

579
М 59

Т.А. Гринберг,
Т.П. Пирог,
Ю.Р. Малашенко,
Г.Э. Пинчук

СС



**МИКРОБНЫЙ
СИНТЕЗ
ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ
НА C₁-C₂-СОЕДИНЕНИЯХ**

579
M59

В монографии изложены микробиологические, физиологические, биохимические аспекты микробного синтеза экзополисахаридов (ЭПС) на непищевых субстратах (метан, метанол, этанол). Предложена стратегия поиска и выделения микроорганизмов – продуцентов ЭПС – из естественных эконіш. Рассмотрены особенности синтеза ЭПС на C₁-C₂-соединениях, вопросы направленной регуляции этого процесса. Представлены материалы по использованию в качестве продуцентов ЭПС монокультур и микробных ассоциаций. Анализируются трофические взаимоотношения монокультур в микробных ассоциациях, закономерности синтеза метилотрофными и этанолиспользующими микроорганизмами ЭПС и области их возможного практического применения.

Для микробиологов, биотехнологов, преподавателей и студентов вузов.

У монографії викладено мікробіологічні, фізіологічні та біохімічні аспекти микробного синтезу екзополісахаридів (ЕПС) на нехарчових субстратах (метан, метанол, етанол). Запропоновано стратегію пошуку та виділення мікроорганізмів – продуцентів ЕПС з природних еконіш. Розглянуто особливості синтезу ЕПС на C₁-C₂-сполуках, питання направленої регуляції цього процесу. Представлено матеріали щодо використання як продуцентів ЕПС монокультур і микробних асоціацій. Анализуються трофічні взаємовідношення монокультур у микробних асоціаціях, закономірності синтезу метилотрофними і етаноласимілюючими мікроорганізмами ЕПС і області їх можливого практичного використання.

Для микробиологів, біотехнологів, викладачів та студентів вузів.

Ответственный редактор И. Я. Захарова
Київська технологічна
інститут харчової
промисловості
Утверждено к печати ученым советом
Института микробиологии и вирусологии
им. Д.К.Заболотного
Инв. № 650483 104

Все права принадлежат издательству "Наукова думка". Любое использование издания или его элементов (фрагментов), т.е. копирование, тиражирование, распространение и т.п., возможно только при наличии предварительного письменного соглашения с издателем.

Адрес издательства "Наукова думка": Украина, 252601 Киев 4, ул. Терешченковская, 3.

All rights reserved. No part of this issue may be reproduced by any mechanical, photographic or electronic process or in the form of a phonographic recording, nor may it be stored in a retrieval system, transmitted or otherwise copied for public or private use without written permission of the Naukova Dumka Publishers.

Address of the Publishers: Ukraine, 252601 Kiev 4, Tereshchenkivska St., 3.

M 400200000-364 500-92
221-92

ISBN 5-12-002918-3

© Т.А.Гринберг, Т.П.Пирог,
Ю.Р.Малашенко, Г.Э.Пинчук, 1992

В последние десятилетия микробные экзополисахариды (ЭПС) стали объектом интенсивных исследований не только из-за их важного значения в строении и метаболизме микроорганизмов, но и в связи с разнообразием физико-химической структуры, определяющей свойства этих биополимеров и позволяющей отнести их к промышленно ценным продуктам. Растворы микробных ЭПС характеризуются высокой вязкостью при низких концентрациях, сохранением стабильности в широком диапазоне значений температуры и pH, устойчивостью к механической и окислительной деструкции.

Полисахариды традиционно применяют в различных отраслях народного хозяйства. Сферы возможного применения микробных ЭПС чрезвычайно многообразны: нефте- и горнодобывающая, текстильная, пищевая, фармацевтическая, химическая промышленность и медицина. В основном это полимеры растительного происхождения (крахмал, целлюлоза, альгиновая кислота, агар и др.), а также полученные путем химического синтеза — метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза). Микробные ЭПС можно использовать как альтернативные синтетическим или природным полимерам, а также рассматривать как новые полимеры, применяемые в качестве суспендирующих, железирующих, эмульгирующих, изменяющих реологические свойства водных систем реагентов.

Микробные полисахариды в отличие от традиционно применяемых полимеров не подвержены изменениям в зависимости от климатических условий, получать их можно непрерывно и надежно методом ферментации. В 60-е годы успехи биотехнологии обеспечили появление в ряде стран промышленного производства бактериального полисахарида — ксантана (продуцент *Xanthomonas campestris*). Уникальные свойства этого ЭПС предопределили его широкое применение в самых разных отраслях промышленности. Основные производители ксантана — "Келко" (США), "Рон-Пулен" (Франция), "Пифицер" (США). Фирма "Меро-Руссело-Сатиа" (Франция), вспомогательная фирма "Санofi-Элф-Биоиндустриз" начали производство ксантана пищевого назначения с 1985 г.

На мировом рынке появились и другие микробные ЭПС, например биозан (продуцент *Alcaligenes* sp.), склерглюкан (продуценты —

Sclerotium rolfsii, *Sclerotium* sp.), геллан (продуцент — *Pseudomonas elodea*) [136, 235, 283].

Увеличивается число видов микроорганизмов, используемых для промышленного получения ЭПС и, как следствие, возрастает количество биополимеров, отличающихся по структурным и физико-химическим свойствам и находящихся применение в различных отраслях народного хозяйства.

Потребность в этих биополимерах постоянно растет. Так, если в 1984 г. сумма от продажи их составляла 200 млн долларов, то предполагается, что к 1992 г. она составит 476,9 млн долларов [158]. Однако спрос на ЭПС удовлетворяется не полностью.

Одной из основных причин, тормозящих рост их промышленного производства, является дефицит углеводсодержащего сырья (глюкозы или сахарозы), лежащего в основе микробиологического синтеза ЭПС. Необходимость расширения сырьевой базы стимулирует поиск микроорганизмов, способных утилизировать разнообразные непищевые углеродные соединения и синтезировать в значительных количествах ЭПС. Особое внимание привлекают микроорганизмы, продуцирующие ЭПС на основе C_1 — C_2 -соединений. В этом плане представляют интерес метилотрофные бактерии — продуценты ЭПС, утилизирующие содержащие и не содержащие кислород источники углерода такие, как метанол, метан и др.

Метилотрофные микроорганизмы привлекают внимание широкого круга исследователей в связи с возможностью применения их в области биотехнологии. Согласно сообщению Dstirling — представителя фирмы "Селджин Корпарейшин" (США), 8 крупнейших компаний занимаются исследованиями получения различных продуктов (белка, ферментов, пропионовой кислоты, ацетальдегида, полисахаридов, витамина B_{12}) с помощью метилотрофов [276]. К их числу относятся "Ай Си Ай", "Бритиш Петролеум", "Экс-кон", "Шелл", "Дау Кемикел" и др. Одним из наиболее перспективных направлений использования метилотрофов является получение ЭПС.

Экзополисахариды метилотрофных бактерий проявляют свойства, аналогичные ЭПС, полученным на углеводсодержащем сырье: высокая вязкость растворов [167, 175, 331]; способность к гелеобразованию [13, 322]; псевдопластичность; тиксотропность [107, 108]. ЭПС метилотрофов характеризуются также новыми уникальными свойствами [50, 167, 285, 322].

Сравнительно недавно разработан новый класс микробных ЭПС — биоэмульгаторы [100, 166]. Наиболее изученным представителем этого класса биополимеров является эмульсан, продуцируемый *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 на основе этанола. Эмульсан — один из наиболее эффективных эмульгаторов, высокоспецифичен при эмульгировании углеводородных субстратов, содержащих алифа-

тические, ароматические или циклические компоненты. В настоящее время эмульсан является коммерческим продуктом, производимым в промышленном масштабе фирмой "Петроферм" (США).

Расширение сырьевой базы микробиологического производства ЭПС за счет стабильного сырья непищевого достоинства — одна из актуальных задач интенсивно развивающейся области биотехнологии ЭПС. Исследования по получению эмульсана на основе этанола и углеводов, а также ЭПС на основе метанола убедительно показывают возможность расширения сырьевой базы для производства практически ценных ЭПС. Другая задача — поиск новых типов биополимеров, обладающих свойствами, расширяющими возможность их практического использования.

Для организации производства биополимеров необходимо создать банк культур микроорганизмов — продуцентов ЭПС — с определенными свойствами, не уступающих полимерам, получаемым из растений и водорослей, а также путем химического синтеза.

Если биосинтезу ЭПС бактериями и дрожжами на углеводных субстратах, вопросам его регуляции, изучению продуцента ксантана и свойств этого биополимера применению микробных ЭПС в промышленности посвящено значительное количество обзоров и монографий [5, 6, 10, 42, 182, 215, 229, 235, 257, 258, 270, 279–283, 313], то микробный синтез ЭПС на C_1 – C_2 -соединениях представлен только в двух обзорах и отдельных оригинальных работах [17, 21, 75, 134, 151, 166, 167, 175, 207, 224, 271].

Цель настоящей монографии — обобщить имеющиеся сведения по биосинтезу ЭПС на C_1 – C_2 -субстратах с учетом собственных экспериментальных работ и показать перспективность использования ЭПС в промышленности.

**ХАРАКТЕРИСТИКА
АССИМИЛИРУЮЩИХ
C₁-C₂-СОЕДИНЕНИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ —
ПРОДУЦЕНТОВ
ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ**

Микроорганизмы различных таксономических и физиологических групп синтезируют ЭПС — полимеры, локализованные снаружи клеточной стенки и образующие капсулу либо свободную слизь, либо и то и другое (рис. 1). Особенно обильное образование ЭПС наблюдается у микроорганизмов при росте на средах, содержащих сахарозу [99].

Известно, что метан и метанол являются перспективными источниками углеродного сырья для получения белка и биологически активных веществ с помощью микроорганизмов. Особый интерес вызывает возможность использования этих соединений для получения на их основе экзогенных полиуглеродных веществ, в частности ЭПС.

Метилотрофные бактерии ассимилируют содержащие и не содержащие кислород C₁-источники углерода, такие как метан, метанол, метиламины, формальдегид, муравьиную кислоту и ее соли [59]. Наиболее перспективными субстратами являются метан и метанол благодаря их доступности, дешевизне, химической чистоте и энергетической выгоде.

Метилотрофные бактерии разделяют на облигатные и факультативные [59]. Облигатные метилотрофы — это уникальная группа микроорганизмов, способных расти только на C₁-субстратах, которые метаболизируются клеточной популяцией преимущественно рибулозомонофосфатным либо сериновым путем. К ним относятся метанокисляющие, а также ряд метанол- и метиламиноокисляющих бактерий. По мнению Ю.Р.Малашенко и соавт., облигатная зависимость бактерий от восстановленных C₁-соединений, уникальная способность синтезировать из последних все компоненты клетки позволяют отнести их к физиологически и таксономически единой группе. Большинство факультативных метилотрофов, ассимилирующих кроме C₁-субстратов и другие полиуглеродные соединения, способны рас-

Т а б л и ц а 1. Эффективность микробного превращения различных субстратов в ЭПС

Вид и штамм бактерий	Субстрат	Выход ЭПС по субстрату, %	Источник литературы
<i>Xanthomonas campestris</i> NRRL B-1459	Глюкоза	60,0–75,0	[226]
<i>X. campestris</i> 8162	Лактоза	38,3	[275]
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Меласса	50,0–60,0	[10]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Сахароза	45,0	[143]
<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogens</i>	Глюкоза	56,0–64,0	[221]
<i>Zoogloea ramigera</i> NNR B-3669	"	50,0	[215]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Лактоза	55,6	[275]
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Этанол	15,0–33,0	[288]
<i>Methylomonas mucosa</i> NRRL B-5696	"	20,0–25,0	[336]
<i>Methylocystis parvus</i> OBPP	Метанол	45,0	[287]
<i>Pseudomonas polysaccharogenes</i> M-30	"	26,0	[175]
<i>P. viscogena</i> TS-1004	"	44,0	[324]
	"	21,0	[225, 322]

ти на метаноле и метиламине. Они реализуют различные пути ассимиляции C_1 -соединений: рибулозодифосфатный, рибулозомонофосфатный, сериновый; диоксиацетоновый путь характерен только для дрожжей.

Способность синтезировать в значительных количествах ЭПС обнаружена как у облигатных метилотрофов, в частности родов *Methylomonas* [171, 287, 323], *Methylococcus* [12, 13, 15, 61, 304], *Methylocystis* [193], *Methylophilus* [271], *Methylobacillus* [28, 30, 47, 86], *Nuphromicrobium* [186], так и у факультативных — *Pseudomonas* [13, 50, 108, 224, 225], *Blastobacter* [56]. Новый источник получения ЭПС метилотрофных бактерий — смешанные культуры микроорганизмов (ассоциации), выделенные из природных источников (таких, как активный ил) либо созданные искусственно [16, 131, 141, 176].

При росте микроорганизмов на средах с C_1 - и C_2 -субстратами необходимы дополнительные метаболические пути для образования промежуточных продуктов, используемых при биосинтезе сахаров (глюконеогенез).

Способность ассимилировать этанол в качестве единственного источника углерода и энергии присуща многим микроорганизмам различного таксономического положения. Известны бактерии, продуцирующие ЭПС при культивировании на минеральных средах с этанолом [18, 288, 336]. Наиболее перспективными для промышленного получения ЭПС из исследованных в настоящее время продуцентов их на этаноле являются *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 [336] и *Acinetobacter* sp. [18].

В табл. 1 приведены данные по выходу и концентрации ЭПС, синтезируемых метилотрофными и этанолиспользующими микроорга-

низмами по сравнению с аналогичными данными для микроорганизмов, ассимилирующих углеводные источники питания. Очевидно, у бактерий, растущих на C_1 — C_2 -соединениях, продуктивность ниже, чем у углеводоксиляющих. Тем не менее низкая стоимость таких субстратов, как метан, метанол, этанол, их доступность, химическая чистота, стабильность состава компенсируют этот недостаток [17, 170, 186]. В связи с этим вопросы скрининга культур — продуцентов ЭПС на C_1 — C_2 -соединениях — и разработка вопросов регуляции синтеза полимеров представляются чрезвычайно важными.

ПРОДУЦЕНТЫ ЭПС НА МЕТАНЕ И МЕТАНОЛЕ

Исследована способность облигатных метанооксиляющих микроорганизмов синтезировать ЭПС. Установлено, что в различной степени она присуща всем изученным нами метилотрофам. Так, исследованные штаммы облигатных метанооксиляющих бактерий *Methylo-
monas rubra*, *M.methanica*, *M.gracilis*, *Methylo-
monas sp.*, *Methylococcus
thermophilus*, *M.luteus* и *M.ukrainicus* синтезируют 0,05—0,23 г ЭПС на 1 г биомассы при культивировании в жидких средах в периодическом процессе. Представители виброидных метанооксиляющих бактерий *Methylo-
sinus trichosporium*, *M.sporium*, *Methylocystis sp.* и *M.par-
vus* образуют следовые количества ЭПС в этих же условиях (табл.2).

