

УДК 579.841: 577.114

FEATURES OF POLYSACCHARIDE ETHAPOLAN SYNTHESIS ON MOLASSES AND SUNFLOWER OIL MIXTURE

A. Voronenko, M. Ivakhniuk, T. Pirog
National University of Food Technologies

Key words: <i>Acinetobacter sp. IMV B-7005</i> <i>Ethapolan</i> <i>Biosynthesis</i> <i>Mixture of molasses and sunflower oil</i>	ABSTRACT The influence of monosubstrates concentration in a mixture and nitrogen source in a medium are examined in this paper, as well as the method of inoculum preparation on ethapolan exopolysaccharide (EPS) synthesis under cultivation of <i>Acinetobacter sp. IMV B-7005</i> on molasses and sunflower oil mixture. The highest synthesis indices (the amount of EPS 14.4 g/l, EPS-synthesizing ability 3.0 g EPS/g biomass) were observed during the growth of IMV B-7005 strain in a medium containing molasses (1.5% of carbohydrates) and oil (1.5% v/v) without the source of mineral nitrogen and using the inoculum grown in the medium with molasses (0.5%), in which the content of NH_4NO_3 was decreased twofold (up to 0.2 g/l).
Article history: Received 01.09.2016 Received in revised form 16.09.2016 Accepted 03.10.2016	
Corresponding author: A. Voronenko E-mail: npnuht@ukr.net	

ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ МЕЛЯСИ І СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ

A.A. Вороненко, М.О. Івахнюк, Т.П. Пирог
Національний університет харчових технологій

У статті досліджено вплив концентрацій моносубстратів у суміші, вмісту джерела азотного живлення в середовищі, а також способу підготовки інокуляту на синтез екзополісахариду (ЕПС) етаполану в процесі культивування *Acinetobacter sp. IMV B-7005* на суміші меляси та соняшникової олії. Найвищі показники синтезу (кількість синтезованих ЕПС 14,4 г/л, ЕПС-синтезувальна здатність 3,0 г ЕПС/г біомаси) спостерігалися за умов росту штаму *IMV B-7005* у середовищі з мелясою (масовою часткою 1,5% за вуглеводами) та олією (об'ємною часткою 1,5%) без джерела мінерального азоту з використанням посівного матеріалу, вирошеного у середовищі з мелясою (0,5%), в якому вміст NH_4NO_3 знижено у два рази (до 0,2 г/л).

Ключові слова: *Acinetobacter sp. IMV B-7005*, етаполан, біосинтез, суміш меляси та соняшникової олії.

Постановка проблеми. Мікробні екзополісахариди (ЕПС) — це високомолекулярні екзогенні продукти метаболізму мікроорганізмів вуглеводної природи, що мають ряд переваг порівняно з хімічними аналогами. Завдяки

здатності їхніх розчинів до гелеутворення, емульгування і змінення реологічних характеристик водних систем ЕПС широко застосовуються у різних галузях промисловості [4; 8; 15]. Зазначимо, що, незважаючи на тривалу історію вивчення мікробних ЕПС, для їх одержання до теперішнього часу використовують в основному тільки вуглеводні субстрати.

Суттєвою перевагою мікробного полісахариду етаполану (продуцент *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005), порівняно з відомими у світі ЕПС, є можливість його одержання на широкому наборі різноманітних С₂-С₆-субстратів (вуглеводи, етанол, ацетат, органічні кислоти) [15]. Нещодавно було встановлено можливість біосинтезу етаполану і на олієвмісних субстратах [3; 12].

Одним із підходів до інтенсифікації технологій мікробного синтезу є використання суміші ростових субстратів [14; 15]. За одночасного споживання мікроорганізмами суміші субстратів часто спостерігають підвищення рівня біомаси, швидкості росту, скорочення тривалості лаг-фази, що можуть бути зумовлені: 1) використанням одного з субстратів як додаткового джерела енергії; 2) одночасним використанням обох субстратів як в енергетичному, так і в конструктивному метаболізмі; 3) розширенням «вузьких місць» метаболізму моносубстрату за рахунок введення допоміжного субстрату [14; 15].

