

ЕТАПОЛАН – МІКРОБНИЙ ЕКЗОПОЛІСАХАРИД МУЛЬТИФУНКЦІОНАЛЬНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

Пирог Т.П., Корж Ю.В.

*Інститут мікробіології і вірусології Національної академії наук
України, Київ*

Підсумовано власні експериментальні дані стосовно інтенсифікації синтезу, регуляції фізико-хімічних властивостей і практичного використання мікробного екзополісахариду (ЕПС) етаполану (продуцент - *Acinetobacter* sp. B-7005). Етаполан складається з ацильованого (містить C₁₀-C₁₈-жирні кислоти) і неацильованого компонентів, ідентичних за моносахаридним складом, вмістом глюконової і піровиноградної кислот. Завдяки наявності жирних кислот розчинам етаполану притаманна здатність до емульгування, підвищення в'язкості в присутності катіонів, за низьких значень рН, у системі Cu²⁺-гліцин, що зумовлює практичне використання цього ЕПС у нафтовидобувній, хімічній, харчовій промисловості, сільському господарстві. Застосування 1 т етаполану у нафтодобуванні дає змогу отримати додатково 240 т нафти.

Наведено дані про технологічні особливості біосинтезу етаполану на різних вуглецевих субстратах (етанол, вуглеводи, суміш ростових C₂-C₆-сполук), які дають змогу знизити у 3-4 рази (до 2,95 г/л) вміст солей у середовищі культивування продуцента, підвищити у 2-5 разів кількість синтезованого ЕПС і регулювати його фізико-хімічні властивості залежно від галузі практичного використання.

Ключові слова: екзополісахариди, етаполан, інтенсифікація синтезу, регуляція метаболізму, фізико-хімічні властивості, суміш ростових субстратів, біосинтез.

Мікробні полісахариди, як внутрішньоклітинні, так і екзогенні викликають великий інтерес у дослідників – мікробіологів, біохіміків, молекулярних біологів,

біотехнологів. Практичне значення ЕПС зумовлене їхньою здатністю у невисоких концентраціях істотно змінювати реологічні характеристики водних систем, що використовується в нафтодобувній, харчовій, хімічній промисловості, сільському господарстві, медицині.

Здатність до синтезу ЕПС виявлено у багатьох мікроорганізмів, проте рівень синтезу цих полімерів коливається в широких межах як для різних продуцентів ЕПС, так і для одного продуцента в різних умовах його культивування. Створення високоефективних технологій одержання практично важливих метаболітів базується на цілеспрямованій регуляції процесу біосинтезу, що в свою чергу потребує глибоких знань фізіології, біохімії та генетики продуцентів.

В Інституті мікробіології і вірусології НАН України селекціоновано штам бактерій *Acinetobacter* sp. – продуцент комплексного полісахаридного препарату етаполану. Цей біополімер завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям можна розглядати як полісахарид мультифункціонального призначення.

Характеристика продуцента етаполану

Штам *Acinetobacter* sp. депоновано в Українській колекції мікроорганізмів під номером В-7005. Штам виділено з ЕПС-утворювальної накопичувальної культури, отриманої шляхом декількох послідовних пересівів зразка активного мулу станції біологічної очистки стічних вод Надворнянського нафтопереробного заводу (Україна) на мінеральному середовищі з етанолом [1, 2]. Дослідження морфолого-культуральних ознак даного штаму показало, що в експоненційній фазі росту клітини паличкоподібні (товсті короткі палички), в стаціонарній – кокоподібні, розташовані парами (диплоформи) або невеликими ланцюжками. Клітини розміром 0,95-1,5×1,2-2,0 мкм, спор не утворюють. Розмноження клітин відбувається бінарним поділом. Клітини грамнегативні, нерухливі. На агаризованому сусловому середовищі утворюють гладенькі блискучі слизоподібні колонії кремового кольору. Розмір трьохдобової колонії – 4-5 мм. На агаризованому мінеральному середовищі з ацетатом, етанолом або сахарозою колонії блискучі, мукоїдні, розміром 1-2 мм; на м'ясопептонному агарі –

гладенькі, білі, опуклі, мукоїдні, розміром 3 мм. При культивуванні на рідких середовищах клітинна популяція утворює в'язку гомогенну суспензію. Штам є облигатним аеробом, каталазопозитивний, оксидазонегативний. Росте на складних органічних середовищах, при рості на мінеральному середовищі з етанолом без внесення факторів росту в культуральній рідині накопичується ацетат [2].