Известно, что ассимиляция бактериями углерода восстановленных C_1 -соединений осуществляется тремя путями: рибулозомонофосфатным, сериновым и рибулозодифосфатным [59]. Реализация метилотрофами рибулозомонофосфатного и рибулозодифосфатного путей в отличие от серинового связана с функционированием циклов превращения фосфатов сахаров, являющихся предшественниками при синтезе полисахаридов. Поэтому можно предположить, что микроорганизмы с рибулозомонофосфатным или рибулозодифосфатным путем ассимиляции C_1 -соединений должны оказаться более перспективными продуцентами ЭПС. В связи с этим у ряда штаммов облигатных метилотрофов, ассимилирующих метан, изучен путь утилизации этих соединений. С этой целью определяли активность ключевых ферментов серинового (оксипируватредуктазы, серинглиоксилатаминотрансферазы) и рибулозомонофосфатного (гексулозофосфатсинтазы) путей ассимиляции C_1 -соединений (см. табл.2). Как видно из представленных данных, наиболее активные продуценты ЭПС выявлены среди облигатных метанооксиляющих штаммов с рибулозомонофосфатным путем ассимиляции C_1 -соединений. Описанные в литературе метилотрофные микроорганизмы — продуценты ЭПС — реализуют в основном рибулозомонофосфатный или рибулозодифосфатный путь.



Рис. 1. Капсулы азотфиксирующей бактерии *Azotobacter chroococcus*.
Клетки суспендированы в туши, $\times 1600$

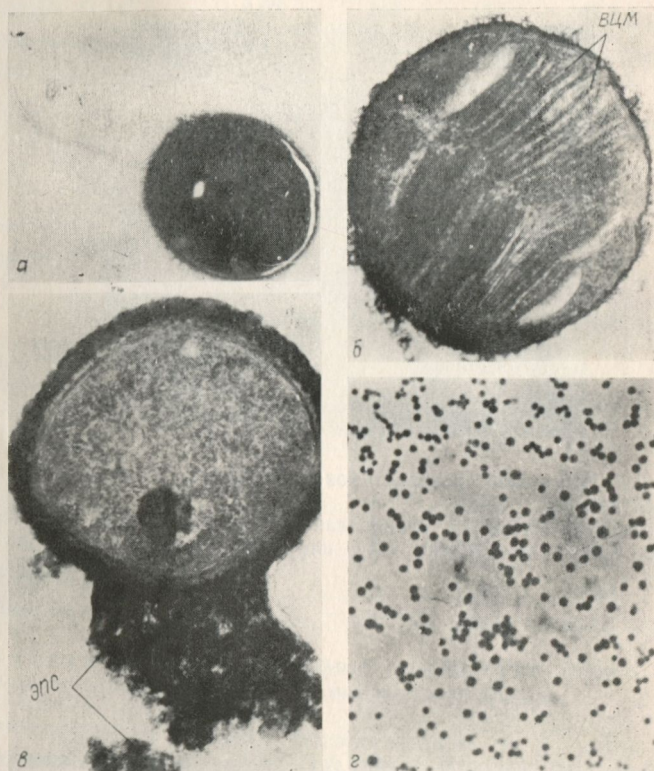


Рис. 6. Негативно контрастированные бактерии *Methylosoccus* (а), ультратонкие срезы клеток (б, в); фазово-контрастная микроскопия (г):
 \times : а — 15 000, б — 50 000, в — 40 000, г — 1 600; ВЦМ — внутриплазматические мембраны

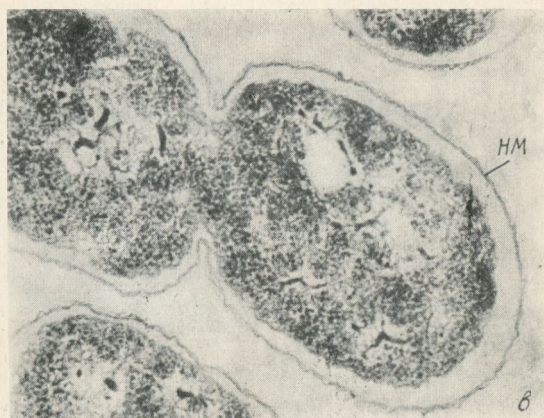
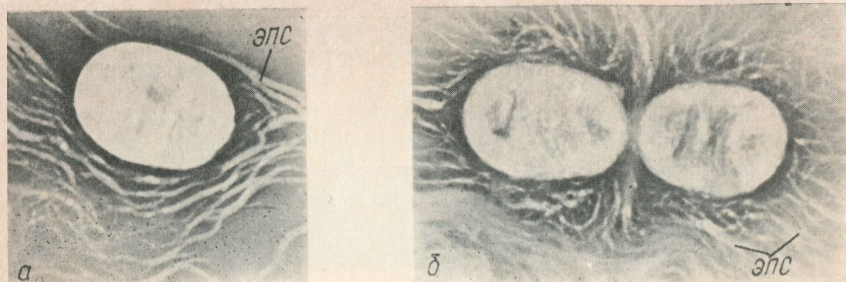


Рис 12. Негативно контрастированные (а, б) и ультратонкий срез (в) *Acinetobacter* sp. Культура выращена на агаризованной сушловой среде в течение 18 ч. \times : а, б — 19 000, в — 25 000; НМ — наружная мембрана, ЭПС

Таблица 2. Синтез ЭПС и активность ключевых ферментов гексулозофосфатного и серинового путей ассимиляции CH_4 у метаноокисляющих бактерий

Вид и штамм бактерий	ЭПС, г/л	Активность ферментов, нмоль/мин на 1 мг белка		
		ГФ	СГАТ	ОПР
<i>Methylomonas rubra</i>				
15ш	0,05	650	0	4,4
75ш	0,08	624	0	0
<i>M. methanica</i>				
63ш	0,08	530	0	0
77ш	0,20	624	1,3	2,7
	0,10	643	0	10,9
<i>Mm. gracilis</i> S1 141	0,05	343	12,9	49,8
<i>Methylomonas</i> sp. H238	0,17	451	0	0
<i>Methylococcus thermophilus</i>				
110	0,10	680	24,0	130,0
111	0,20	675	24,1	147,9
32к	0,15	720	23,2	110,4
2ю	0,23	765	0	130,1
28к	0,11	140	0	66,7
<i>M. luteus</i> 53	0,09	1482	0	8,8
<i>M. ucrainicus</i>				
160	0,12	1240	31,7	125,0
49в	0,15	1205	41,8	208,0
<i>Methylosinus trichosporium</i>				
ОВ3в	Следы	0	165,0	667,0
РС	"	0	158,0	660,0
ОВ5в	"	0	160,0	654,0
<i>M. sporium</i>				
5	"	0	244,0	895,0
90	"	0	70,0	1087,0
A20	"	0	81,6	1099,0
<i>Methylocystis parvus</i> ОВВР	"	0	180,0	560,0
<i>Methylocystis</i> sp. V21S	"	0	220,0	467,0

Примечание. ГФ – гексулозофосфатсинтаза; СГАТ – сериноглиоксилатаминотрансфераза; ОПР – оксигуваватредуктаза.

В соответствии с нашими исследованиями и в подтверждение их можно привести работу J.D. Linton с соавт. по изучению энергетике и кинетике образования ЭПС из C_1 -соединений микроорганизмами с различными путями ассимиляции C_1 -соединений (табл. 3) [207].

Из представленных теоретических расчетов стехиометрии образования ЭПС из метана и метанола очевидно, что рибулозомонофос-

Таблица 3. Теоретический расчет стехиометрии образования полисахаридов из метанола и метана при различных путях ассимиляции C₁-соединений

Источник углерода	Путь ассимиляции C ₁ -соединений	Полная стехиометрия (принято, что избыток восстановленных эквивалентов окисляется до воды через дыхательную цепь)	Энергетический баланс образования 1 моль продукта, моль					У субстрат, г/г	Y _{O₂} , г/г
			ПХХН ₂	УН ₂	ФПН ₂	НАД(Ф)Н ₂	АТФ		
Метан	РМФ	12 CH ₄ + 18 O ₂ = (C ₆ H ₁₀ O ₅) + 6 CO ₂ + 19 H ₂ O	5	0	0	0	0	0,84	0,28
Метанол	РМФ	6,142 CH ₃ OH + 3,213 O ₂ = (C ₆ H ₁₀ O ₅) + 0,142 CO ₂ + 7,285 H ₂ O	0	0	0	0	0	0,82	1,57
"	Сериновый	10 CH ₃ OH + 9 O ₂ = (C ₆ H ₁₀ O ₅) + 4 CO ₂ + 15 H ₂ O	1	6	2	0	0	0,50	0,56
Глюкоза		1,052 C ₂ H ₁₂ O ₆ + 0,312 O ₂ = (C ₆ H ₁₀ O ₅) + 0,312 CO ₂ + 1,312 H ₂ O	0	0	0	0	0	0,85	16,22

Примечание. ПХХН₂ – пирролохинолинон восстановленный; УН₂ – неидентифицированный переносчик электронов; ФПН₂ – флавопротеид восстановленный; НАД(Ф)Н₂ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный; АТФ – аденозинтрифосфат; РМФ – рибулозомонофосфатный.

фатный путь ассимиляции C₁-соединений энергетически более выгоден. Расход восстановленных эквивалентов на образование ЭПС из метана выше, чем из метанола, так как, согласно данным С. Anthony, для реакции метанмонооксигенирования при превращении метана в метанол требуется НАДН [111].

Биоконверсия C₁-соединений в полисахариды лимитирована кислородом. В то время как выход полисахарида из метанола (табл. 3) идентичен выходу его из глюкозы при пересчете на углерод, выход в пересчете на кислород значительно ниже. Расход кислорода для образования внеклеточного полисахарида из метанола примерно в 10 раз больше, чем для образования его из глюкозы. Показано, что состав моносахаридов, входящих в ЭПС метилотрофов, зависит от путей ассимиляции C₁-соединений. Так, ЭПС, продуцируемые микроорганизмами с путями ассимиляции C₁-соединений, которые лимитируются НАДН, содержат восстановленные сахара типа рамнозы и фукозы и в большинстве случаев уроновые кислоты (табл. 4). Образование уроновых кислот требует меньших затрат НАДН.

Т а б л и ц а 4. Моносахаридный состав ЭПС, синтезируемых метилотрофными бактериями

№ п/п	Продуцент	Путь ассимиляции C ₁ -соединений	Моносахаридный состав	Источник литературы
1.	<i>Methylomonas methanica</i>	РМФ	Глюкоза:галактоза:манноза: фукоза:рамноза — 6:2:1:2:1	[280]
2.	<i>Methylococcus thermophilus</i>	РМФ	Глюкоза, фукоза, манноза, рамноза, ксилоза, глюкозамин	[13]
3.	<i>Methylophilus</i> sp.	РМФ	Глюкоза, фукоза, манноза, галактоза, уроновая кислота	[107]
4.	Смешанная культура		Глюкоза:рамноза:манноза: галактоза:фукоза — 1:0,16: :0,19:0,36:0,31	[176]
5.	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	РМФ	Глюкоза, галактоза, ксилоза	[36]
6.	<i>Methylocystis parvus</i> OBVP	Сериновый	Глюкоза:рамноза:манноза: галактоза:фукоза — 8,1:1,4: 1,9:1,5:0,7	[175]
7.	<i>Pseudomonas viscigena</i> TS-1004	РМФ	Галактоза:манноза:аллоза: глюкоза:глюкуроновая кислота — 5,65:1,33:1,12:1,08:1,0	[225]
8.	<i>Nuphromicrobium</i> sp.	Сериновый	Глюкоза:манноза:2-0-метилманноза:пируват — 2:1:1:1	[186, 187]
9.	<i>Methylomonas mucosa</i>	РМФ	Глюкоза:манноза:галактоза: пируват — 2:1:1:2	[331]
10.	<i>Pseudomonas</i> sp.	РМФ	Глюкоза, манноза, галактоза, пируват	[13]
11.	<i>Methylophilus</i> sp. NCIB-12047	РМФ	Глюкоза:манноза — 3:1	[207]
12.	<i>Vlastobacter viscosus</i>	РДФ	Глюкоза, манноза, галактоза, уроновые кислоты	[56]
13.	Смешанная культура	—	Глюкоза:галактоза:манноза — 1:0,67:0,42	[176]

П р и м е ч а н и е. 1-4 ЭПС получен на основе метана; 5-13 ЭПС получен на основе метанола.

Однако в последнее время появились исследования, в которых отмечается способность к синтезу ЭПС микроорганизмами, реализующими сериновый путь. По-видимому, синтез ЭПС у них обусловлен неблагоприятными условиями культивирования, поскольку образование полисахарида наблюдалось у *Methylocystis parvus* OBVP при росте на метаноле после длительной адаптации к этому субстрату [175], у карбоксидобактерий *Pseudomonas gazotropha* Z1156 — при ассимиляции метана [81].

Оценивая данные литературы и собственные экспериментальные результаты, можно полагать, что путь ассимиляции углерода у метилотрофов в значительной степени определяет интенсивность процесса образования ЭПС, хотя при некоторых условиях культивирования метилотрофных микроорганизмов этот процесс обусловлен другим механизмом. Так, А.И.Нестеров и соавт. [66] на примере четырех штаммов метанооксиляющих микроорганизмов, из которых два ассимилировали метан по гексулозофосфатному пути и два — по сериновому, показали, что путь ассимиляции метана существенно не влияет на интенсивность синтеза ЭПС. Авторы установили, что исследуемые культуры синтезируют ЭПС от 0,03 до 0,43 г/г АСБ, выход ЭПС не зависит от пути ассимиляции ими C_1 -соединений. По их мнению, удельный выход ЭПС находится в обратной зависимости от скорости роста метанотрофа и обусловлен цитобиохимическими особенностями строения клеток исследуемых штаммов. Кроме белков, ЭПС, нуклеиновых кислот авторы впервые обнаружили в среде культивирования метанотрофов органические соединения липидной природы.

Среди исследованных метанооксиляющих микроорганизмов выделены термофильные штаммы — продуценты ЭПС. Термофильность для штаммов, рекомендуемых в качестве промышленных продуцентов, — чрезвычайно важное свойство, так как позволяет сократить затраты на охлаждение.

Термотолерантные облигатные метанооксиляющие бактерии H-2 [134] на жидкой питательной среде синтезируют два ЭПС в концентрации 1,8 г/л, в состав которых входят остатки глюкозы, маннозы, галактозамина и глюкуроновой кислоты. Оба полисахарида представляют собой по существу гликопротеины; в их состав входит 30 и 38 % аминокислот. Полисахариды различаются молекулярной массой — 340 и 120 тыс. Оба полисахарида в присутствии 5 %-ной трихлоруксусной кислоты образуют коллоидный раствор и необратимо теряют вязкость при обработке 0,1 н. NaOH.

Селекционированные нами различные штаммы *Methylococcus thermophilus* синтезируют ЭПС, отличающиеся по моносахаридному составу. Так, *M.thermophilus* 10^c синтезирует протеогликан и кислый ЭПС, в состав которого входят глюкоза, манноза, рамноза, ксилоза, глюкуроновая и пировиноградная кислоты [61]. В составе ЭПС *M.thermophilus* 110 обнаружены глюкоза, манноза, рамноза, ксилоза, фукоза и глюкозамин [13]. *Methylomonas thermophilus*, селекционированный J.Minoda и T.Kaneda [223] синтезирует два кислых ЭПС, в состав которых входят глюкоза, манноза, галактозамин и глюкуроновая кислота. Таким образом, на основании приведенных данных нельзя говорить о видоспецифичности моносахаридного состава ЭПС, а можно предположить существование штаммовых особенностей синтеза ЭПС у исследованных культур.

