

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СИНТЕЗА МИКРОБНОГО ПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА НА СМЕСИ ЭТАНОЛА И ПОДСОЛНЕЧНОГО МАСЛА**А.А. Вороненко, Т.П. Пирог***Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина, voronenkoandr@gmail.com*

Ежегодно наращиваются объёмы производства микробных экзополисахаридов (ЭПС), которые благодаря своим уникальным физико-химическим (изменение реологических характеристик водных систем, гелеобразование, эмульгирование и т.д.) и биологическим (иммуномодулирующая, противовоспалительная, бактерицидная активность и т.д.) свойствам широко используются в различных отраслях, от пищевой до нефтеперерабатывающей [0-0, 0].

Одним из эффективных подходов к интенсификации синтеза данных практически ценных метаболитов является использование смеси ростовых субстратов [0, 0]. Применение такого подхода позволяет избежать непродуктивных потерь углерода и энергии, имеющих место при использовании моносубстратов, а также повысить эффективность трансформации обоих субстратов в биомассу и вторичные метаболиты.

Отметим, что согласно классической концепции вспомогательного субстрата использование микроорганизмами смеси двух энергетически избыточных субстратов не предполагается [0]. В то же время имеется информация о вовлечении обоих таких субстратов как в энергетический, так и конструктивный метаболизм.

Исходя из этого, мы предположили возможность интенсификации синтеза экзополисахарида этаполана (продуцент *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005) на смеси этанола и подсолнечного масла – двух энергетически избыточных субстратов, при культивировании на которых наблюдали высокие показатели синтеза этого ЭПС [0, 0].

Таким образом, цель данной работы – установить условия культивирования штамма ИМВ В-7005, обеспечивающие максимальные показатели синтеза микробного полисахарида этаполана на смеси этанола и подсолнечного масла.

Бактерии культивировали в минеральной среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 6,8; KOH – 0,9; NH_4NO_3 – 0,6; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0,001. В 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: *моносубстраты* – этанол (1,66 %, по объему), рафинированное подсолнечное масло (1,0 %, по объему); *смешанный субстрат* – смесь этанола (1,0 %, по объему) и рафинированного подсолнечного масла (0,2-0,6 %, по объему).

В качестве посевного материала использовали культуру из экспоненциальной фазы роста, выращенную в среде с этанолом (0,5 %), маслом (0,5 %) или смесью этанола (0,25 %) и масла (0,25 %).

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.

Определение оптимального молярного соотношения концентраций субстратов (этанол и рафинированное подсолнечное масло) в смеси базировалось на соответствующих теоретических расчётах. Поскольку при метаболизме каждого энергетически избыточного субстрата в смеси до фосфоглицерата (ФГК, центральный углеродный предшественник) образуется достаточное для синтеза клеточных компонентов количество АТФ и восстановительных эквивалентов необходимо: 1) рассчитать уровень генерации энергии при синтезе ЭПС с этанола и подсолнечного масла; 2) определить «энергетический вклад» каждого субстрата на синтез ЭПС.

Энергетические расходы на синтез этаполана с этанола определяли на основе данных об активности ферментов цикла Кребса, глиоксилатного цикла, глюконеогенеза у штамма *Acinetobacter* sp. ИМВ В-7005 и расчётов, приведенных в работе [0]. Генерацию энергии при катаболизме линолевой и олеиновой жирных кислот рассчитывали как описано в работе [0].

Комплексный полисахаридный препарат этаполан состоит из нейтрального и двух кислых ЭПС, один из которых является ацилированным (АП). Ацилированный и неацилированный (НАП) полисахариды имеют идентичное молярное соотношение *D*-глюкозы, *D*-манозы, *D*-галактозы, *L*-рамнозы, *D*-глюкуроновой и пировиноградной кислоты (3:2:1:1:1:1). АП дополнительно содержит в своем составе жирные кислоты (C₁₂-C₁₈) [0].

При проведении расчётов предполагали, что часть жирных кислот масла может быть без значительных превращений использоваться для этерификации углеводной цепи ЭПС. Таким образом, предполагаемый «энергетический вклад» подсолнечного масла в биосинтез ЭПС составляет 25 %, а этанола – 75 % от общего количества энергии. Остальные предположения для теоретических расчетов аналогичны описанным в работе [0].

Статистическую обработку данных проводили, как описано ранее [0, 0]. Отличия средних показателей считали достоверными при 5 %-ном уровне значимости.

На первом этапе работы осуществляли теоретический расчёт оптимального молярного соотношения концентраций этанола и подсолнечного масла в смеси.