Раніше [13] було встановлено можливість інтенсифікації синтезу етаполану на суміші енергетично нерівноцінних (етанол і глюкоза, фумарат і глюкоза) та енергетично дефіцитних (ацетат і глюкоза) ростових субстратах. Подальші дослідження дали змогу замінити глюкозу у змішаних С₂-С₆-субстратах на мелясу — побічний продукт цукрового виробництва [13]. Так, при культивуванні *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші меляси (масовою часткою 0,75% за вуглеводами) та етанолу (об'ємною часткою 0,75%) кількість синтезованих ЕПС підвищувалася в 1,3 раза порівняно з показниками на моносубстраті мелясі [13].

Метою статті є дослідження можливості синтезу етаполану на суміші меляси та соняшникової олії.

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

Штам ІМВ В-7005 вирощували на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): КН₂Р₀₄ — 6,8; КОН — 0,9; MgSO₄×7 Н₂О — 0,4; СаСl₂×2Н₂О — 0,1; NH₄NO₃ — 0,4; FeSO₄×7 Н₂О — 0,001. В одному з варіантів концентрацію нітрату амонію у середовищі знижували до 0,2 і 0 г/л.

У середовище додатково вносили 0,5% (об'ємна частка) дріжджового автолізу, ністатин і стрептоміцин у концентрації 400 мкг/мл, а також мультивітамінний комплекс «Комплевіт» в концентрації 0,00085% (масова частка в перерахунку на пантотенат).

Як джерело вуглецю й енергії використовували моносубстрати (рафінована соняшникова олія об'ємною часткою 0,8—2,4%, меляса масовою часткою 1,3—3,9% за вуглеводами), а також суміш меляси (масовою часткою 0,5—1,5% за вуглеводами) та соняшникової олії (об'ємною часткою 0,5—1,5 %).

Оскільки продуцент етаполану не асимілює сахарозу, мелясу попередньо гідролізували: до 100 г меляси додавали дистильовану воду до кінцевого

об'єму 200 мл, в отриманий розчин вносили 20 мл 1 н H_2SO_4 (до рН 4,0) і стерилізували при 112°C протягом 30 хв.

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі, що містило як джерело вуглецю й енергії соняшникову олію (0,5%), мелясу (0,5%), а також суміш меляси (0,25%) та соняшникової олії (0,25%). Концентрація посівного матеріалу становила 10%.

Культивування штаму ІМВ В-7005 здійснювали в колбах (750 мл) із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при температурі 30°C упродовж 120 год.

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з подальшим перерахунком на абсолютно суху біомасу (АСБ) згідно 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 промивали чистим ізопропанолом і висушували при кімнатній температурі упродовж 24 год. ЕПС-синтезувальну здатність розраховували як відношення концентрації ЕПС до концентрації АСБ та виражали у г ЕПС/ г АСБ.

Статистичну обробку даних проводили за Лакінім [10]. Результати досліджень згідно з t-критерієм Стьюдента виявилися статистично достовірними при 5-відсотковому рівні значимості.

Результати і обговорення. На першому етапі досліджували принципову можливість використання суміші меляси та соняшникової олії для синтезу полісахариду етаполану (табл. 1). У цих експериментах посівний матеріал вирощували на моно- (олія, меляса) та змішаному субстратах.

Встановлено, що незалежно від природи джерела вуглецевого живлення у середовищі для одержання інокуляту концентрація ЕПС та ЕПС-синтезувальна становили 2,1—2,5 г/л і 0,6—0,8 г ЕПС/ г АСБ відповідно і були нижчими порівняно з одержаними раніше на суміші ростових C_2 - C_6 -субстратів [15]. Проте за використання інокуляту, вирощеного на мелясі, показники синтезу етаполану були дещо вищими, ніж у разі застосування посівного матеріалу, отриманого на соняшниковій олії чи суміші субстратів (див. табл. 1), тому у наступних експериментах інокулят вирощували на мелясі.

Оскільки за низької концентрації моносубстратів у суміші (по 0,5%) концентрація етаполану була недостатньо високою, у подальших дослідженнях підвищували концентрацію меляси та соняшникової олії у суміші (табл. 2).