Микроорганизмы — продуценты ЭПС на метаноле. В некоторых случаях наиболее благоприятным субстратом при получении ЭПС оказывается метанол. Известны культуры, утилизирующие различные источники углерода, но способные синтезировать ЭПС только на средах с метанолом [141, 175]. По данным С.Т.Нгу с соавт. [175], метанооксиляющие бактерии *Methylocystis parvus* (штамм ОВВР) после адаптации к метанолу приобрели способность синтезировать ЭПС в значительных количествах.

Наиболее активными продуцентами ЭПС среди облигатных метанолассимилирующих бактерий являются *Methylomonas mucosa* [170, 171, 331—333], *Methylophilus methylotrophus* [271]; среди факультативных — *Pseudomonas polysaccharogenes* [108, 321] и *P.viscogena* [224, 246]. Эти культуры адаптированы к высоким концентрациям метанола, характеризуются высокой скоростью роста, выход ЭПС составляет 40—44 % субстрата. Указанные культуры ассимилируют C_1 -соединения рибулозомонофосфатным путем.

Бактерии *Methylomonas mucosa* NRRL-5696 [333] синтезируют кислый ЭПС. Кинетика роста клеток, дыхания, образования ЭПС в периодическом, непрерывном и полунепрерывном режимах изучена достаточно подробно [287]. *Methylomonas mucosa* NRRL-5696 характеризуется высокой удельной скоростью роста, превышающей втрое среднее значение для большинства метанооксиляющих бактерий, а также значительной скоростью потребления субстрата. *M.mucosa* может расти при высоких концентрациях метанола — до 7 %, что недоступно большинству метилотрофов [307]. Направленный биосинтез полисахарида ведут в периодическом режиме при концентрации метанола в среде 1,5 %, через 24 ч вводят дополнительно 1,5 % метанола. Время ферментации — 45 ч. В этих условиях выход ЭПС достигает 40 % субстрата. ЭПС NRRL-5696 состоит из остатков глюкозы, галактозы, маннозы и пировиноградной кислоты в соотношении 2:1:1:2, молекулярная масса около 5 млн. При культивировании термотолерантного мутанта *Methylomonas methanolica* MV-13 [167] на среде с 0,3 %-ным метанолом за 18 ч при низкой аэрации и температуре 35 °С в культуральной жидкости накапливается до 2 г/л ЭПС, способного осаждать клетки продуцента в процессе ферментации. Этот эффект наблюдается при концентрации полисахарида в растворе 1,3 г/л. ЭПС MV-13 рекомендуется использовать в качестве флокулянта микробных клеток [142, 167].

Селекционирован облигатный метилотроф *Methylobacillus methylophilus* ВСБ-792, который синтезирует ЭПС, представляющий собой линейный полимер с α, β -1 → 3-связями между входящими в его состав остатками *D*-глюкозы, *D*-маннозы, *D*-галактозы, *L*-рамнозы и *D*-глюкуроновой кислоты [28, 30, 47, 86]. Показано, что при лимитировании роста культуры азотным источником питания синтезируется внутриклеточная полиглюкоза, составляющая до 30 % массы

высушенных клеток [71]. Предполагают, что сдвиг в сторону образования полисахарида происходит на уровне 2-кето-3-дезоксиглюкоконатальдозы, а сахарофосфаты, необходимые для синтеза полисахарида, образуются в результате действия ферментов диссимиляционного рибулозомонофосфатного цикла и ферментов, участвующих в перестройке сахарофосфатов.

Селекционирован штамм облигатного нейтрофильного метилотрофа *Methylobacillus viscosus*, синтезирующий 0,88 г ЭПС на 1 г биомассы [52]. Как показали авторы, сдвиг в сторону образования ЭПС связан с уменьшением активностей глюкозофосфатсинтазы, 2-кето-3-дезоксиглюкоконатальдозы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и возрастанием уровней фосфоглюкомутазы и АДФ-глюкопирофосфоорилазы.

Результаты, представленные в работе R.G.Southgate и P.M.Goodwin [27], показали, что *Methylophilus methylotrophus* при культивировании в периодическом процессе на метаноле синтезируют $9,64 \pm 0,5$ г/л ЭПС; время культивирования 21 ч. Синтезируются два типа ЭПС: вязкий и невязкий. Оба содержат глюкозу, галактозу, маннозу, неидентифицированную 6-дезоксигексозу и имеют ацетатные и пируватные группы. Количественное соотношение мономеров не определяли, но предполагают, что оно может различаться у синтезированных ЭПС. Различия вязкости двух полимеров могут зависеть от длины цепи и (или) степени ее разветвления.

Штамм — продуцент гифомикрона — *Nyphomicrobium species JTS-811* [186]. В периодическом процессе на среде, содержащей 1,5 % метанола, в культуральной жидкости накапливается 1,5 г/л полисахарида. В состав гифомикрона входят остатки глюкозы, маннозы и 2-0-метил-4,6-ди-0-пируват-*D*-маннозы в соотношении 2:1:1 [187]. Растворы гифомикрона обладают высокой вязкостью, стабильны при повышении температуры, изменении pH среды и в присутствии солей.

Культура *Methylocystis parvus* ОВВР была первоначально выделена как метаноокисляющая бактерия [175] и адаптирована к метанолу. В периодическом процессе на среде с 1 % метанола (начальная концентрация) содержание полисахарида в культуральной жидкости достигает 9 г/л, вязкость суспензии при этом увеличивается до 900 мПа·с. ЭПС ОВВР представляет собой нейтральный гетерополисахарид, состоит из остатков глюкозы и L-рамнозы в соотношении 6:1. *Pseudomonas polysaccharogenes* М-30 [108] на средах с метанолом синтезирует ЭПС с выходом 30–44 % и концентрацией в суспензии 9,5–14,0 г/л. ЭПС М-30 — кислый гетерополисахарид, нейтральные сахара представлены в нем остатками глюкозы и маннозы в соотношении 3:2. Молекулярная масса ЭПС М-30 — $18 \cdot 10^5$. Раствор ЭПС М-30 сохраняет высокую вязкость при pH среды 2–11, нагревании до 80 °С и в присутствии KCl, NaCl, MgCl₂ и (NH₄)₂SO₄.

Pseudomonas sp. GD-96 [326] синтезирует нейтральный полисахарид. На среде, содержащей 2 % метанола, концентрация ЭПС GD-96 достигает 4,6 г/л. В состав полисахарида входят остатки глюкозы, маннозы и галактозы в соотношении 1,0:1,59:1,24. Вязкость 1 %-ного раствора ЭПС GD-96 — 1200 мПа·с.

Бактерии *Pseudomonas species* S 46B1 утилизируют различные источники углерода, но способны синтезировать ЭПС только на средах с метанолом [50]. При концентрации метанола 20 мл/л в периодическом процессе за 48 ч концентрация ЭПС S 46B1 в суспензии — 3,2 г/л. ЭПС S 46B1 представляет собой кислый полисахарид, состоящий на 76 % из остатков глюкозы.

При культивировании *Pseudomonas* sp. 1T [13] на метаноле выход ЭПС составляет 0,8 г на 1 г биомассы. ЭПС 1T состоит из остатков глюкозы, маннозы, галактозы и пировиноградной кислоты. *Pseudomonas viscogena* T-1004 (АТСС-31504) на среде с 1,5 % метанола синтезирует кислый ЭПС с выходом 30 % субстрата (концентрация в суспензии 30 г/л) [224, 318, 324]. Полисахарид состоит из остатков галактозы, маннозы, глюкуроновой кислоты, глюкозы и аллозы в соотношении 5,65:1,33:1,12:1,08:1,00. Молекулярная масса ЭПС T-1004 $1 \cdot 10^4 \div 1 \cdot 10^7$. Раствор полисахарида в присутствии Ca^{2+} при pH 10 образует гель. В продуктах гидролиза ЭПС обнаружена D-аллоза, ранее не встречавшаяся в природных источниках [224].

L.M.R.Syintsakos и D.L.Stirling [285] сообщили о выделении из образцов, взятых в районе деятельности предприятия по синтезу метанола, бактериального штамма, образующего на среде с метанолом уникальный ЭПС с потенциальной коммерческой ценностью. Штамм является факультативным метилотрофом. Состав и структура ЭПС не раскрываются.

В процессе автотрофного роста на минеральной среде с 1 % метанола *Blastobacter viscosus* 7d синтезирует ЭПС в количестве 0,6 г/л. В состав его входят рамноза, галактоза, глюкоза, ксилоза и уруновая кислота. Аналогичный по составу ЭПС синтезируется бактериями на среде с глюкозой [56]. Описан также факультативный метилотроф *Pseudomonas oleovorans*, синтезирующий ЭПС как на среде с метанолом, так и на углеводсодержащих средах [36]. Сравнительно высокие показатели процесса образования ЭПС установлены нами у ряда свежевыделенных факультативных метилотрофных микроорганизмов [13, 16].

Таким образом, анализ приведенных данных показывает, что перспективные продуценты ЭПС имеются среди как облигатных, так и факультативных микроорганизмов, ассимилирующих метанол рибулозомонофосфатным (*Methylomonas mucosa*), рибулозодифосфатным (*Blastobacter viscosus*) и сериновым (*Nyphomicrobium*) путями. Физико-химические свойства ряда продуцентов уникальны и

представляют коммерческий интерес. Метанол можно отнести к перспективным субстратам для промышленного получения микробных ЭПС.

ПРОДУЦЕНТЫ ЭПС НА ЭТАНОЛЕ

Одним из альтернативных источников углеродного питания микроорганизмов для получения как БВК, так и ЭПС является этанол. Причем качество получаемых продуктов не зависит от того, на синтетическом, гидролизном или пищевом спирте они получены [1, 4].

В 1970–1974 гг. появились работы по образованию ЭПС на этиленгликоле и этаноле [168, 178–180, 288]. Так, штамм *Arthrobacter simplex* var. *viscosus* при высокой скорости аэрации за 72 ч культивирования трансформировал 1,5 г этиленгликоля в 0,2 г полисахарида [168]. А. Tanaka и соавт. [288] выделили из различных почв азотфиксирующие псевдомонады, утилизирующие этанол, этиленгликоль, *n*-пропанол и образующие высоковязкие полисахариды. Культуры образовывали полисахарид при аэрации, и требовалось введение в среду культивирования либо сложных органических источников азота, либо аммонийных солей слабых кислот в связи с необходимостью поддержания pH 8,0. Выход полисахарида составлял 3,0–6,6 мг/мл из 2 % этанола на 5-е сутки культивирования при 25–30 °С. В составе ЭПС обнаружены глюкоза и манноза [288].

В конце 70-х, начале 80-х годов появились первые сообщения об эмульсане – микробном полисахариде, синтезированном на основе этанола [120, 252, 253, 306]. Слово “эмульсан” отражает полисахаридную структуру компонентов и исключительную эмульгирующую активность полимера, полученного биологическим путем, и дает общее название внеклеточным микробным липогетерополисахаридам, связанным с белком, синтезируемым *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 и его мутантами.

Углеводсодержащий компонент эмульсана состоит из *D*-галактозамина, *D*-глюкозы и неидентифицированной аминокислоты. Полимер этерифицирован жирными кислотами. Эмульсан отличается по химическому составу от известных и описанных ранее микробных ЭПС содержанием жирных кислот и наличием гексозаминоуроновой кислоты.

A. calcoaceticus RAG-1 синтезирует внеклеточный полимер при культивировании на среде, содержащей в качестве источника углеродного питания углеводороды, ацетаты, жирные кислоты или этанол. Объемное содержание этанола в среде культивирования составляет 1,25±3,0 % [336]. Этанол частично может быть заменен уксусной кислотой [162, 305].

При культивировании штамма на среде, содержащей этанол, паль-

митат или додекан, образуются α -эмульсаны, причем на среде с этанолом содержание остатков жирных кислот в полимере максимально. При использовании в качестве источника углерода пентадекана, гексадекана или гептадекана образуются только β -эмульсаны [336].

При выращивании штамма на среде с этанолом количество синтезированного эмульсана составляет 4–5 г/л [336]. Обработкой культуры N-метил-N-нитрозогуанидином были получены мутанты *A. calcoaceticus*, устойчивые к цетилтриметиламмонийбромиду в концентрации 10 мкг/мл и характеризующиеся повышенным образованием эмульсана [265]. Мутанты раньше начинают синтезировать эмульсан и накапливают его с большей скоростью по сравнению с родительскими штаммами. В присутствии хлорамфеникола покоящиеся клетки мутантов образуют вдвое больше эмульсана, чем штамм RAG-1. По мнению Y.C. Shabtai, D.L. Gutnick [265], это связано с генетическими изменениями у мутантов.

Для образования эмульсана необходимо наличие в среде азотсодержащих компонентов (сульфата и хлорида аммония, нитратов, мочевины) в количестве, превышающем удельную потребность культуры, так как синтезируемый полимер состоит в основном из производных аминсахаров [162, 254, 336]. В качестве источника фосфора используют одно- или двухзамещенный фосфат калия [336]. Для приготовления питательной среды может быть использована морская или водопроводная вода. При использовании дистиллированной воды необходимо добавлять в среду соли Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} в количестве 1–100 ммоль [336]. Температура культивирования 30°C, pH среды 6,2–6,7. Независимо от используемых источников углерода синтез эмульсана *A. calcoaceticus* RAG-1 начинается с первых часов культивирования, т.е. идет параллельно росту и продолжается в стационарной фазе после прекращения роста культуры.

При исследовании образования эмульсана 16 штаммами *A. calcoaceticus* на среде с 2 % этанола было обнаружено, что эмульгирующая активность (способность образовывать эмульсии с разными углеводородами) варьирует у различных штаммов в широких пределах [260]. Наблюдается зависимость между накоплением биомассы и эмульгирующей активностью. Среди штаммов, хорошо растущих на этаноле (2,4–2,6 мг сухой биомассы на 1 мл), эмульгирующая активность культуральной жидкости наиболее высокая (88–239 ед/мл); у штаммов, накапливающих 1,0–1,7 мг сухой биомассы на 1 мл, эта величина составляет 14–52 ед/мл [260].

Эмульсан образуется в двух формах: свободный, выделяемый в культуральную жидкость, и ассоциированный с клетками. Соотношение свободного и ассоциированного с клетками эмульсана зависит от фазы роста культуры [162, 165, 239, 253] и активности эстеразы, способствующей отделению эмульсана от клеточной поверхности. Оно может регулироваться внесением в среду ингибиторов син-

теза белка [162, 165, 254, 264]. С помощью иммуносорбентного анализа было показано, что в ранний период экспоненциальной фазы роста *A. calcoaceticus* эмульсан связан с клетками и образует мини-капсулы. Количество ассоциированного с клетками эмульсана быстро уменьшается к концу стационарной фазы роста продуцента [162, 240]. Это сопровождается увеличением его количества в культуральной жидкости [162]. Иммуноцитохимическое окрашивание с использованием противоземляных антител также показало, что эмульсан — главный компонент мини-капсул (125 нм), покрывающих клетки в экспоненциальной фазе их роста [239].