В результате анализа метаболических путей штамма ИМВ В-7005 установлено, что энергия генерируется при синтезе повторяющейся цепи ЭПС моносахаридов, жирных кислот и пирувата, входящих в состав повторяющейся цепи ЭПС. При этом генерируемое количество энергии составляет:

$$3,04 + 19,02 = 22,06 \text{ моль АТФ/ моль использованного субстрата (Табл. 1).}$$

Таблица 1. – Генерация энергии при синтезе повторяемого цепи АП и НАП полисахарида

Субстрат для синтеза ЭПС	ЭПС	Расход субстрата на синтез цепи ЭПС, моль	Генерация энергии, моль АТФ	
			На синтез цепи ЭПС	На моль использованного субстрата
Этанол	АП	32	91	2,84
	НАП	18	62	3,40
	АП+НАП	50	152	3,04
Подсолнечное масло	АП	4	63,06	15,77
	НАП	2	51,06	25,53
	АП+НАП	6	114,12	19,02

Согласно расчетам, изложенным в работах [0, 0], генерация энергии при превращении этанола и масла в ФГК составляет 5,0 и 39,5 моль АТФ/ моль использованного субстрата, соответственно.

Учитывая, что для синтеза одного моля биомассы необходимо 4 моля ФГК и 40 моль АТФ, можно рассчитать, что при культивировании штамма ИМВ В-7005 на смеси этанола и масла для образования ЭПС (в пересчёте на моль субстрата) остается 3,04 и 13,52 моль АТФ, соответственно, или 16,56 моль АТФ суммарно.

Принимая во внимание предположение, что при трансформации этанола и масла в ЭПС генерируется 75 и 25 % избыточной энергии соответственно, для генерации 16,56 моль АТФ необходимо 4,09 моль этанола и 0,31 моль масла, что соответствует молярному соотношению 1:0,076. Так, например, при концентрации этанола 1 % (по объему, 10 мл/л или 8 г/л, 0,174 моль) концентрация масла должно составлять 0,013 моль, или 3,66 г, или 3,98 мл, или 0,4 %.

На следующем этапе исследовали принципиальную возможность использования смеси этанола и масла для получения полисахарида этаполана при теоретически рассчитанном молярном соотношении их концентраций.

Установлено, что независимо от способа подготовки посевного материала показатели синтеза ЭПС были у 1,3-2,1 раза выше по сравнению с таковыми на соответствующих моносубстратах (Табл. 2). В последующих экспериментах инокулят выращивали на этаноле, поскольку при использовании такого посевного материала концентрация целевого продукта была максимальной (3,18 г/л).

Таблица 2. – Синтез этаполана на смеси этанола и подсолнечного масла в зависимости от способа подготовки инокулята

Концентрация субстратов в среде для		ЭПС, г/л	ЭПС-синтезирующая способность, г ЭПС/г биомассы
биосинтеза ЭПС, %	получения инокулята, %		
Этанол, 1,0 та масло, 0,4*	Этанол, 0,5	3,18±0,16	1,85±0,09
	Масло, 0,5	2,14±0,11	1,39±0,07
	Этанол, 0,25 та масло, 0,25	2,00±0,10	0,84±0,04
Этанол, 1,66	Этанол, 0,5	1,49±0,07	0,93±0,05
Масло, 1,00	Масло, 0,5	1,63±0,08	1,10±0,06

Примечание – *молярное соотношение этанола и масла составляло 1:0,076.

Поскольку теоретические расчёты базируются на ряде предположений и позволяют лишь ориентировочно определить молярное соотношение концентраций субстратов в смеси, на следующем этапе исследовали синтез полисахарида при различных молярных соотношениях концентраций этанола и масла в смеси.

Эксперименты показали, что наиболее высокие показатели синтеза этаполана (концентрация ЭПС – 4,2 г/л, ЭПС-синтезирующая способность – 2,0 г ЭПС/ г биомассы) наблюдались при молярном соотношении концентраций моносубстратов в смеси 1:0,056, максимально приближенном к рассчитанному теоретически (1:0,076) (Табл. 3). Мы предполагаем, что данное отклонение может быть обусловлено неравномерным использованием каждого субстрата в энергетическом и конструктивном метаболизме.

Таблица 3. – Влияние молярного соотношение этанола и рафинированного масла в смеси на показатели синтеза этаполана

Концентрация субстратов в среде для биосинтеза, %		Молярное соотношение этанола и масла	ЭПС, г/л	ЭПС-синтезирующая способность, г ЭПС/г биомассы
этанол	масло			
1,0	0,2	1:0,036	2,10±0,11	0,49±0,02
1,0	0,3	1:0,056	4,23±0,21	2,00±0,10
1,0	0,4	1:0,076	3,18±0,16	1,85±0,09
1,0	0,5	1:0,096	2,94±0,15	1,20±0,06
1,0	0,6	1:0,116	2,67±0,13	0,79±0,04

Примечание – Инокулят выращивали на этаноле.