Таблиця 1. Показники синтезу етаполану на суміші меляси і соняшникової олії залежно від способу підготовки інокуляту

Концентрація субстрату для синтезу ЕПС, %	Субстрат для одержання інокуляту, %	Показники синтезу	
		ЕПС, г/л	г ЕПС/ г АСБ
Меляса, 0,5 + олія, 0,5	Меляса, 0,5	2,5±0,13	0,8±0,04
	Олія, 0,5	2,0±0,10	0,7±0,04
	Меляса, 0,25 + олія, 0,25	2,1±0,11	0,6±0,03

Примітка. Табл. 1 і 2: концентрація NH_4NO_3 у середовищі культивування становила 0,4 г/л.

З наведених у табл. 2 даних видно, що збільшення концентрації моносубстратів у 3 рази супроводжувалося підвищенням кількості синтезованих

ЕПС більш ніж у 5 разів (до 13,3 г/л), а ЕПС-синтезувальної здатності — майже у 2,8 раза (до 2,2 г ЕПС/г АСБ).

Слід зазначити, що концентрація етаполану в процесі культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші глюкози (м'яси) з етанолом, фумаратом, ацетатом не перевищувала 9—11 г/л [13, 15].

Таблиця 2. Синтез етаполану залежно від концентрації м'яси і олії в суміші

Концентрація субстрату для синтезу ЕПС, %	Показники синтезу	
	ЕПС, г/л	г ЕПС/ г АСБ
М'яса, 0,5 + олія 0,5	2,5±0,13	0,8±0,04
М'яса, 1,0 + олія 1,0	7,5±0,38	1,8±0,09
М'яса, 1,5 + олія 1,5	13,3±0,67	2,2±0,11

Відомо, що для оптимального синтезу ЕПС суттєве значення має співвідношення вуглецю і азоту (С/N) у середовищі культивування продуцента [15]. У попередніх дослідженнях було показано, що виключення або зниження концентрації мінерального джерела азотного живлення при рості штаму ІМВ В-7005 на суміші м'яси і С₂-С₄-субстратів супроводжувалося підвищенням кількості синтезованих ЕПС і зниженням рівня біомаси [13]. Це зумовлено тим, що м'яса може бути додатковим джерелом азотного живлення, оскільки містить близько 1% доступного для мікроорганізмів азоту [11]. Зважаючи на це, на наступному етапі визначали оптимальну концентрацію джерела мінерального азоту в середовищі для одержання інокуляту та біосинтезу етаполану за умов росту штаму *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші м'яси й соняшникової олії.

З наведених у табл. 3 даних видно, що зниження концентрації нітрату амонію з 0,4 г/л (базове середовище) до 0—0,2 г/л супроводжувалося збільшенням показників синтезу етаполану. Так, у разі виключення із середовища для біосинтезу ЕПС мінерального джерела азоту і використання інокуляту, вирощеного на середовищі з 0,2 г/л NH₄NO₃, концентрація етаполану становила 14,4 г/л, а ЕПС-синтезувальна здатність — 3,0 г ЕПС/ г АСБ.

*Таблиця 3. Вплив концентрації джерела азоту в середовищі на синтез етаполану за умов росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші м'яси і олії*

Концентрація NH ₄ NO ₃ у середовищі		Показники синтезу	
для біосинтезу етаполану, г/л	для одержання інокуляту, г/л	ЕПС, г/л	г ЕПС/ г АСБ
0	0	13,3±0,66	2,2±0,11
	0,2	14,4±0,72	3,0±0,15
	0,4	14,1±0,71	2,9±0,14
0,2	0	14,1±0,70	2,8±0,14
	0,2	13,9±0,69	2,7±0,13
	0,4	13,7±0,69	2,4±0,12
0,4	0	13,3±0,66	2,4±0,12
	0,2	13,4±0,67	2,4±0,12
	0,4	13,3±0,66	2,2±0,11

Варто зауважити, що наразі у промисловому виробництві ЕПС використовують в основному тільки вуглеводні субстрати, які зазвичай є продуктами,

отриманими з цукрових буряків: меляса, цукровий сироп, сахароза; або з кукурудзи: крохмаль, гідролізований крохмаль, глюкозний сироп, глюкоза, мальтоза [1; 5; 15].