Для отделения эмульсана от клеток необходима активная эстераза — фермент, катализирующий гидролиз ацильных и других ацильных групп [264]. При культивировании *A. calcoaceticus* на среде с этанолом активность эстеразы была обнаружена как в культуральной жидкости, так и на поверхности клеток. Клетки, с поверхности которых эстераза была удалена, теряли способность выделять эмульсан. Очевидно, процесс отделения эмульсана заключается в разрыве эфирной связи, с помощью которой он закреплен на поверхности клеток [264].

Наличие жирных кислот установлено также в ЭПС, синтезированном на основе этанола бактериями *Acinetobacter* sp., селекционированными в Институте микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного АН Украины [18]. Полисахарид *Acinetobacter* sp. представляет собой ацилированный кислый гетерополисахарид с молекулярной массой $2,0 \cdot 10^5 - 3,0 \cdot 10^6$. В составе ЭПС наряду с кислыми компонентами (L) уроновыми и пировиноградной кислотой обнаружены остатки нейтральных сахаров — глюкозы, галактозы, маннозы и рамнозы, этерифицированных жирными кислотами — лауриновой, пальмитиновой, пальмитолеиновой, стеариновой и олеиновой. В присутствии одно- и двухвалентных катионов наблюдается повышение вязкости растворов ЭПС, их структурирование, причем увеличение вязкости происходит при определенной концентрации каждого из катионов [18]. При рассмотрении вопросов получения ЭПС на основе этанола изучена возможность иммобилизации клеток продуцента и получения бесклеточной культуральной жидкости, содержащей ЭПС, что исключит сложные процедуры отделения образуемого продукта от клеток. Так, показано, что иммобилизация клеток *Micrococcus* sp. методом адсорбции на крупнопористых носителях (песке, активированном угле, силохроме немодифицированном) позволяет интенсифицировать процесс синтеза ЭПС. Разработан способ проведения процесса культивирования иммобилизованных клеток *Micrococcus* sp. с целью получения культуральной жидкости, свободной от клеток [62]. Перспективными продуцентами ЭПС на основе этанола могут быть селекционированные смешанные культуры микроорганизмов [22, 24].

Таким образом, не только этанол является перспективным субстратом для синтеза ЭПС, но и биополимеры, полученные на основе этого субстрата, представляют собой уникальные соединения.

**СПОСОБНОСТЬ СМЕШАННЫХ
КУЛЬТУР МЕТИЛОТРОФНЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ
СИНТЕЗИРОВАТЬ ЭПС**

По мнению ряда исследователей, создание управляемых микробных ассоциаций, развивающихся в условиях длительных непрерывных процессов, является одним из перспективных путей более полного использования биологической активности микроорганизмов. Применение микробных ассоциаций при получении кисломолочных продуктов, вина, пива, выпечке хлеба, мочке льна, силосовании кормов, очистке сточных вод общепризнанно и широко используется в практической деятельности человека.

В ряде недавних исследований показано образование биологически активных соединений и их предшественников микробными ассоциациями. Так, установлено образование короткоцепочечных жирных кислот (уксусной, пропионовой, масляной, валериановой) смешанной культурой бактерий, выделенной из ила [161]. При изучении образования некоторых аминокислот в смешанных культурах микроорганизмов отмечается либо появление свойства синтезировать эти соединения при отсутствии их синтеза монокультурами, либо увеличение количества аминокислот в смеси по сравнению с раздельным ростом [39]. Смешанные культуры успешно применяются при осуществлении микробного синтеза витаминов, стимуляторов роста растений, антибиотиков, ферментов [39]. Опубликован способ получения микробных полисахаридов с помощью смешанной культуры, в которой по крайней мере одна продуцирует полисахарид [314].

По этим данным культура *Pseudomonas maltophilia* образует незначительные количества невязкого полимера. При культивировании *Pseudomonas maltophilia* с одним из приведенных ниже ЭПС-образующих видов бактерий: *Agrobacterium tumefaciens*, *A. radiobacter*, *A. rubi*, *A. rhizogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. planticola*, *Enterobacter* sp., *Xanthomonas* sp., *Bacillus polymyxa*, получены ЭПС с повышенной вязкостью. В качестве источника углерода применяют одномерные, димерные или олигомерные сахара либо мелассу, сыворотку. Так, при совместном культивировании *P. maltophilia* с *A. tumefaciens* повышение вязкости синтезированного полисахарида по сравнению с полисахаридом монокультуры составляет 100%. Н. Voelskow и M. Schlingmann отмечают, что смешанные культуры дают стабильные результаты при культивировании в непрерывном процессе в течение 3 мес,

соотношение монокультур (1:1) не изменяется в процессе культивирования и при регулярных пересевах остается стабильным в течение двух лет [314]. Однако авторы не объясняют ни принципов взаимодействия культур, ни механизмов обнаруженного ими эффекта.

В настоящее время общепризнано, что в случае использования сложных субстратов и моносубстратов, окисление которых идет с накоплением продуктов неполного окисления (метана, метанола и др.), целесообразно применять смешанные культуры микроорганизмов.

Аэрация образцов активного ила, взятого с очистных сооружений [141], с 3–4 % метанола приводила к образованию высоковязкого "пудингообразного" продукта черного цвета. При использовании в качестве источника углерода этанола, пропанола и глюкозы образование полисахарида не наблюдалось. Пересев активного ила на отцентрифугированную культуральную жидкость или 0,1 %-ный раствор дрожжевого экстракта приводил к образованию светлоокрашенного вязкого продукта. Выход полисахарида – 11,4 % субстрата. При переносе активного ила на агар было обнаружено 6–12 отчетливых типов колоний. Рекультивированные смеси всех колоний в стерильном активном иле на среде с метанолом не синтезировали ЭПС.

Ассоциации, в состав которых входят метанокисляющие бактерии *Methylomonas methanica* (80 %) и бактерии *Pseudomonas maltophilia* (20 %) (или *Flavobacterium*), в условиях полунепрерывного культивирования на метаноле при лимите азота синтезируют полисахарид в концентрации 2,2 г/л [107]. В состав полисахарида входят остатки глюкозы, фукозы, маннозы, галактозы и уроновой кислоты, соединенные между собой в основном β -связями. Культивирование ассоциации, состоящей из *Methylomonas* sp. и *Alcaligenes faecalis* S-63 [131], в периодическом режиме приводит к накоплению значительного количества вязкого ЭПС. В его состав входят остатки глюкозы, галактозы, фукозы и неидентифицированный кислый компонент.

Смешанная бактериальная культура, включающая два различных вида *Pseudomonas*, на минеральной среде с метиламином или метанолом в качестве единственного источника углерода синтезирует внеклеточный ЭПС. В состав его входят фукозамин в качестве основного компонента и липидная фракция, содержащая насыщенные и ненасыщенные (C_6-C_{22}), а также разветвленные жирные кислоты [129].

Нами исследовано 110 образцов, отобранных в разных экологических нишах и представленных различными типами почв Средней Азии и Киевской обл., солеными водоемами Крымской обл., пресными водоемами – Киевским морем, активным илом биологи-

Таблица 5. Распространение метилотрофных микроорганизмов в различных экологических нишах и характеристика их способности повышать вязкость культуральной жидкости

Характеристика образца	Место отбора образца	Число образцов	Число, накопительных культур, ассимилирующих метанол	Накопительные культуры, повышающие вязкость культуральной жидкости, % исследованных образцов		Максимальная вязкость культуральной жидкости, мПа·с	
				на метаноле	на сахарозе	на метаноле	на сахарозе
Почва							
глина, дерн, чернозем	Киевская обл.	5	5	60	100	100-1000	400-1500
песок, пустынные, песчаные почвы	Средняя Азия, Кара-Кум	7	3	29	58	50-200	100-300
черно-луговые каштановые почвы	Хр. Таласский Алатау	11	11	55	82	100-500	100-700
21 Торфяные разработки (почва, вода)	Киевская обл.	5	4	40	80	50-150	100-200
Пресные водоемы							
ил	Киевское море	12	12	83	75	Не определяли	Не определяли
вода		13	13	38	38		
Соленые водоемы							
ил	Крымская обл.	12	6	50	5	100-400	" "
вода	Оз. Сиваш, оз. Сакское	9	5	33	3	100-300	" "
Активный ил очистных сооружений НПЗ	г. Надворное, Ивано-Франковская обл.	10	10	80	90	500-1200	700-1700
Активный ил очистных сооружений промышленных и бытовых сточных вод	г. Киев, Бортнички	10	10	60	80	400-1300	600-1700
Сточные воды пищевых предприятий	Киевская обл.	16	16	88	94	100-450	Не определяли

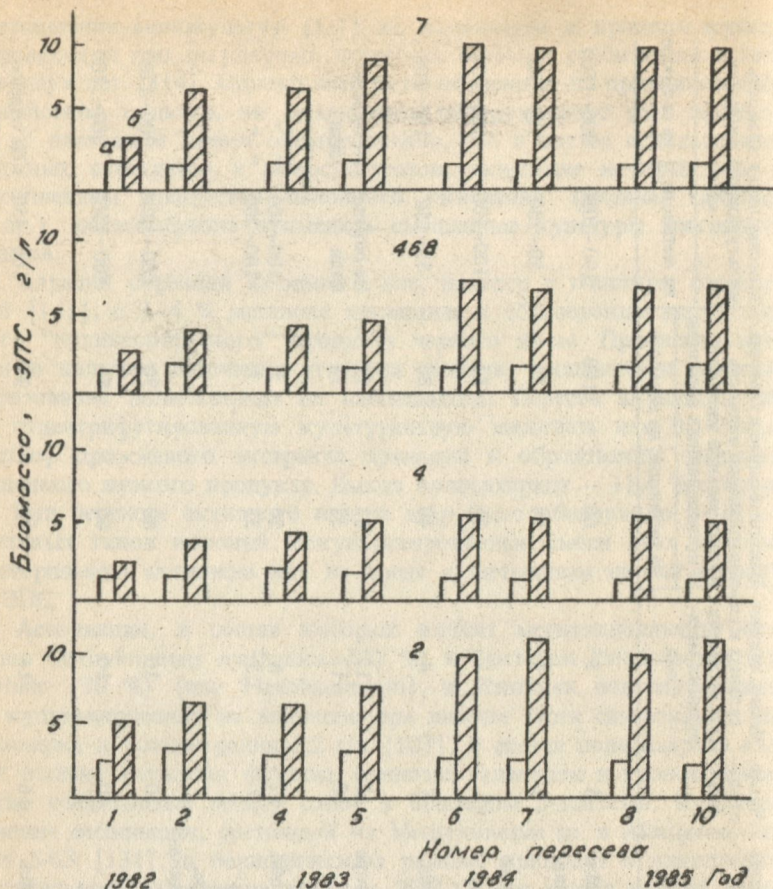


Рис. 2. Образование ЭПС (а) и биомассы (б) ассоциациями метилотрофных микроорганизмов при последовательных посевах: 7, 468, 4, 2 — индексы ассоциаций

ческих очистных станций по очистке сточных вод различного происхождения.

Методом накопительных культур практически из всех исследованных эконичи удается выделить метилотрофные смешанные культуры, существенно повышающие вязкость культуральной жидкости. Следует отметить наибольшую приуроченность таких культур к активному илу очистных сооружений, пресным водоемам и почвам (табл. 5). Максимальная вязкость культуральной жидкости при метанольной ферментации — 1200–1300 мПа·с, что сопоставимо с вязкостью культуральной жидкости смешанных культур, полученных на сахарозе.

Таблица 6. Характеристика микробного состава смешанных культур, синтезирующих ЭПС на метаноле

Место отбора образца	Индекс культуры	Монокультуры, входящие в состав ассоциаций
Ил соленого водоема (оз. Сасык)	7	<i>Pseudomonas</i> sp. шт. 70, <i>Flavobacterium</i> sp. шт. 71, <i>Micrococcus</i> sp. шт. 72, <i>Bacillus subtilis</i> шт. 73, <i>Alcaligenes faecalis</i> шт. 74
Ил пресного водоема (Киевское море)	4	<i>Pseudomonas</i> sp. шт. 40, <i>Blastobacter viscosus</i> шт. 41, <i>Flavobacterium</i> sp. шт. 42, <i>Micrococcus</i> sp. шт. 43, <i>Bacillus polymyxa</i> шт. 44, <i>Arthrobacter</i> sp. шт. 45
Черноземная почва (Киевская обл.)	468	<i>Pseudomonas</i> sp. шт. 47, <i>Flavobacterium</i> sp. шт. 48, <i>Alcaligenes</i> sp. шт. 49, <i>Micrococcus</i> sp. шт. 50, <i>Arthrobacter</i> sp. шт. 51
Глинистая почва (Киевская обл.)	2	<i>Pseudomonas</i> sp. шт. 20, <i>Flavobacterium</i> sp. шт. 21, 6 неидентифицированных культур

Таблица 7. Образование ЭПС смешанными культурами метилотрофных бактерий и монокультурами, выделенными из них, на среде с метанолом

Индекс смешанной культуры	Концентрация ЭПС, г/л	Метилотрофная монокультура	Концентрация ЭПС, г/л
7	10,0	<i>Pseudomonas</i> sp. шт. 70	2,5
2	8,0	<i>Pseudomonas</i> sp. шт. 21	2,3
4	6,0	<i>Pseudomonas</i> sp. шт. 40	1,6
468	7,0	<i>Blastobacter viscosus</i> шт. 41	1,3
		<i>Pseudomonas</i> sp. шт. 47	1,8

При последовательных пересевах смешанных культур концентрация ЭПС и вязкость культуральной жидкости увеличивались в 2–3 раза (рис. 2). Это можно объяснить тем, что происходит селекция активных вариантов культур благодаря применению среды с низким содержанием азота и избытком углерода, обеспечивающих элективное преимущество микроорганизмов, синтезирующих ЭПС и способствующих такому метаболизму клеток, при котором этот процесс интенсифицируется. Особого внимания заслуживает тот факт, что свойство синтезировать ЭПС и повышать вязкость культуральной жидкости сохраняется у исследованных продуктивных культур на жидкой минеральной среде с метанолом при хранении в течение 3–4 лет при 4 °С.

Известно, что многие свежевыделенные чистые культуры микроорганизмов синтезируют повышенное количество ЭПС, однако это свойство ими утрачивается в процессе длительного лабораторного культивирования. Определенную проблему представляет также под-

держание чистых культур традиционных продуцентов ЭПС таких, как *Xanthomonas campestris* и др. [270]. По-видимому, в смешанных культурах между монокультурами сложились такие взаимоотношения, которые обеспечивают как интенсивность синтеза ЭПС, так и постоянство их реологических свойств.