Продуцент етаполану є природним ауксотрофом - потребує для росту пантотенову кислоту та неідентифікований ростовий фактор, що міститься у дріжджовому автолізаті [2].

Таксономічний статус продуцента етаполану. На основі досліджень морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознак, проведених у 80-х роках минулого сторіччя, продуцент етаполану був віднесений до роду *Acinetobacter*. Згідно 9-го видання Визначника Бергі (Керівництво Бергі із систематики бактерій) [3], всі штами бактерій роду *Acinetobacter* є представниками одного виду *Acinetobacter calcoaceticus*. У зв'язку з тим, що за деякими ознаками досліджуваний штам відрізнявся від *A. calcoaceticus*, він був ідентифікований як *Acinetobacter* sp. [1]. Слід зазначити, що після виходу в світ 9-го видання Керівництва Бергі з систематики бактерій було описано кілька десятків видів роду *Acinetobacter* [4], однак продуцент етаполану відрізнявся від них також. Великий об'єм інформації, накопичений щодо властивостей штаму В-7005, зумовив необхідність уточнення його таксономічного статусу. Тому було проведено ряд молекулярно-біологічних досліджень цього штаму, зокрема, аналіз 16S рРНК. Проведення сиквенс-аналізу гена 16S рРНК показало, що штам В-7005 найбільш близький до представників родів *Rhodobacter* і *Paracoccus* [5]. Так штам *Acinetobacter* sp. В-7005 об'єднується в єдиний кластер з фотосинтезувальним штамом *Rhodobacter capsulatus* ATCC 11166 (D16428) з відносно невисоким коефіцієнтом подібності – 95,7 %. Штам *Acinetobacter* sp. В-7005 також був близький до фотосинтезувальних бактерій *Rhodobacter massiliae* та *R. sphaeroides* (рівень подібності – 94,6 - 94,3 %) та нефотосинтезувальної бактерії *Paracoccus* (рівень подібності – 95,2 - 95,0 %). У зв'язку з одержаними результатами, було проведено порівняльний аналіз нуклеотидних

послідовностей генів 16S рРНК декількох штамів *Rhodobacter capsulatus* та *Paracoccus denitrificans* за допомогою програми ClustalX (версія 1.81). Виявлено, що відмінності між генами 16S рРНК цих видів знаходяться в таких позиціях: 36 незбіжних нуклеотидів розподілені практично рівномірно в різних локусах гена 16S рРНК та 26 незбіжних нуклеотидів сконцентровані в одному з фрагментів гена 16S рРНК (відповідає позиціям нуклеотидів від 935 до 980). У цьому ж фрагменті ген 16S рРНК *Acinetobacter* sp. В-7005 практично повністю ідентичний *Rhodobacter capsulatus*. Разом з тим, в інших позиціях (де є 36 незбіжних нуклеотидів у *Rhodobacter capsulatus* та *Paracoccus denitrificans*) ген 16S рРНК штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 ідентичний *Paracoccus denitrificans*. У даній роботі назва штаму наведена згідно документів про його депонування в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології НАН України (*Acinetobacter* sp. В-7005), оскільки наведені розбіжності нуклеотидів у різних фрагментах гена 16S рРНК не дали змогу ідентифікувати штам В-7005 як представник роду *Rhodobacter* або *Paracoccus*.

Характеристика препарату мікробного екзополісахариду етаполану

Комплексний полісахаридний препарат етаполан складається з нейтрального і кислого полісахаридів [2, 6-8]. Нейтральний полісахарид, до складу якого входить глюкоза, маноза, галактоза (3:2:1) є мінорним компонентом - його вміст не перевищує 5-6 %. За даними газо-рідинної хроматографії у складі кислого ЕПС виявлені залишки глюкози, манози, галактози і рамнози у молярному співвідношенні 3:2:1:1. У кислому ЕПС встановлена наявність уронових і піровиноградної (ПВК) кислот.

У процесі лужної обробки кислого ЕПС виділена суміш жирних кислот, основними компонентами якої були додеканова, гексадеканова, гексадеценнова, октадеканова та цис-октадеценнова кислоти у співвідношенні 10:29:12:7:20 [1, 8]. Слід зазначити, що наявність жирних кислот, які етерифікують вуглеводний ланцюг, не характерна для мікробних ЕПС.