Дослідження, проведені в 70—80-х роках ХХ ст., продемонстрували можливість розширення сировинної бази мікробіологічного виробництва ЕПС за рахунок використання нехарчових субстратів (метан, метанол, етанол, етиленгліколь, вуглеводні) [15]. Попри це, відомості про синтез ЕПС, одержаних на олієвмісних субстратах, залишаються обмеженими.

Salvador із співавт. [9] досліджували здатність гриба *Pleurotus ostreatus* FPO-1001 синтезувати ЕПС на відпрацьованій соняшниковій олії. За концентрації субстрату 10 г/л штам FPO-1001 утворював 0,8 г/л полісахариду. Штам *Cellulomonas flavigena* UNP3 на 8-му добу культивування на середовищі з 1% арахісової олії синтезував 1 г/л полісахариду, якому притаманні високі емульгувальні властивості [0]. В огляді [0] наведено дані про синтез ксантану *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 S4LII на середовищі зі стічними водами виробництва оливкової олії. При концентрації субстрату 20% (об'ємна частка), штам NRRL B-1459 S4LII синтезував 7 г/л полісахариду.

В огляді [14] наведено дані про використання суміші субстратів для інтенсифікації технологій мікробного синтезу практично цінних продуктів бродіння (етанол, молочна кислота, бутандіол), первинних (амінокислоти, п-гідроксибензоат, тригліцериди) і вторинних (ловастатин, поверхнево-активні речовини) метаболітів, а також біодеградації ксенобіотиків ароматичної природи (бензол, крезолі, фенолі, толуол) і пестицидів (діметоат). Однак до теперішнього часу в літературі практично відсутня інформація про використання змішаних субстратів для синтезу мікробних ЕПС.

У праці [6] зазначається, що за умов росту *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B51 на середовищі, що містить мелясу та сирну сироватку (10%), концентрація полісахариду декстрану становила 9,5 г/л, тоді як під час культивування на мелясі — 5,98 г/л. Проте у цих дослідженнях молочну сироватку використовували як джерело азоту, а не вуглецю, тому штам NRRL B51 фактично вирощували на монособстраті мелясі. Крім того, відомо, що декстран є унікальним полісахаридом, який утворюється тільки з сахарози [15].

Таким чином, наші попередні дослідження синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші ростових субстратів [13; 15] і результати, наведені у даній статті, залишаються практично єдиними, що підтверджує можливість використання змішаних субстратів для підвищення ефективності технологій практично важливих мікробних екзополісахаридів.

Висновки

Отже, у результаті проведеного дослідження встановлено можливість синтезу полісахариду етаполану на суміші меляси та соняшникової олії, визначено оптимальні умови, що забезпечують максимальні показники синтезу ЕПС. Такими умовами є: концентрація меляси та соняшникової олії у суміші 1,5%, вирощування посівного матеріалу на монособстраті мелясі (0,5%), виключення джерела мінерального азоту з середовища для біосинтезу етаполану і зниження його концентрації в середовищі для одержання інокуляту до 0,2 г/л.

Отримані результати є основою для розробки технології одержання етаполану на суміші меляси та відпрацьованої (пересмаженої) соняшникової олії.