На сегодняшний день использование смешанных субстратов в основном связано с получением различных микробных метаболитов (ферменты, этанол, метанол, липиды и т.д.) на основе лигноцеллюлозной биомассы (древесина, солома, жом и т.д.) [0]. В то же время информация об использовании лигноцеллюлозы для получения микробных ЭПС очень ограничена [0, 0].

Так, исследования способности *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 синтезировать микробный ЭПС санксан на смеси глюкозы и ксилозы показали, что независимо от соотношения концентрации субстратов в смеси (7:3, 5:5, 3:7) скорость их потребления, концентрация ЭПС и уровень биомассы в первые 24 ч культивирования были в 1,1-2,3 раза выше, чем показатели, полученные на соответствующих моносубстратах [0]. Однако к концу культивирования показатели синтеза были одинаковыми как на моно-, так и смешанном субстратах. Замена углеводов на 4 % (масс. % по углеводам) гидролизата кукурузной соломы (соотношение глюкозы и ксилозы 3,48:1) сопровождалась повышением концентрации синтезированного санксана до 13,4 г/кг.

Другие авторы [0] сообщают о способности *Aureobasidium melanogenum* TN2-1-2 при выращивании на среде, содержащей 11 % (масс. % по углеводам) гидролизата пшеничной соломы (соотношение глюкозы и ксилозы 78 %:22 %), синтезировать 55,1 г/л пуллулана. При росте на моносахарах глюкозе и ксилозе концентрация ЭПС составляла 58,3 и 50,2 г/л соответственно.

Таким образом, в ходе проведенных теоретических расчётов и экспериментальных исследований установлено, что максимальные показатели синтеза этаполана достигаются при молярном соотношении концентраций этанола и рафинированного подсолнечного масла в смеси, равном 1:0,056.

Список использованных источников

1. Babel W., Müller R.H. (1985), Mixed substrates utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics, *Journal of General Microbiology*, 131(1), pp. 39-45.
2. Barcelos M.C.S., Vespermann K.A.C., Pelissari F.M., Molina G. (2020), Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(9), pp. 1475-1495.
3. Chukwuma O.B., Rafatullah M., Tajarudin H.A., Ismail N. (2021), A review on bacterial contribution to lignocellulose breakdown into useful bio-products, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(6001), pp. 1-27.
4. Donot F., Fontana A., Baccou J.C., Schorr-Galindo S. (2012), Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction, *Carbohydrate Polymers*, 87(2), pp. 951–962.
5. Fukuda K., Kono H. (2021), Cost-benefit analysis and industrial potential of exopolysaccharides. In: Nadda A.K., K.V.S., Sharma S. Eds., *Microbial exopolysaccharides as novel and significant biomaterials*, Springer, Cham, pp. 303-339.
6. Liu G., Zhao X., Chen C., Chi Z., Zhang Y., Cui Q., Chi Z., Liu Y.J. (2020), Robust production of pigment-free pullulan from lignocellulosic hydrolysate by a new fungus co-utilizing glucose and xylose, *Carbohydrate Polymers*, 241(116400), pp. 1-10.
7. Pidhorskyi V., Iutinska G., Pirog T. (2010), *Intensification of microbial synthesis technologies*, Naukova Dumka, Kyiv (in Ukrainian).
8. Pirog T., Yarosh M., Voronenko A. (2021), Synthesis of microbial exopolysaccharides on non-traditional substrates, *Scientific Works of NUFT*, 27(1), pp. 42-52 (in Ukrainian).
9. Pirog T.P., Ivakhniuk M.O., Voronenko A.A. (2016), Exopolysaccharides synthesis on industrial waste, *Biotechnology Acta*, 9(2), pp. 7-18.
10. Pirog T.P., Voronenko A.A., Yarosh M.B. (2020), Production of exopolysaccharide ethapolan under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on the mixture of acetate and sunflower oil, *Biotechnology Acta*, 13(4), pp. 71-80.
11. Rana S., Upadhyay L.S.B. (2020), Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, pp. 577-583.
12. Wu M., Zhao X., Shen Y., Shi Z., Li G., Ma T. (2021), Efficient simultaneous utilization of glucose and xylose from corn straw by *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 to produce microbial exopolysaccharide, *Bioresource Technology*, 319, pp. 1-9.