Наиболее продуктивные смешанные культуры состоят из 5–6 видов микроорганизмов, принадлежащих к различным систематическим группам (табл. 6). Смешанные культуры микроорганизмов, выделенные из различных природных источников, состоят из сходных типов бактерий, что может быть связано с длительным пассированием этих комплексов в одинаковых элективных условиях. В состав культур 7, 468 и 2 входит один штамм, ассимилирующий метанол и идентифицированный как *Pseudomonas* sp., в культуру 4 — два метанолассимилирующих штамма — представители родов *Pseudomonas* и *Blastobacter*. Остальные типы микроорганизмов — гетеротрофы, которые растут за счет продуктов трансформации метанола, а также лизиса клеток метилотрофов.

В идентичных условиях культивирования чистые метилотрофные культуры синтезируют в 3–4 раза меньшее количество ЭПС, чем смешанные (табл. 7). Нами показано, что селекционированные смешанные культуры метилотрофных микроорганизмов синтезируют кислые ЭПС, которые могут быть перспективными структурообразователями буровых растворов [14] и представляют интерес для нефтедобывающей промышленности.

Таким образом, нами установлены возможность и целесообразность получения промышленно важных ЭПС на основе метанола с помощью смешанных культур. Такие ассоциации выделяются из различных природных субстратов, но наиболее часто — из активных илов, пресных водоемов и почв. Метанол наряду с сахарозой является субстратом, пригодным для синтеза ЭПС микроорганизмами, а ввиду того, что этот субстрат непищевой ценности, перспективность его использования очевидна.

Кроме того, выделение устойчивых смешанных культур из естественных экониш может служить доказательством существования аналогичных микробных сообществ в определенных эконишах.

**ТРОФИЧЕСКИЕ СВЯЗИ
В ЭПС-ОБРАЗУЮЩЕЙ
СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ
МЕТИЛОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ**

В качестве объекта исследования использовали ЭПС-образующую метилотрофную ассоциацию, выделенную из ила соленого водоема оз. Сасык Крымской обл. в 1982 г. Выделение и культивирование

ассоциации проводили на жидкой среде Т.Кодама с соавт. [50] с 2 % метанола в периодическом режиме в колбах на качалке (220 об/мин). Время выращивания — 5 сут, температура — 30 °С, рН среды — 7,0. Ассоциацию хранили при 4 °С. Пересевы проводили 3—4 раза в год. При последовательных пересевах инокулятом служила культура из предыдущей ферментации в количестве 10 % объема засеваемой среды.

Исследуемая ассоциация синтезирует 8,8—10,0 г/л ЭПС, содержащих 56,0—60,0 % углеводов, 0,80—1,20 — белка, 1,3—1,6 % нуклеиновых кислот к сухой массе препарата. Из нейтральных сахаров в состав ЭПС входят глюкоза, манноза, галактоза, а также галактозамин. В ЭПС ассоциации выявлен также уроновый компонент [14].

В результате проведенной работы выделена одна чистая культура, факультативно ассимилирующая метанол, и четыре гетеротрофные. Поскольку метилотрофная культура является факультативной, общее количество клеток в исходной суспензии определяли путем подсчета количества клеток, выросших на МПА при расसेве ряда последовательных десятикратных разведений суспензии. Количество гетеротрофных клеток в исходной суспензии рассчитывали по разности клеток, выросших на МПА и на агаризованной среде с метанолом в соответствующих разведениях, и количество метилотрофных клеток — соответственно по числу колоний, выросших на агаризованной среде с метанолом. Содержание метилотрофных и гетеротрофных клеток в исходной суспензии выражали в процентах. После изучения морфологических признаков и идентификации монокультур, согласно "Определителю бактерий" [121] рассчитывали процентное содержание гетеротрофных культур, входящих в ассоциацию, и принадлежащих к разным систематическим группам.

На основании изучения морфолого-биохимических свойств метилотрофная культура идентифицирована как *Pseudomonas* sp., а гетеротрофные культуры — как *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* и *Flavobacterium* sp. Гетеротрофные культуры, имеющиеся в ассоциации, по количественному содержанию располагались в следующем порядке, % суммы гетеротрофов: *Micrococcus* sp. — 50, *Bacillus subtilis* — 40, *Alcaligenes faecalis* — 8, *Flavobacterium* sp. — 2. Изменение процентного содержания монокультур изучаемой ассоциации показало, что после ряда последовательных пересевов происходит стабилизация микробного состава ассоциации. Процентное содержание метанолассимилирующей культуры увеличивается, гетеротрофной — уменьшается, и к 10—12-му пересеву стабилизируется (табл. 8).

Аналогичные результаты получены и после трехлетнего ранения ассоциации на жидкой минеральной среде. Установлено, что спо-

Таблица 8. Изменение некоторых параметров при последовательных пересевах микробной ассоциации

Параметр	Номер последовательных пересевов					
	1	4	6	8	10	12
Содержание клеток монокультур, %						
метилотроф	58,7	68,5	72,6	73,4	75,4	76,0
гетеротроф, не ассимилирующий метанол	41,3	31,5	27,4	26,6	24,6	24,0
Концентрация ЭПС, г/л	4,5	5,0	8,0	8,5	8,5	9,0

способность синтезировать ЭПС у изучаемой ассоциации является устойчивым признаком. При этом необходимо отметить, что условия культивирования на азотлимитированной среде, содержащей 2 % (объемная доля) метанола, способствуют закреплению этого свойства, установлению определенных трофических взаимоотношений монокультур, входящих в состав ассоциации, и обеспечивают стабильность системы по изучаемому признаку. У исследуемых культур не выявлена межвидовая конкуренция за субстрат. Этим, по-видимому, объясняется устойчивость ассоциации в процессе непрерывного культивирования ее при низких значениях скорости разбавления среды ($D = 0,03 \text{ ч}^{-1}$), т.е. не наблюдается элиминация.

Установлено повышение концентрации ЭПС при ряде последовательных ферментаций ассоциации (см. табл. 8). Это может быть связано с увеличением и стабилизацией количества клеток метилотрофа, ответственного за синтез ЭПС.

Исследование в динамике накопления биомассы и потребления субстрата показало ступенчатый характер этих процессов (рис. 3). Вначале потребляется метанол за счет роста метилотрофной культуры. На следующем этапе роста концентрация метанола практически не меняется, незначительное увеличение концентрации биомассы происходит за счет гетеротрофов, потребляющих ингибирующие рост метилотрофа продукты. Следующий этап характеризуется ростом метилотрофа, снижением концентрации метанола и образованием ЭПС. Чистая культура метилотрофа в идентичных условиях выращивания дает S-образную кривую роста, типичную для микроорганизмов, растущих на углеводах. Следует отметить, что биосинтетическая активность монокультуры значительно ниже, чем ассоциации.

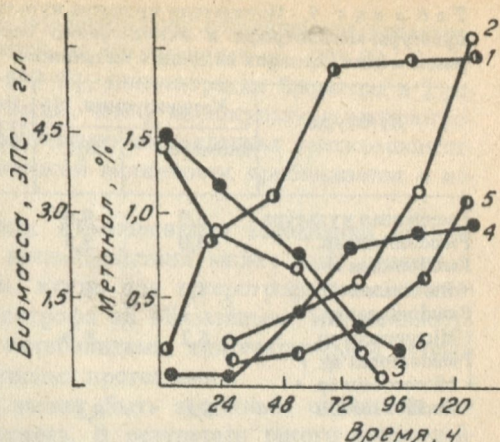
Гетеротрофные микроорганизмы способны расти на фильтрате культуральной жидкости после двухсуточного выращивания метилотрофа. Для изучения взаимодействия монокультур в ассоциации были экспериментально составлены бинарные и трехкомпонентные

ассоциации. При составлении искусственных ассоциаций к метилотрофной культуре добавляли те монокультуры, процентное содержание которых в исходной ассоциации было выше. Составляя ассоциации, пользовались показателями ФЭКа с последующим контролем соотношения клеток путем посева на агаризованные среды.

В результате культивирования бинарной ассоциации, состоящей из *Pseudomonas* sp. (80 %) и *Micrococcus* sp. (20 %), установлено, что концентрация биомассы увеличивается в 2 раза, а ЭПС — на 40 % по сравнению с монокультурой метилотрофа (табл. 9).

Повышение концентрации биомассы бинарной ассоциации происходит, во-первых, за счет потребления гетеротрофом продуктов промежуточного метаболизма метилотрофа, что приводит к снятию эффекта, репрессирующего рост метилотрофа, и во-вторых, в связи со стимуляцией его роста за счет синтеза культурой *Micrococcus* sp. тиамина и биотина. Максимальная удельная скорость роста экспериментально составленной ассоциации в 2–3 раза больше, чем у монокультуры *Pseudomonas* sp. Увеличение количества клеток метилотрофа, ответственного за синтез ЭПС, сопровождается более высокой концентрацией его в культуральной жидкости.

Культивирование бинарной ассоциации *Pseudomonas* sp. (80 %) и *Bacillus subtilis* (20 %) позволяет при увеличении биомассы на 30 % повысить концентрацию ЭПС на 80 % по сравнению с монокультурой метилотрофа. При этом максимальная удельная скорость роста ассоциации увеличивается незначительно. Можно предположить, что *B. subtilis*, потребляя из среды продукты, репрессирующие рост метилотрофа, продуцируют вещества, стимулирующие синтез ЭПС. Следует отметить, что культивирование бинарной ассоциации *Pseudomonas* sp. и *B. subtilis* характеризуется значительным повышением вязкости культуральной жидкости по сравнению как с монокультурой, так и с бинарной ассоциацией *Pseudomonas* sp. и *Micrococcus* sp. (см. табл. 9).



Р и с. 3. Образование биомассы (1, 4) и ЭПС (2, 5), изменение объемного содержания метанола (3, 6) в культуральной жидкости при периодическом культивировании ассоциации (1, 2, 3) и монокультуры *Pseudomonas* sp. (4, 5, 6)

5
М

Таблица 9. Показатели процесса культивирования ассоциации, монокультуры-метилотрофа и искусственно составленных ассоциаций в периодических условиях на среде с метанолом

Культура	Концентрация, г/л		Вязкость культуральной жидкости, мПа·с	Максимальная удельная скорость роста, ч ⁻¹
	биомассы	ЭПС		
Смешанная культура	6,0	9,0	750	0,36
<i>Pseudomonas</i> sp.	3,0	3,5	180	0,19
<i>Pseudomonas</i> sp. + + <i>Bacillus subtilis</i>	4,0	6,2	500	0,24
<i>Pseudomonas</i> sp. + + <i>Micrococcus</i> sp.	6,2	5,0	390	0,43
<i>Pseudomonas</i> sp. + + <i>Micrococcus</i> sp. + + <i>Bacillus subtilis</i>	6,1	8,5	680	0,35

Известно, что добавление нейтральных или щелочных протеаз на разных фазах роста продуцента стимулирует синтез ЭПС микроорганизмами и сопровождается повышением вязкости культуральной жидкости [317]. После двухсуточного культивирования *B. subtilis* на фильтрате *Pseudomonas* sp. в культуральной жидкости обнаружены методом Ансона [110] следовые количества протеаз. В наших экспериментах установлено, что *Pseudomonas* sp., как и *Micrococcus* sp., протеазы не синтезируют.

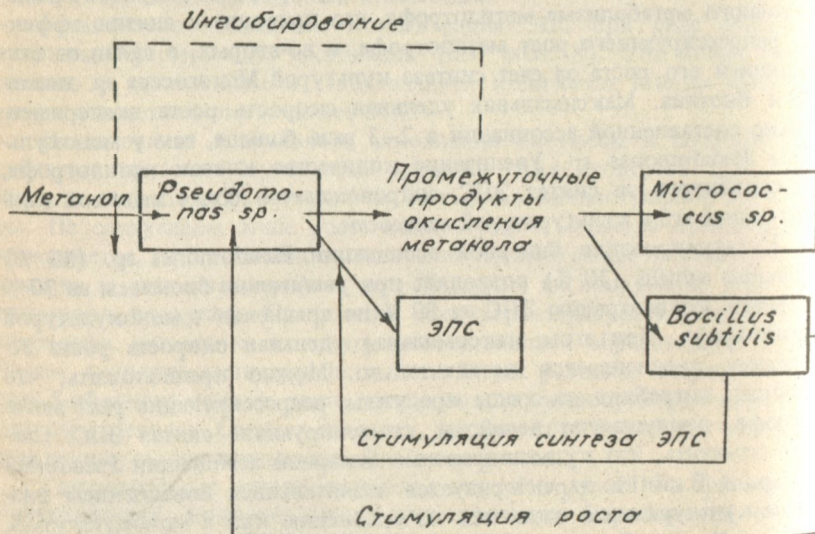


Схема 1. Взаимодействие монокультур в трехкомпонентной метилотрофной ассоциации

При культивировании экспериментально составленной трехкомпонентной ассоциации, состоящей из *Pseudomonas* sp. (80 %), *B. subtilis* (10 %) и *Micrococcus* sp. (10 %), концентрация биомассы в 2 раза выше, а ЭПС — в 2,4 раза выше, чем у монокультуры метилотрофа. Таким образом, экспериментально составленная трехкомпонентная ассоциация по биосинтетической активности приближается к исходной (см. табл. 9).

Тип взаимодействия между компонентами ассоциации изображен на схеме 1. Такой тип взаимодействия может быть отнесен к симбиозу — протокооперации, когда для гетеротрофов взаимодействие облигатно, а для метилотрофа не обязательно. Интенсивность синтеза ЭПС стимулируется метаболитами, синтезируемыми гетеротрофами, в частности внеклеточными протеазами.

Повышение синтеза ЭПС может быть защитным свойством метилотрофа на воздействие протеаз. В результате такого взаимодействия трехкомпонентная ассоциация характеризуется более высокими показателями процесса биосинтеза, чем монокультура метилотрофа и, следовательно, позволяет повысить продуктивность процесса.

Таким образом, микробные ассоциации на основе метанола могут быть использованы для экономичного и эффективного развития биотехнологии микробных полисахаридов.

*ТРОФИЧЕСКИЕ СВЯЗИ
В ЭПС-ОБРАЗУЮЩЕЙ
СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ,
РАСТУЩЕЙ НА ЭТАНОЛЕ*

В работе использовали смешанную культуру микроорганизмов, полученную из активного ила станции биологической очистки сточных вод нефтеперерабатывающего завода [18].

Исследуемая смешанная культура микроорганизмов характеризуется способностью синтезировать высоковязкий ЭПС, который представляет собой кислый гетерополисахарид с молекулярной массой $3 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^5$ и состоит из арабинозы, ксилозы, маннозы, галактозы и глюкозы в соотношении 0,66:1,22:0,20:3,78:1,00. В ряде последовательных пересевов на этанолсодержащей среде смешанная культура сохраняет способность синтеза ЭПС, стабилизируется по этому признаку и продуцирует до 3,0 г/л ЭПС, при этом вязкость культуральной жидкости составляет 1200–1300 мПа·с.

