

**ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ЭТАПОЛАНА  
НА СМЕСИ ЭТАНОЛА И ПОДСОЛНЕЧНОГО МАСЛА  
ПРИ ДРОБНОМ ВНЕСЕНИИ СУБСТРАТОВ**

На сегодняшний день при разработке микробных технологий большое внимание уделяется определению и поддержанию оптимальных условий культивирования, обеспечивающих максимальный синтез целевого продукта.

Так, в предыдущей работе [1] с целью стабилизации рН культуральной жидкости на оптимальном для синтеза экзополисахарида (ЭПС) этаполана уровне (7,0-8,0) заменяли источник минерального азота ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  на  $\text{KNO}_3$ ) и снижали начальные концентрации субстратов в смеси (этанол и рафинированное подсолнечное масло) с последующим их дробным внесением в процессе выращивания штамма *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 до конечной концентрации 2 % этанола и 0,6 % масла. Отметим, что в таких условиях культивирования наблюдали повышение показателей синтеза полисахарида (концентрация ЭПС составляла 10 г/л, ЭПС-синтезирующая способность – 2 г ЭПС/ г биомассы). В тоже время данная концентрация целевого продукта была ниже, чем при использовании других смешанных субстратов [2].

Очевидно, что для дальнейшей интенсификации синтеза этаполана необходимо повышать конечную концентрацию субстратов, что и являлось целью данной работы.

Штамм ИМВ В-7005 культивировали в минеральной среде следующего состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 6,8;  $\text{KNO}_3$  – 1,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,4 (концентрация  $\text{Mg}^{2+}$  1,6 мМ);  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,001. В одном из вариантов концентрацию  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  повышали до 1,25 г/л (концентрация  $\text{Mg}^{2+}$  5,0 мМ). В среду дополнительно вносили дрожжевой автолизат (0,5 % по объему) и мультивитаминный комплекс «Комплевит» (0,00085 % в пересчете на пантотенат).

В качестве источника углерода и энергии использовали смесь этанола (2,0-4,0 %, по объему) и рафинированного подсолнечного масла (0,6-1,2 %, по объему). В одном из вариантов начальная концентрация этанола в среде составляла 0,65-1,0 %, а масла 0,2-0,3 %, а в процессе культивирования осуществляли дробное внесение субстратов порциями по 0,65-1,3 % (этанол) и 0,2-0,4 % (масло) до конечной концентрации субстратов 2,0-4,0 % и 0,6-1,2 % соответственно.

В качестве посевного материала использовали культуру из экспоненциальной фазы роста, выращенную в среде с этанолом (0,5 %).

Статистическую обработку данных проводили по Лакину [3]. Результаты исследований в соответствии с *t*-критерием Стьюдента были статистически достоверными при 5 %-ном уровне значимости.

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30 °С в течение 120 ч.

Концентрацию биомассы определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на сухую биомассу по калибровочному графику. Концентрацию ЭПС определяли весовым методом после осаждения изопропиловым спиртом. ЭПС-синтезирующую способность определяли как отношение концентрации ЭПС к концентрации биомассы и выражали в г ЭПС / г биомассы.

Эксперименты показали (таблица), что снижение начальной концентрации этанола и масла в смеси до 1/3 от их общего содержания с последующим дробным внесением порциями по 1,3 % и 0,4 % соответственно до конечной концентрации 4,0 % и 1,2 %, хоть и сопровождалось повышением количества синтезированного этаполана до 11,4 г/л, но приводила к снижению рН культуральной жидкости до 5,9 и ЭПС-синтезирующей способности в 1,3 раза.

**Таблица – Показатели синтеза этаполана при дробном внесении субстратов**

Концентрация Mg <sup>2+</sup> , мМ	Режим внесения этанола и масла*	рН	ЭПС, г/л	г ЭПС / г биомассы
1,6	Три порции по 1,3 % и 0,4 %	5,9	11,38±0,57	1,59±0,08
	Четыре порции по 1,0 % и 0,3 %	5,9	11,88±0,59	3,08±0,15
	Пять порций по 0,8 % и 0,24 %	6,1	13,51±0,68	3,65±0,18
5,0	Четыре порции по 1,0 % и 0,3 %	6,1	10,37±0,52	2,58±0,13
	Пять порций по 0,8 % и 0,24 %	6,2	9,86±0,49	2,19±0,11

Примечание – Конечная концентрация этанола и масла в смеси составляет 4,0 % и 1,2 % соответственно.

В предыдущих работах [4] было неоднократно продемонстрировано, что снижение рН при росте штамма ИМВ В-7005 на этаноле обусловлено низкой активностью ацетил-КоА-синтетазы. Мы предположили, что возможным путем решения данной проблемы может быть повышение концентрации катионов Mg<sup>2+</sup> в среде культивирования, которые являются одним из активаторов данного фермента [4], при дополнительном снижении начальной концентрации моносубстратов в смеси. Оказалось неожиданным, но дополнительное внесение катионов Mg<sup>2+</sup> сопровождалось незначительным снижением синтеза ЭПС (таблица). Возможно, это связано с ингибирующим влиянием катионов магния на ферментативные системы, ответственные за катаболизм

жирных кислот, входящих в состав подсолнечного масла. Так, например, у *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* концентрация  $Mg^{2+}$ , обеспечивающая максимальную активность, отличается для различных ферментов  $\beta$ -окислительной системы [5].

В тоже время установлено, что дополнительное снижение начальной концентрации до 1/5 от их начального количества с последующим дробным внесением равными порциями до конечной концентрации 4,0 % этанола и 1,2 % масла, позволяет повысить концентрацию ЭПС и ЭПС-синтезирующую способность в 1,2 и 2,3 раза соответственно по сравнению с внесением трёх порций этанола и масла по 1,3 % и 0,4 % соответственно.

Таким образом, в ходе проведенных исследований, установлен режим дробного внесения субстратов, позволяющий повысить показатели синтеза этаполана (до 13,5 г/л ЭПС) за счет увеличения концентрации этанола и масла в смеси до 4,0 % и 1,2 % соответственно. Полученные результаты являются основой для разработки технологии получения полисахарида на смеси этанола и отработанного подсолнечного масла.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ярош М. Б., Вороненко А. А., Пирог Т. П. Интенсификация микробного экзополисахарида этаполана на смеси этанола и подсолнечного масла. *Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии: материалы конференции*. Ташкент, 2020, с. 286-288.

2. Voronenko A., Ivakhniuk M., Pirog T. Production of exopolysaccharide ethapolan by *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 on fried oil and oil-containing mixed substrates. *Banat's Journal of Biotechnology*, 2020, vol. 11, no. 22, pp. 66-75. DOI: 10.7904/2068-4738-XI(22)-66.

3. Лакин Г.Ф. Биометрия. Москва, 1990. С. 352.

4. Подгорский В. С., Иутинская Г. О., Пирог Т. П. Интенсификация технологий микробного синтеза. Киев, 2010. С. 327.

5. Li L., Ma Y. Effects of metal ions on growth,  $\beta$ -oxidation system, and thioesterase activity of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science*, 2014, vol. 97, no. 10, pp. 5975-5982. DOI: 10.3168/jds.2014-8047.