісахариду і безпосередньо включається у молекулу синтезованого ЕПС, а фумарат (C_4-дикарбонова кислота) є попередником глюконеогенезу.

Схожі результаті були отримані нами під час дослідження якості інокуляту на синтез поверхнево-активних речовин (ПАР) за умов росту *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241*, Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 *і Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на олієвмісних субстратах [7, 8]. Показано, що найвищі показники синтезу ПАР гліколіпідної природи спостерігалися на пересмаженій соняшниковій олії з використанням інокуляту, вирощеного на вуглеводних субстратах (меляса, глюкоза). Крім того, ці дослідження показали можливість інтенсифікації у 2—4 рази синтезу ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 на пересмаженій олії (2 %, об'ємна частка) за внесення у середовище 0,1 % глюкози, яка є складовою трегалозоміколатів — основних компонентів комплексу поверхнево-активних речовин, синтезованих штамами IMB Ac-5017 і IMB B-7405 [7, 8].

Висновки

Отже, максимальні показники синтезу мікробного полісахариду етаполану на соняшниковій олії за внесення у середовище як попередника біосинтезу глюкози спостерігалися за використання інокуляту, вирощеного на фумараті. За наявності в олієвмісному середовищі фумарату як попередника біосинтетичних процесів найвищий синтез ЕПС досягався у разі вирощування посівного матеріалу на глюкозі.

Література

1. *Підгорський В.С.* Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог. — К.: Наук. думка, 2010. — 327 с.

2. *Bernal P., Llamas M.A.* Promising biotechnological applications of antibiofilm exopolysaccharides // Microb. Biotechnol. — 2012. — Vol. 5, # 6. — P. 670—673. doi: 10.1111/j.1751-7915.2012.00359.x.

3. *Kaur V., Bera M.B., Panesar P.S., Kumar H., Kennedy J.F.* Welan gum: Microbial production, characterization, and applications // Int. J. Biol. Macromol. — 2014. — doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.01.061.

4. *Galle S., Arendt E.K.* Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. — 2014. — Vol. 54, # 7. — P. 891—901. doi: 10.1080/10408398.2011.617474.

5. *Prajapati V.D., Jani G.K., Zala B.S., Khutliwala T.A.* An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer // Carbohydr. Polym. — 2013. — Vol. 93, # 2. — P. 670—678. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.01.030.

6. *Олефіренко Ю.Ю.* Особливості біосинтезу мікробного екзополісахариду етаполану за умов росту *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на соняшниковій олії / Ю.Ю. Олефіренко // Наукові праці НУХТ. — 2013. — № 48. — С. 80—85.

7. *Pirog T., Sofilkanych A., ShevchukT., Shulyakova M.* Biosurfactants of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017: Synthesis Intensification and Practical Application // Appl Biochem Biotechnol. — 2013. — Vol. 170, # 4. — P. 880—894. doi: 10.1007/s12010-013-0246-7.

8. *Пирог Т.П.* Синтез поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Ainetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на промышленных отходах / Т.П. Пирог, А.П. Софилканич, К.А. Покора [та ін] // Микроб. журнал. — 2014. — Т. 76, № 2. — С. 18—24.

СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА НА ПОДСОЛНЕЧНОМ МАСЛЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КАЧЕСТВА ИНОКУЛЯТА

Т.П. Пирог, Ю.Ю. Олефиренко
Национальный университет пищевых технологий

В статье исследовано влияние природы источника углерода и энергии в среде для получения посевного материала, а также экзогенных предшественников биосинтеза на образование микробного экзополисахарида этаполана при выращивании Acinetobacter sp. IMB B-7005 на подсолнечном масле. При внесении вначале стационарной фазы роста штамма IMB B-7005 в среду с подсолнечным маслом (2 % по объему) глюкозы (0,05 %) или фумарата (0,05 %) и применении инокулята, выращенного на фумарате и глюкозе соответственно, концентрация синтезированного этаполана была на 10—15 % выше, чем при использовании посевного материала, выращенного на подсолнечном масле и на 55—85 % выше, чем на среде без предшественников. Концентрация этаполана при культивировании Acinetobacter sp. IMB B-7005 на подсол-

нечном масле с внесением в качестве предшественников смеси фумарата (0,05 %) и глюкозы (0,05 %) была на 60—70 % выше по сравнению с таковой на среде без глюкозы и фумарата и практически не зависела от природы источника углерода в среде для получения инокулята (подсолнечное масло, глюкоза, фумарат).

Ключевые слова: *Acinetobacter sp. IMB B-7005, этаполан, микробные экзополисахариды, инокулят, предшественники биосинтеза, маслосодержащие субстраты, культивирование.*