Из смешанной культуры выделены три монокультуры: две бактериальные, идентифицированные как *Acinetobacter* sp. и *Micrococcus* sp. [121], и одна дрожжевая — *Candida tropicalis* [289]. В стационарной фазе роста смешанной культуры количественное содержание

Таблица 10. Образование биомассы и ЭПС монокультурами и смешанной культурой на среде с различными источниками углерода, г/л

Источник углерода	Acinetobacter sp.		Candida tropicalis		Micrococcus sp.		Смешанная культура	
	Био-масса	ЭПС	Био-масса	ЭПС	Био-масса	ЭПС	Био-масса	ЭПС
Этанол	0,25	0,20	3,00	—	0,01	—	3,20	3,00
Этанол*	2,00	3,00	3,10	—	0,01	—	3,40	3,20
Ацетат	0,05	0,06	3,30	—	0,01	—	н.о.	н.о.
Ацетат*	0,80	0,90	3,60	—	0,02	—	н.о.	н.о.
Глюкоза	2,50	6,80	3,80	—	3,00	—	7,20	10,50
ЭПС	1,01	1,10	0,01	0,98	0,01	0,95	0,02	1,10
ЭПС*	0,02	1,10	0,09	0,97	0,11	0,94	0,13	1,20

Примечание. Концентрация этанола и ацетата — 10 г/л, глюкозы — 40, ЭПС — 1,0; н.о. — не определяли; (—) — отсутствие ЭПС.

* Среда содержит 0,2 % дрожжевого автолизата в качестве источника ростовых факторов.

монокультура составляло (в %): *Acinetobacter* sp. — 70–80, *Micrococcus* sp. — 15–20, *C. tropicalis* — 5–10.

Как видно из данных, представленных в табл. 10, *Acinetobacter* sp. и *C. tropicalis* ассимилируют этанол в качестве единственного источника углерода и энергии. При этом для роста *Acinetobacter* sp. необходимы дополнительные факторы роста. Культура *Micrococcus* sp. ни этанол, ни ацетат не усваивает, но ассимилирует глюкозу. Ни одна из выделенных культур не использует ЭПС, синтезируемый смешанной культурой, в качестве источника углеродного питания. Штамм *Acinetobacter* sp. ответствен за образование ЭПС в смешанной культуре; *Micrococcus* sp. и *C. tropicalis* ЭПС не синтезируют. Смешанная культура на минеральной среде с этанолом без дополнительных факторов роста синтезирует ЭПС в тех же количествах, что и *Acinetobacter* sp. в присутствии дрожжевого автолизата (см. табл. 10). В связи с этим применение смешанной культуры с целью получения ЭПС представляется более перспективным, и изучение трофических взаимоотношений в культуре необходимо для создания надежно функционирующей управляемой микробной ассоциации.

Выявление трофических связей в смешанной культуре микроорганизмов осуществляли методом "градиентного поиска" [25]. Суть его состоит в том, что поддерживая смешанные культуры, включающие малое число видов, исследуют механизм того, как с изменением структуры ассоциации, ее видового состава, типов взаимодействия между видами меняются эффективность использования субстрата, параметры роста отдельных видов, т.е. в результате перехода от двухвидовой системы к многовидовой оцениваются функции, выполняемые в ассоциации монокультурами, и возникающие при этом изменения связей между всеми видами ассоциации.

Таблица 11. Некоторые параметры культивирования искусственных микробных ассоциаций и исходной смешанной культуры

Состав микробной ассоциации	Биомасса, г/л	ЭПС, г/л	Вязкость культуральной жидкости, мПа·с	pH _{конечное}
<i>Acinetobacter</i> sp. + + <i>Candida tropicalis</i>	3,30±0,10	1,75±0,05	8,40	6,70
<i>Acinetobacter</i> sp. + + <i>Micrococcus</i> sp.	0,50±0,20	0,30±0,10	25,70	5,00
<i>Candida tropicalis</i> + + <i>Micrococcus</i> sp.	3,60±0,10	Следы	1,50	5,40
<i>Acinetobacter</i> sp. + + <i>Candida tropicalis</i> + + <i>Micrococcus</i> sp.	3,20±0,10	3,00±0,05	1130,00	6,80
Исходная смешанная культура	3,00±0,05	2,90±0,10	1017,00	6,80

В процессе реализации градиентного поиска возможны два подхода: составление экспериментальных ассоциаций из монокультур исходной смешанной культуры и установление способности роста отдельных монокультур на фильтрах культуральной жидкости после выращивания микроорганизмов, входящих в состав смешанной культуры. Нами были использованы оба подхода.

Для изучения трофических взаимоотношений в ЭПС-образующей смешанной культуре, растущей на этаноле, анализировали рост и образование ЭПС у экспериментально составленных бинарных и трехкомпонентной ассоциаций.

Как видно из табл. 11, для образования высоковязкого ЭПС культурой *Acinetobacter* sp. в составе ассоциации необходимо наличие как дрожжевой культуры, так и бактерий *Micrococcus* sp. При полунепрерывном культивировании бинарной ассоциации, состоящей из *Acinetobacter* sp. и *C. tropicalis*, концентрации биомассы и ЭПС остаются неизменными, однако снижается вязкость культуральной жидкости. Культивирование бинарной ассоциации *Acinetobacter* sp. и *Micrococcus* sp. в аналогичных условиях приводило к вымыванию обеих культур. Совместное выращивание *C. tropicalis* и *Micrococcus* sp. позволило получить устойчивую бинарную ассоциацию с более высокой концентрацией биомассы, чем при культивировании *C. tropicalis* в монокультуре (см. табл. 10, 11). При этом ЭПС в культуральной жидкости не обнаружен.

Рост *Acinetobacter* sp. при совместном культивировании с *C. tropicalis* обеспечивается, видимо, метаболитами, выделяемыми в среду дрожжевой культурой. В этом случае pH культуральной жидкости близок к нейтральному — оптимальному для роста и синтеза ЭПС

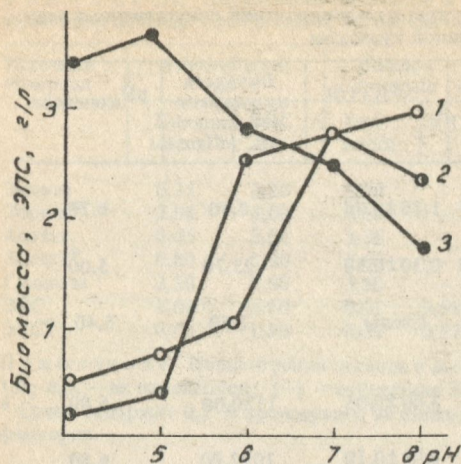


Рис. 4. Влияние pH на образование биомассы культурами *Acinetobacter* sp. (2) и *Candida tropicalis* (3), синтез ЭПС *Acinetobacter* sp. (1)

бактериями (рис. 4). При культивировании *Acinetobacter* sp. с бактериальной культурой *Micrococcus* sp. наблюдается снижение pH, обусловленное накоплением ацетата в культуральной жидкости. Наличие ацетата определяли по реакции с хлорным железом [90]. Однако совместное культивирование *C. tropicalis* и *Micrococcus* sp. стимулирует рост обеих культур. В этом случае значение pH оптимально для роста *C. tropicalis* (рис. 4), а дрожжи синтезируют метаболиты, обеспечивающие рост бактерий *Micrococcus* sp.

Из данных табл. 12 видно, что при росте *Acinetobacter* sp. на среде, содержащей фильтрат культуральной жидкости после выращивания дрожжей, уровень биомассы и ЭПС повышается незначительно. Установлена способность культуры *Micrococcus* sp. расти в присутствии фильтрата культуральной жидкости дрожжей. В дальнейших исследованиях *Micrococcus* sp. выращивали на фильтрате дрожжей и после отделения клеток использовали как фильтрат *Micrococcus* sp. Добавки этого фильтрата стимулируют рост и синтез ЭПС *Acinetobacter* sp., вязкость культуральной жидкости увеличивается в 8–10 раз по сравнению с контролем. Внесение в среду для выращивания *Acinetobacter* sp. смеси фильтратов культуральной жидкости обеих культур (*C. tropicalis* и *Micrococcus* sp.) в соотношении 1:15, что соответствует их соотношению в микробной ассоциации, приводит к увеличению уровня ЭПС в 3–4 раза и вязкости более чем в 10 раз по сравнению с показателями культивирования *Acinetobacter* sp. на среде без добавок указанных фильтратов (см. табл. 12).

В фильтрате культуральной жидкости дрожжевой культуры обнаружены аминокислоты, восстанавливающие моносахара [46], и витамины группы В — биотин, тиамин и пантотеновая кислота [67] (табл. 13). Внесение указанных аминокислот в этанолсодержащую среду культивирования *Acinetobacter* sp. не стимулирует рост культуры (табл. 14). Выращивание *Micrococcus* sp. на фильтрате культуральной жидкости дрожжей дало положительные результаты. *Micrococcus* sp. ассимилирует моносахара и аминокислоты, синтезируемые

Таблица 12. Влияние метаболитов, продуцируемых ассоциантами, на образование биомассы и ЭПС монокультурами

Монокультура	Фильтрат после выращивания	Биомасса, г/л	ЭПС, г/л	Вязкость культуральной жидкости, мПа·с	pH
Acinetobacter sp.	Контроль	0,25	0,20	3,04	4,50
	<i>C.tropicalis</i>	0,40	0,40	3,10	6,80
	<i>Micrococcus</i> sp.	0,60	0,55	32,30	5,20
	<i>C.tropicalis</i> + <i>Micrococcus</i> sp.	0,95	0,82	58,90	6,80
<i>Candida tropicalis</i>	Контроль	3,10	—	н.о.	6,80
	<i>Acinetobacter</i> sp.	3,00	—	н.о.	6,80
	<i>Micrococcus</i> sp.	2,90	—	н.о.	5,20
	<i>Acinetobacter</i> sp. + <i>Micrococcus</i> sp.	2,80	—	н.о.	5,50
<i>Micrococcus</i> sp.	Контроль	0,12	—	н.о.	6,80
	<i>Acinetobacter</i> sp.	1,10	—	н.о.	4,40
	<i>C.tropicalis</i>	1,80	—	н.о.	5,70
	<i>Acinetobacter</i> sp. + <i>C.tropicalis</i>	2,50	—	н.о.	5,20

Примечание. Контроль — среда Кодама с 1 % этанола без дрожжевого автолизата; (—) — отсутствие ЭПС; н.о. — не определяли.

Таблица 13. Состав фильтратов после выращивания монокультур

Соединения	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.
Аминокислоты, мкмоль/мл			
Треонин	0,0052	Следы	—
Лизин	0,0071	”	—
Гистидин	0,0088	—	—
Аргинин	0,0104	—	—
Тирозин	0,0204	—	—
Фенилаланин	0,0392	—	—
Глютамин	0,0576	—	—
Изолейцин	0,0586	—	—
Лейцин	0,1000	—	—
Серин	0,1132	Следы	—
Валин	0,1478	—	Следы
Аланин	0,2620	Следы	—
Глицин	0,3780	—	Следы
Пролин	0,4000	Следы	”
Витамины, мкг/мл			
Тиамин	0,05	—	—
Рибофлавин	—	—	—
Пантотенат	0,01	—	0,50
Пиридоксин	—	—	—
Биотин	0,01	—	—

Соединения	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp.
Моносахара в соотношении			
Глюкоза	1,00	—	—
Манноза	0,24	—	—
Галактоза	0,24	—	—
Арабиноза	3,30	—	—
Рамноза	0,013	—	—

Примечание. (—) — соединение не обнаружено.

Таблица 14. Влияние различных комбинаций метаболитов, выявленных в фильтрате *Candida tropicalis*, на образование биомассы исследуемых монокультур, г/л

Метаболиты, исследуемые в качестве		<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Micrococcus</i> sp.
субстрата для роста	фактора роста			
Моносахара	Аминокислоты	1,50	2,00	2,20
Моносахара	Витамины	2,30	1,90	1,90
Моносахара	—	0,40	1,20	1,50
Аминокислоты	Витамины	0,95	1,20	1,30
Аминокислоты	—	0,30	1,00	1,20
Контроль — этанол	Аминокислоты	0,35	3,60	0,20
Этанол	Витамины	1,90	3,20	Нет роста
Этанол	Пантотеновая кислота	2,05	3,20	" "
Этанол	Дрожжевой автолизат	2,00	3,40	" "
Этанол	—	0,25	3,00	" "

Примечание. Состав моносахаров, аминокислот, витаминов приведен в табл. 13. Аминокислоты вносили в количестве 200 мкг/л в качестве источника углерода и 10 мкг/л — в качестве ростовых факторов; витамины вносили (в мкг/л): тиамин — 0,05, пантотеновая кислота — 0,01, биотин — 0,1; моносахара вносили в среду культивирования из расчета 1 % по углеводам в качестве источника углеродного питания. (—) — без внесения фактора роста.

S. tropicalis (см. табл. 14). Таким образом, субстратом для *Micrococcus* sp. в смешанной культуре являются сахара и аминокислоты. В фильтрате культуральной жидкости после выращивания *Micrococcus* sp. обнаружена пантотеновая кислота в концентрации 0,5 мкг/мл. Внесение пантотеновой кислоты в среду культивирования *Acinetobacter* sp. в количестве, синтезируемом *Micrococcus* sp., приводит к повышению уровня биомассы (см. табл. 14). Содержание ЭПС увеличивается в 2–3 раза, при этом вязкость культуральной жидкости возрастает до 300–400 мПа·с. В этом случае накопление ацетата не

наблюдается, т.е. при участии пантотеновой кислоты, являющейся составной частью кофермента А, ацетат посредством ацетил-КоА, вероятно, включается в конструктивный метаболизм.

В изучаемой ассоциации две культуры могут конкурировать за источник углеродного питания. Однако максимальная удельная скорость роста *Acinetobacter* sp. на этаноле в оптимальных условиях (в присутствии факторов роста) составляет $0,35 \text{ ч}^{-1}$ и выше, для *S.tropicalis* $\mu_{\text{max}} = 0,18 \text{ ч}^{-1}$ в идентичных условиях культивирования на этанолосодержащей среде. Рост дрожжевой культуры ограничен также значением рН среды, близким к нейтральному, и содержанием аммонийного азота в среде Кодама (нитратную форму азота дрожжи не усваивают). Максимальная удельная скорость роста *S.tropicalis* на ацетате выше, чем на этаноле, и составляет $0,28 \text{ ч}^{-1}$. Поэтому при культивировании в ассоциации дрожжи потребляют ацетат, накапливающийся в среде при ассимиляции этанола бактериями *Acinetobacter* sp. в условиях недостатка факторов роста, и снимают репрессивный эффект этого вторичного субстрата на рост бактерий. *Micrococcus* sp. не конкурирует за субстрат с *Acinetobacter* sp. и *S.tropicalis*. Источником углерода для этого штамма являются восстанавливающие сахара и аминокислоты, синтезируемые дрожжевой культурой. Культура *Micrococcus* sp. синтезирует пантотеновую кислоту в количествах, необходимых для роста и синтеза высоковязкого ЭПС *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом (см. табл. 13).

Проведенные нами исследования подтверждают предложенную А.Г.Дегерменджи и А.В.Фуряевой "экологическую теорему" [27], заключающуюся в том, что количество стационарно сосуществующих видов не должно превышать числа контролирующих рост независимых факторов, определяемых плотностями этих видов. В нашем случае контролируемыми и определяющими плотность популяции *Acinetobacter* sp. параметрами являются наличие пантотеновой кислоты в среде культивирования и значение рН, близкое к нейтральному, для *S.tropicalis* — значение рН и концентрация аммонийного азота в среде, для *Micrococcus* sp. — концентрация восстанавливающих сахаров и аминокислот. В сложившейся ЭПС-образующей ассоциации, растущей на этаноле, монокультуры выполняют строго специфичные функции. Взаимоотношение между культурами в ассоциации можно представить в виде схемы (схема 2).