Література

1. *Abdel-Aziz S.M.* Acidic pH-shock induces the production of an exopolysaccharide by the fungus *Mucor rouxii*: utilization of beet-molasses / S.M. Abdel-Aziz, H.A. Hamed, F.E. Mouafi, A.S. Gad // *N. Y. Sci. J.* — 2012. — V. 5, # 2. — P. 52—61.
2. *Arli S.D.* Curdlan-like exopolysaccharide production by *Cellulomonas flavigena* UNP3 during growth on hydrocarbon substrates / S.D. Arli, U.B. Trivedi, K.C. Patel // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2011. — V. 27, # 6. — P. 1415—1422.
3. *Ivahniuk M.O.* Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan synthesis under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on sunflower oil / M.O. Ivahniuk, T.P. Pirog // *Ukr. Food J.* — 2014. — V. 3, # 2. — P. 258—263.
4. *Kreyenschulte D.* Recent advances in microbial biopolymer production and purification / D. Kreyenschulte, R. Krull, A. Margaritis // *Crit. Rev. Biotechnol.* — 2014. — V. 34, # 1. — P. 1—15.
5. *Moosavi A.* Bioconversion of sugar-beet molasses into xanthan gum / A. Moosavi, A. Karbassi // *J. Food Process. Preserve.* — 2010. — V. 34, # 2. — P. 316—322.
6. *Moosavi-Nasab M.* Fermentative production of dextran using food industry wastes / M. Moosavi-Nasab, M. Gavahian, A.R. Yousefi, H. Askari // *World. Acad. Sci. Eng. Technol.* — 2010. — V. 4, № 8. — P. 1921—1923.
7. *Öner E.T.* Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. In: *Pretreatment techniques for biofuels and biorefineries* / E.T. Öner. — B.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. — 457 p.
8. *Roca C.* Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications / C. Roca, V.D. Alves, F. Freitas, M.A. Reis // *Front. Microbiol.* — 2015. — V. 6. — P. 1—7.
9. *Salvador C.* Characterization and biological activities of protein-bound polysaccharides produced by cultures of *Pleurotus ostreatus* / C. Salvador, M.R. Martins, M.F. Candeias, A. Karimali, J.M. Arteiro, A.T. Caldeira // *J. Agr. Sci. Tech.* — 2012. — V. 2. — P. 1296—1306.
10. *Лакин Г.Ф.* Биометрия / Г.Ф. Лакин. — Москва: «Высшая школа», 1990. — 352 с.
11. *Маринченко В.О.* Технологія спирту / В.О. Маринченко, В.А. Домарецький, П.Л. Шиян, В.М. Швець, П.С. Циганков, І.Д. Жолнер. — Вінниця: Поділля—2000, 2003. — 496 с.
12. *Олефіренко Ю.Ю.* Особливості біосинтезу мікробного екзополісахариду етаполану за умов росту *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 на соняшниковій олії / Ю.Ю. Олефіренко // *Наукові праці Національного університету харчових технологій.* — 2013. — № 48. — С. 80—85.
13. *Пирог Т. П.* Синтез мікробного екзополіцукриду етаполану на суміші етанолу і меляси / Т.П. Пирог, Ю.В. Корж, Н.В. Лашук, Б.М. Зборовська // *Мікробіол. журн.* — 2006. — Т. 68, № 3. — С. 3—15.
14. *Пирог Т.П.* Змішані субстрати у природних умовах і біотехнологічних процесах / Т.П. Пирог, М.О. Шулякова, Т.А. Шевчук // *Biotechnologia Acta.* — 2013. — Т. 6, № 6. — С. 28—44.
15. *Підгорський В.С.* Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог. — Київ: Наук. думка, 2010. — 327 с.

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА НА СМЕСИ МЕЛАССЫ И ПОДСОЛНЕЧНОГО МАСЛА

А.А. Вороненко, Н.А. Ивахнюк, Т.П. Пирог
Национальный университет пищевых технологий

В статье исследовано влияние концентраций моноsubstrатов в смеси, содержание источника азотного питания в среде, а также способы подготовки

инокулята на синтез экзополисахарида (ЭПС) этаполана в процессе культивирования *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 на смеси мелассы и подсолнечного масла. Наиболее высокие показатели синтеза (количество синтезированных ЭПС 14,4 г/л, ЭПС-синтезирующая способность 3,0 г ЭПС/ г биомассы) наблюдались при выращивании штамма ИМВ В-7005 в среде с мелассой (массовая доля 1,5% по углеводам) и маслом (объемная доля — 1,5%) без источника минерального азота, с использованием посевного материала, выращенного в среде с мелассой (0,5%), в которой содержание NH_4NO_3 снижено в два раза (до 0,2 г/л).

Ключевые слова: *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005, этаполан, биосинтез, смесь мелассы и подсолнечного масла.