Таким образом, взаимодействие между монокультурами, входящими в ассоциацию, осуществляется через субстратную зависимость роста одного вида от роста другого, а также через метаболиты, являющиеся необходимыми и стимулирующими факторами роста и синтеза ЭПС культурой *Acinetobacter* sp.

Согласно существующей классификации типов взаимоотношений между микроорганизмами одного трофического уровня в бинарных ассоциациях их можно определить следующим образом [69]:

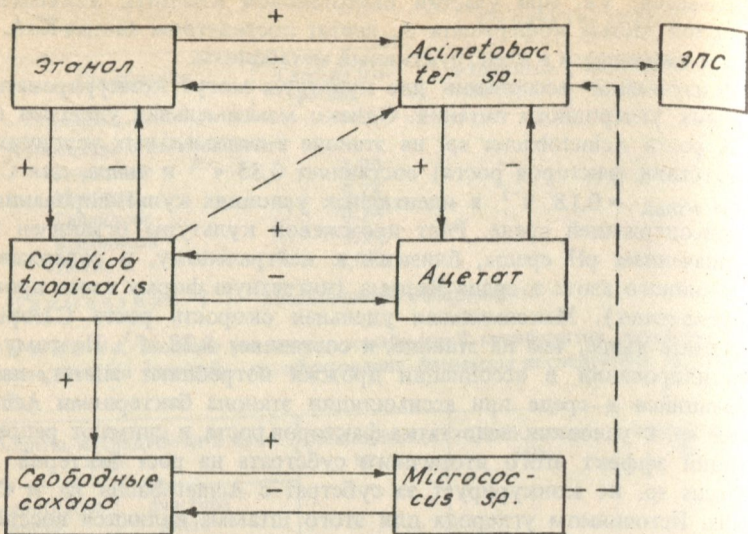


Схема 2. Взаимодействие между монокультурами в ЭПС-образующей ассоциации:

(+) — положительное взаимодействие, (-) — отрицательное, --- — стимуляция

Acinetobacter sp. и *C. tropicalis* — комменсализм, *C. tropicalis* и *Micrococcus sp.* — мутуализм, *Acinetobacter sp.* и *Micrococcus sp.* — нейтраллизм. Однако трехкомпонентная ассоциация представляет собой симбиотическую систему, синтезирующую высоковязкий ЭПС.

Экспериментально составленная ассоциация, включающая три монокультуры, в условиях полунепрерывного культивирования в течение 10 сут сохраняла способность роста и синтеза ЭПС. Это свойство сохранялось и после хранения в течение 3 мес в смешанной культуре при 4 °С. При этом соотношение клеток монокультур варьировало незначительно.

Приведенные нами данные свидетельствуют о стабильности селекционированной ЭПС-образующей ассоциации, растущей на этаноле, что объясняется сложившимися трофическими взаимоотношениями между микроорганизмами, входящими в ее состав.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО
СОСТАВЛЕННЫЕ АССОЦИИЦИИ —
ПРОДУЦЕНТЫ ЭПС НА ЭТАНОЛЕ

Штамм *Acinetobacter* sp. — продуцент высоковязкого ЭПС является ауксотрофом и требует для роста и синтеза полисахаридов внесения в ростовую среду дополнительных факторов роста: пантотеновой кислоты и дрожжевого автолизата в концентрациях 0,0003 и 0,5 % соответственно. После проведения скрининга музейных культур, продуцирующих экзогенную пантотеновую кислоту и растущих на этаноле, были отобраны две культуры — штамм бактерий *Acinetobacter calcoaceticus* и микромицет *Fusarium* sp. Отобранные культуры не требуют дополнительных факторов роста, ассимилируют этанол, *A. calcoaceticus* продуцирует до 0,6 г/л внеклеточных углеводов, обе культуры синтезируют от 0,5 до 1,00 мкг/мл экзогенной пантотеновой кислоты (табл. 15). Антагонизма между отобранными культурами и продуцентом ЭПС *Acinetobacter* sp. не выявлено. Ни бактериальная культура, ни микромицеты не ассимилируют ЭПС, синтезируемый *Acinetobacter* sp., в качестве источника углеродного питания.

Максимальная удельная скорость роста *A. calcoaceticus* на среде Кодама с 1,0 % этанола составляет $0,3 \text{ ч}^{-1}$, *Acinetobacter* sp. — $0,19 \text{ ч}^{-1}$, что предполагает конкуренцию (при совместном выращивании) между культурами за субстрат. Экспериментально подтверждено, что при культивировании смешанной культуры *Acinetobacter* sp. и *A. calcoaceticus* при начальном соотношении клеток 3:1 в течение двух последовательных пересевов наблюдается вымывание *Acinetobacter* sp. При замене источника азотного питания в среде Кодама (NH_4Cl на NH_4NO_3) с аммонийной формы на аммонийно-нитратную (нитратную форму азота *A. calcoaceticus* не ассимилирует) нам удалось добиться ограничения роста *A. calcoaceticus* и создания устойчивой ассоциации двух культур в соотношении 3:1–4:1, синтезирующей высоковязкий ЭПС (табл. 16). Тип взаимоотношений между ассоциантами может быть определен как конкуренция — комменсализм. Совместное выращивание культур позволяет вести процесс получения ЭПС без внесения дополнительных факторов роста.

Изучение физиологических особенностей роста *Fusarium* sp. на среде Кодама с этанолом позволило установить, что максимальная скорость роста культуры составляет $0,18 \text{ ч}^{-1}$ на 24–26-й час, концентрация экзогенной пантотеновой кислоты на 26–30-й час составляет 0,5 мкг/мл, к 72-му часу роста достигает 0,75 мкг/мл (рис. 5).

Таким образом, скорость роста культур существенно не отличается, причем *Fusarium* sp. ассимилирует как аммонийную, так и нитратную форму азота. При совместном культивировании у *Fusarium* sp. есть преимущество — он не нуждается в дополнительных факто-

Таблица 15. Некоторые биосинтетические характеристики исследуемых культур микроорганизмов при росте на этаноле без внесения дополнительных факторов роста

Монокультура	Биомасса, г/л	ЭПС, г/л	V_3 , мкг/мл	Вязкость культуральной жидкости, мПа·с	$\mu, ч^{-1}$
<i>Acinetobacter</i> sp.	0,5	0,3	0	5,0	н.о.
<i>Acinetobacter</i> sp.*	2,85	2,45	0	502,4	0,19
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	4,3	0,6	0,5–0,7	1,0	0,30
<i>Fusarium</i> sp.	2,3	0	0,5–1,0	1,0	0,18

Примечание. н.о. — не определяли.

* Среда Кодама с добавлением V_3 — 0,0003 % и дрожжевого автолизата — 0,2 %.

Таблица 16. Некоторые параметры культивирования экспериментально составленных ассоциаций и монокультуры *Acinetobacter* sp. на среде Кодама с NH_4NO_3 и этанолом

Культура	Биомасса, г/л	ЭПС, г/л	Вязкость, культуральной жидкости, мПа·с	Соотношение количества клеток
<i>Acinetobacter</i> sp. + <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> *	2,9	3,0	575	3:1
<i>Acinetobacter</i> sp. + <i>Fusarium</i> sp.	2,8	2,9	670	4:1
<i>Acinetobacter</i> sp.**	2,85	2,65	542,4	—

* Среда Кодама с 0,2 % дрожжевого автолизата.

** Среда Кодама с 0,0003 % пантотената и 0,5 % дрожжевого автолизата.

рах роста и, следовательно, вытесняет *Acinetobacter* sp. Добавление в среду культивирования такой смешанной культуры 0,2 %-ного дрожжевого автолизата позволяет добиться получения устойчивой ассоциации, продуцирующей вязкий ЭПС (см. табл. 16). В связи с тем что изучаемые культуры конкурируют за источники углеродного и азотного питания, исследовали возможность получения ЭПС на супернатанте культуральной жидкости *Fusarium* sp. Последняя к 20–24-му часу синтезирует достаточное для роста *Acinetobacter* sp. количество пантотеновой кислоты (см. рис. 5). Поэтому в работе использовали 24-часовой супернатант культуральной жидкости *Fusarium* sp.

Как видно из табл. 17, внесение в среду культивирования *Acinetobacter* sp. 1 % супернатанта культуральной жидкости *Fusarium* sp. стимулирует рост и синтез ЭПС. Дальнейшее увеличение содержания супернатанта (20–50 %) не приводит к существенным изменениям показателей процесса, что можно объяснить снижением pH среды за счет внесения супернатанта. Однако культивирование *Acine-*

tobacter sp. на 100 %-ном супернатанте культуральной жидкости с добавлением 1 %-ного этанола при поддержании рН на уровне 6,8–8,0 позволяет получать высоковязкий ЭПС. Количество синтезированного ЭПС сопоставимо с концентрацией ЭПС, получаемого при культивировании продуцента на среде Кодама с добавлением пантотената и дрожжевого автолизата. Таким образом, показана возможность культивирования продуцента ЭПС на супернатанте после суточного выращивания микромицета без внесения в среду дополнительных факторов роста.

Биомасса *Fusarium sp.* может быть использована для получения кормового и пищевого белка, так как она содержит 30–53 % белка, комплекс витаминов и незаменимых аминокислот с преобладанием лизина, треонина, лейцина и характеризуется низким содержанием нуклеиновых кислот [45].

Полученные нами результаты исследований позволяют рекомендовать двухступенчатый технологический процесс получения белково-витаминного концентрата на основе биомассы *Fusarium sp.* на первой

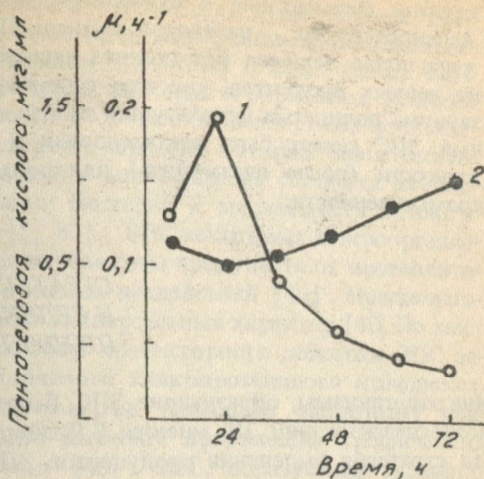


Рис. 5. Скорость роста (1) и образование пантотеновой кислоты (2) при культивировании *Fusarium sp.* на среде Кодама с этанолом

Таблица 17. Показатели роста и образования ЭПС *Acinetobacter sp.* на среде Кодама с добавлением супернатанта культуральной жидкости *Fusarium sp.*

Показатель процесса	Содержание супернатанта, %				
	0	1	20	50	100
Биомасса, г/л	0,30	0,9	1,1	0,94	2,20
ЭПС, г/л	0,32	0,96	1,1	1,10	2,12
Вязкость культуральной жидкости, сПа	3,30	85,00	73,0	83,00	532,00
рН _{конечное}	4,90	4,85	4,3	4,05	6,80

Примечание. При культивировании *Acinetobacter sp.* на среде Кодама, содержащей пантотенат и дрожжевой автолизат, концентрация биомассы – 2,3 г/л, ЭПС – 2,4 г/л, вязкость культуральной жидкости – 502 мПа·с, рН_{конечное} – 6,8; при культивировании на 100 %-ном супернатанте рН поддерживали на уровне 6,0–7,0 путем добавления 10 %-ного NaOH.

ступени ферментации и высоковязкого ЭПС с помощью культуры *Acinetobacter* sp. — на второй ступени. При этом может быть предложена новая дешевая безотходная технология получения промышленно ценных продуктов, так как супернатант после выращивания фузариума полностью используется для получения ЭПС, а синтезированный ЭПС может быть рекомендован в виде вязкой культуральной жидкости (после плазмолиза) для применения в нефтедобывающей промышленности.

СТРАТЕГИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И СЕЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ — ПРОДУЦЕНТОВ ЭПС

Микроорганизмы, образующие ЭПС, были выделены из самых разных экологических ниш. По мнению Е.Брайерли с соавт. [6], определенная стратегия выделения продуцентов ЭПС не разработана и вряд ли возможна. Как правило, из природных экониш выделяют микроорганизмы, характеризующиеся способностью образовывать ЭПС при культивировании на агаризованных средах. Первичный отбор перспективных продуцентов ЭПС следует проводить на жидких средах, так как для промышленного применения могут представлять интерес только те продуценты, которые синтезируют ЭПС в погруженных культурах.

При селекции продуцентов ЭПС могут быть использованы и имеющиеся коллекции живых культур микроорганизмов, что сократит время проведения исследований. Однако нужно учитывать, что способность синтезировать ЭПС при хранении культур часто утрачивается. Поэтому следует разрабатывать методы хранения, позволяющие закреплять и сохранять это свойство у продуцентов. На следующем этапе исследователи пытаются получить штаммы с более высоким уровнем синтеза ЭПС путем прямого отбора либо с помощью мутагенеза. Эта стадия включает определение оптимальных условий культивирования, разработку математической модели, позволяющей биотехнологу управлять процессом синтеза до его потенциального оптимума. Тщательно установленные для каждого исследуемого продуцента условия культивирования должны давать воспроизводимые результаты при масштабировании процесса. Указанные приемы селекции характерны в основном для любых продуцентов промышленно ценных продуктов.

Исходя из анализа биологических функций ЭПС микроорганизмов и анализа описанных физиологических групп бактерий — продуцентов промышленно важных ЭПС, мы рассмотрим некоторые перспективы выделения и селекции продуцентов ЭПС.

Известно, что ЭПС обеспечивают продуцентам существенные преимущества по сравнению с бактериями, не образующими этих биополимеров. ЭПС, подобно полисахаридам клеточных стенок, могут быть факторами антигенной специфичности бактерий и определять разнообразие их поверхностных оболочек в связи с особенностями полисахаридных макромолекул, структурные вариации которых многочисленны. Главной причиной наблюдаемого многообразия считается необходимость эволюционной адаптации бактерий к меняющимся экологическим условиям и системам [5, 83], ЭПС некоторых микроорганизмов способны предохранять экзоферменты продуцента от протеолитической деградации и других внешних воздействий [44]. Предполагается, что такая способность носит универсальный характер [40]. По мнению Н.А.Заикиной [44], механизм протекторного действия ЭПС заключается в образовании устойчивого гликопротеидного комплекса. Сохранение активности экзоферментов благодаря защитному действию ЭПС способствует более полному проявлению трофических возможностей микроорганизмов [40]. ЭПС, образуемый углеводородокисляющей бактерией *Acinetobacter calcoaceticus*, действуя как поверхностно-активное вещество, эмульгирует нерастворимые в воде углеводороды и делает их доступными для клетки [162].

ЭПС ряда морских псевдомонад, обладая свойством ионообменников, адсорбируют из окружающей среды органические и неорганические ионы, концентрируя их вокруг клетки микроорганизма, что обеспечивает им преимущество в условиях пониженной концентрации питательных веществ [9, 153, 279, 303]. ЭПС микроорганизмов играют роль посредников во взаимодействии бактерий-продуцентов в популяции с другими микроорганизмами, макроорганизмами, объектами неживой природы [83, 153].

Специфическое взаимодействие *Lactobacillus brevis* и дрожжей *Saccharomyces delbrückii* в симбиотическом сообществе кефирных зерен происходит, вероятно, посредством образуемого лактобациллами ЭПС-кефирана, который не образуется чистой культурой бактерий [49, 198].

Внеклеточные полисахариды *Xanthomonas* и других фитопатогенных бактерий (*Pseudomonas*, *Erwinia*, *Corynebacterium*) создают продуцентам в растении благоприятную среду обитания. Предполагают, что бактериальные ЭПС реагируют с лектинами и углеводными рецепторами клеточных стенок растительной ткани, тем самым блокируя их и предохраняя бактерии от агглютинации [124, 241]. Хотя способность синтезировать ЭПС присуща представителям различных таксономических и физиологических групп микроорганизмов [83], на основании анализа имеющихся литературных данных следует отметить, что наиболее часто продуценты промышленно ценны гетерополисахаридов встречаются среди фитопатогенных бактерий (*Xant-*

homonas, Erwinia, Pseudomonas), азотфиксирующих (*Azotobacter*, *Beijerincka*), а также метилотрофных микроорганизмов.

Фитопатогенные бактерии поражают в основном надземные части растений, и ЭПС, образуемые этими бактериями, определяют устойчивость их к быстро изменяющимся климатическим факторам. Одним из ведущих факторов повышения выживания клеток фитопатогенных бактерий является способность ЭПС регулировать влажность непосредственного клеточного окружения [10]. Имеются данные о защитном влиянии ЭПС на выживаемость клеток при действии УФ-лучей [37, 65], при неблагоприятном воздействии на клетки высоких и низких температур, переувлажнении и засухе [10, 202, 301]. В связи с этим среди этой группы микроорганизмов часто встречаются продуценты ЭПС.

По-видимому, ЭПС играют некоторую специфическую роль в физиологии азотфиксирующих бактерий. Способность синтезировать ЭПС метилотрофными микроорганизмами показана выше. Причины, обуславливающие синтез ЭПС этой группой бактерий, могут быть следующие.

Когда метилотрофы растут в условиях избытка углерода, то должны существовать средства, предупреждающие накопление формальдегида и поддерживающие баланс между образованием и утилизацией этого токсического соединения [114].

I.D.Linton и соавт. [207] предположили, что синтез ЭПС из метанола является эффективным путем удаления формальдегида, когда дыхательная активность клетки ограничена концентрацией кислорода, при условии, что образование ЭПС не ведет к сетевому сверхсинтезу восстановленных эквивалентов. Экспериментальные данные, полученные R.G.Southgate и P.M.Goodwin [271], согласуются с этой гипотезой. Авторы показали, что при ограничении биосинтетической способности клеток *Methylophilus methylotrophus* источником азотного питания в условиях избытка метанола штамм обладает важным свойством — суперпродукцией формальдегида — и образует высоковязкий ЭПС. При этом активность ферментов рибулозомонофосфатного пути увеличивается в 1,7—4 раза.

В связи с изложенным при выделении продуцентов ЭПС поиск следует проводить в тех эконишах, в которых обитают указанные группы микроорганизмов. Хотя, конечно, распространение этих групп микроорганизмов в природе достаточно широко и не исключена возможность выделения продуцентов ЭПС и среди других физиологических групп микроорганизмов.

При селекции метилотрофных культур — продуцентов ЭПС — возможны два подхода: селекция монокультур и селекция ассоциаций. В первом случае осуществляют селекцию соответствующего продуцента и определяют подходящие источники всех видов пита-

ния, их концентрацию, благоприятную температуру, рН среды, уровень аэрации, влияние специфических компонентов — индукторов или ингибиторов биосинтеза ЭПС [134, 230, 254]. Часто реализация первого подхода заключается в создании лимита азотного питания. Соблюдение этого условия во многих случаях приводило к увеличению выхода ЭПС [12, 13, 36, 56, 73, 287]. Однако при этом в больших количествах (и в первую очередь) могут накапливаться внутриклеточные полисахариды и другие соединения, выполняющие функции запаса питательных веществ [171]. Кроме того, известны примеры, когда накопление ЭПС было значительным и при достаточном содержании в среде источников азота [134, 230].

Главным звеном второго, сравнительно нового подхода является определение биологической функции нужного соединения. Его практической реализацией служит культивирование смешанных культур-ассоциантов. ЭПС осуществляют защиту клетки или взаимодействие с клетками других популяций [41, 43, 115, 259]. Поэтому совместное присутствие определенных микроорганизмов, принадлежащих к разным родам и семействам, может вызвать образование слизи, содержащей ЭПС [131, 141]. Известно, что накопление ЭПС при культивировании смешанных культур может быть в 3—4 раза выше, чем в случае использования монокультур [16, 74].

Из накопительных метилотрофных культур нам удалось выделить не только ассоциативные и монокультуры — продуценты ЭПС на метаноле, но и ряд штаммов — продуцентов ЭПС на C_2 - и полиуглеродных субстратах.

Из 12 накопительных культур метилотрофных бактерий было выделено 59 монокультур, не ассимилирующих метанол в качестве единственного источника углерода и энергии. Выделенные культуры росли на мясептонном, картофельном и суловом агаре, а также на синтетической минеральной среде Канада [188] с сахарозой или этанолом в качестве источника углерода. Из 59 монокультур отобрано 24 штамма, дающих мукоидный рост хотя бы на одной из указанных выше сред.

Установлена способность отобранных штаммов продуцировать ЭПС при культивировании на жидкой минеральной среде Кодама с сахарозой (4%), этанолом (1,5%) или парафином (1%) в качестве источника углеродного питания (табл. 18).

Таким образом, из накопительных культур, растущих на метаноле, с большой частотой вероятности выделяются микроорганизмы — продуценты ЭПС на C_2 и полиуглеродных субстратах. Метанол является селективным фактором для отбора продуцентов ЭПС, так как, являясь токсическим соединением, подавляет рост микроорганизмов, не имеющих механизмов защиты от него. Использование метанола позволяет целенаправленно проводить отбор микроорганизмов, об-

Т а б л и ц а 18 Способность све-
жевыделенных из метилотрофных на-
копительных культур штаммов мик-
роорганизмов синтезировать ЭПС на
С₂- и полиуглеродных источниках
углеродного питания

Номер штамма	Концентрация ЭПС, г/л		
	Сахаро- за	Этанол	Парафин
29	12,0	1,32	1,2
28	14,3	1,28	1,4
23	7,3	4,50	4,1
21	15,0	8,40	9,1
19	14,4	1,20	н.о.
14	10,1	0,94	0,7
7	8,0	н.о.	н.о.
4	3,4	н.о.	н.о.
2	0,6	1,80	н.о.
701	15,0	н.о.	н.о.
702	10,3	3,80	1,4
211	2,4	1,90	3,1
12	9,6	2,40	н.о.
501	9,3	2,30	н.о.
411	0,98	1,10	н.о.
462	6,4	1,40	н.о.
468	4,5	1,05	3,6
449	5,8	1,15	н.о.
453	7,1	0,93	1,9
460	9,3	0,65	5,4
425	4,1	0,43	н.о.
417	5,3	0,50	н.о.
721	2,6	н.о.	н.о.
735	2,8	н.о.	н.о.

П р и м е ч а н и е. н.о. — не обна-
ружен.

исследователей источником углеродного питания. Отбор му-
коидных штаммов и дальнейшее исследование образования ЭПС при
культивировании их в жидких питательных средах позволит в крат-
чайший срок выделить монокультуры — продуценты ЭПС — на С₂- и
полиуглеродных субстратах.

После выбора подходящего штамма возможна дальнейшая селек-
ция с помощью мутагенеза. При отборе мутантов требуется опреде-
ленная изобретательность. Возможно получение мутантов с повышен-
ным синтезом ЭПС либо синтезирующих полимер с измененными
физико-химическими характеристиками [281].

Стабильный мутант *Methylomonas methanolica* с высоким темпе-
ратурным оптимумом был получен после мутагенной обработки N-ме-
тил-N-нитрозогуанидином. Мутант синтезировал вязкий ЭПС в отли-
чие от невязкого, продуцируемого исходным штаммом [167]. Р.И.Гвоз-

разующих ЭПС в качестве защит-
ного фактора при его воздействии.
При культивировании выделенных
культур на углеводных субстратах
и этаноле способность синтезиро-
вать ЭПС в значительных коли-
чествах сохраняется, а оптимиза-
ция питательной среды и усло-
вий культивирования позволяет по-
высить выход ЭПС.

Так, культура *Acinetobacter* sp.
шт. 12 — продуцент ЭПС на этано-
ле — была нами селекционирова-
на из метанольной ассоциации [22].
Выделение из природной экониши
традиционным путем такой куль-
туры не привело бы к успеху в
связи с наличием в ней метаболи-
ческих дефектов.

В настоящее время стратегия
выделения микроорганизмов — про-
дуцентов ЭПС — не разработана.
Проведенные нами исследования
позволяют наметить один из таких
подходов: при поиске и выделе-
нии продуктивных полисахаридоб-
разующих культур микроорганиз-
мов следует получать смешанные
культуры на среде с метанолом,
а затем традиционным методом
выделять монокультуры на ага-
ризованных средах с интересую-

дяком и соавт. были проведены работы по влиянию мутагенных факторов на синтез ЭПС патоварами *Xanthomonas campestris* [10]. Авторами установлено, что использование двух факторов: замораживание и воздействие быстрыми нейтронами или пассирование через растение-хозяин и действие быстрых нейтронов позволяют получить плюс варианты *X. campestris* с более высоким выходом ЭПС и с улучшенными реологическими характеристиками ксантана.

Штаммы, продуцирующие ЭПС, синтезируют также другие полимерные продукты, например гликоген или поли- β -гидроксibuтират. При этом из процесса биосинтеза ЭПС часть углерода расходуется на синтез этих продуктов. Следует выделять мутанты, лишенные подобного ряда альтернативных путей, для чего необходимо знать регуляторные механизмы обоих путей. Продуценты курдлана синтезируют также значительные количества сукцинглюкана. Получены 4 типа мутантов: продуценты курдлана, сукцинглюкана, продуценты обоих ЭПС и мутанты, не синтезирующие курдлан, но синтезирующие незначительное количество сукцинглюкана. Механизм этих изменений в синтезе полимеров неизвестен.

В некоторых случаях предпочтительным является перенос генетических детерминант синтеза полисахаридов. Например, перенос детерминант синтеза альгината из патогенного штамма *Pseudomonas aeruginosa* в непатогенные виды *Pseudomonas* создает предпосылки для промышленного получения альгината. Представляет интерес и перенос генов, детерминирующих синтез ксантана, в штамм, непатогенный для растений. Детерминанты синтеза полисахаридов можно ввести и в более быстро растущие бактериальные штаммы.

Представляют интерес мутанты, устойчивые к антибиотикам. Например, из популяции *X. campestris* X55 выделен мутант X 59, устойчивый к рифампицину и образующий на 20 % больше ксантана, чем исходный. Из популяции X 59 выделен мутант, устойчивый к бацитрацину и образующий на 10 % больше ксантана, чем штамм X 59 [217]. Выявлена также возможность превращения штаммов *Pseudomonas*, не способных к синтезу ЭПС, в штаммы — продуценты этих полимеров — с помощью отбора по резистентности к карбенициллину [6].

У мутантов с повышенной резистентностью к бацитрацину часто наблюдается более интенсивный синтез полисахаридов. В случае применения бацитрацина снижение интенсивности синтеза ЭПС объясняется тем, что этот антибиотик эффективно связывается с изопреноидными липидами, так что они не могут участвовать в синтезе ЭПС, а у мутантов с повышенной резистентностью к бацитрацину — интенсивность синтеза ЭПС увеличивается. Механизм действия других использованных антибиотиков не расшифрован, и появление мутантов с повышенным синтезом ЭПС может быть объяснено защитной реакцией клетки.

У *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 были получены мутанты, син-

тезирующие в 2,5 раза больше эмульсана, чем исходный штамм. Селекцию таких мутантов проводили воздействием на клетки цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ) — токсичного катионного поверхностно-активного вещества [162, 263, 265]. Предпосылкой к получению таких мутантов было то, что эмульсан способен связывать ЦТАБ, и получение мутантов с повышенным синтезом эмульсана для защиты клетки от токсичного детергента представлялось возможным. Мутанты с повышенной в 5—50 раз устойчивостью к ЦТАБ и повышенным синтезом эмульсана характеризовались наличием больших капсул.

Таким образом, селекция продуцентов ЭПС с помощью мутагенных факторов весьма перспективна. Но любые методы селекции, предпринимаемые для повышения выхода ЭПС исследуемым продуцентом, должны базироваться на знании его физиолого-биохимических особенностей, свойств синтезируемого препарата и на ясном представлении о данном биосинтетическом пути и механизмах его метаболического контроля.

Приведенные данные показывают, что традиционные методы селекции микроорганизмов — продуцентов биологически активных веществ — применимы и для ЭПС-образующих микроорганизмов. Однако проведенные нами исследования по поиску и выделению метилотрофных культур — продуцентов ЭПС привели к нетрадиционным и важным результатам, позволившим определить стратегию выделения активных штаммов, продуцирующих ЭПС не только на метаноле, но и на других полиуглеродных субстратах.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ

Экзополисахариды, как и внутриклеточные полисахариды, выполняют важные биологические функции и являются обязательными компонентами микроорганизмов, однако уровень биосинтеза ЭПС колеблется в широких пределах. Изучение динамики роста клеток и образования ЭПС в периодическом процессе показывает, что максимальная удельная скорость образования ЭПС чаще всего не совпадает по времени с максимальной скоростью роста продуцентов и достигается в стационарной фазе роста популяции [13, 15, 186, 229, 256, 270], что характерно для биосинтеза вторичных метаболитов. Уровень биосинтеза вторичных метаболитов, таких как ЭПС и внутриклеточные полисахариды, обычно сильно зависит от внешних условий. Поэтому подбор оптимальных комбинаций различных параметров культивирования для направленного синтеза ЭПС — чрезвычайно важная и необходимая задача.

МИНЕРАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ СРЕДЫ

Углерод. Большинство изученных микроорганизмов, синтезирующих ЭПС, использует углеводы в качестве источника углерода и энергии. В этом случае в среде содержатся необходимые для образования полисахарида C_6 -соединения, которые в результате реакций эпимеризации и последующей полимеризации превращаются в ЭПС. Обычно в качестве источника углерода при получении ЭПС используют продукты, получаемые из сахарной свеклы: мелассу, сахарный сироп, сахарозу, или из кукурузы: крахмал, гидролизованный крахмал, глюкозный сироп, глюкозу [242].

Образование ксантана культурой *Xanthomonas campestris* наблюдается также при росте продуцента на мальтозе, фруктозе, лактозе [340]. *Agrobacterium radiobacter* NCIB 11883 синтезирует ЭПС на среде, содержащей в качестве источников углерода глюкозу, укцинат,