Кислий ЕПС вміщує 40-50% вуглеводів, білок не виявлено, що підтверджено як негативними реакціями Lowry і Bradford, так і даними ¹³C-ЯМР-

спектроскопії. У ^{13}C -ЯМР-спектрах цього ЕПС були відсутні сигнали з хімічним зсувом 55-57 м.д., характерні для С-N-зв'язку [9]. У складі кислого ЕПС виявлено 20-30% мінеральних компонентів [8, 10].

Встановлено, що залежно від природи використаного джерела вуглецю і концентрації катіонів калію в середовищі культивування *Acinetobacter* sp. В-7005 вміст в ЕПС залишків ПВК варіює (в % до маси умовно сухої речовини) від 3,0 до 4,3; уронових кислот - від 15,3 до 22,5; жирних кислот - від 1,8 до 6,5 [2, 8, 11].

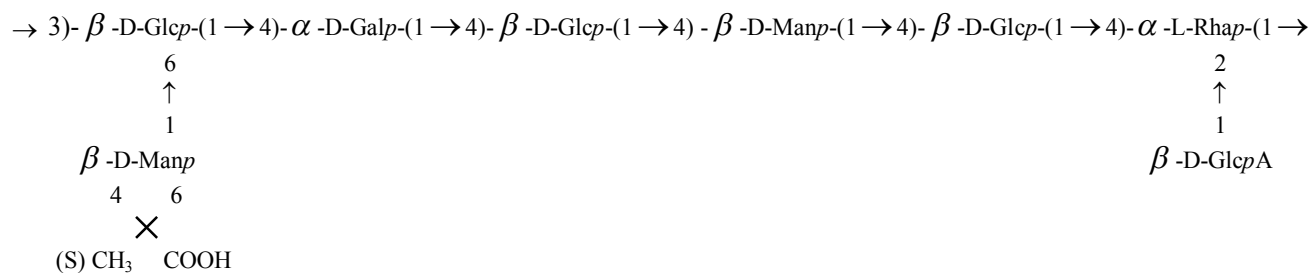
Пізніші дослідження показали, що кислий компонент етаполану складається з ацильованого (АП) і неацильованого (НАП) полісахаридів [7]. Для цього нами було розроблено простий спосіб препаративного розділення ЕПС на ацильований і неацильований компоненти, оснований на емульгувальних властивостях розчинів ацильованих ЕПС [7]. Необхідність розробки даного способу була зумовлена тим, що методи розділення полісахаридів, один з яких містить жирні кислоти, були невідомі. Існуючі на той час методи давали змогу поділити полісахариди на компоненти різної молекулярної маси (наприклад, методи гель-хроматографії [12] і градієнтного центрифугування [13]; фракціонувати кислий і нейтральний полісахариди (на аніонітах целюлози – ДЕАЕ і ЕКТЕОЛА або при обробці цетилтриметиламонієм бромистим [14-16]). Відомим методом розділення сполук, одна з яких має гідрофобну частину, було фракціонування на колонці з гідрофобними носіями, однак застосування такого методу для препаративного розділення ЕПС обмежене його тривалістю і трудомісткістю.

Емульгування вуглеводню в розчині ЕПС було використане Gutnick із співавт. при виділенні з культуральної рідини ацильованого полісахариду емульсану, синтезованого *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 [17]. Наші експерименти показали, що даний підхід можна з успіхом використати і для розділення полісахаридів, один з яких містить залишки жирних кислот.

Проведений порівняльний аналіз хімічного складу сумарного ЕПС і виділеного з нього АП і НАП показав, що вони ідентичні за молярним співвідношенням D-глюкози, D-манози, D-галактози, L-рамнози, D-глюкуронової та пірвіноградної кислот (3:2:1:1:1:1). Відмінності між цими полісахаридами

полягають в тому, що ацильований ЕПС містить жирні кислоти (C₁₀-C₁₈) [7, 18, 19].

На основі хімічних модифікацій ЕПС, сольволізу ЕПС безводним фтористим воднем, деградації за Смітом, ¹H- і ¹³C ЯМР- спектроскопії встановлена однакова структура повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга неацильованого полісахариду й ацильованого ЕПС після вилучення жирних кислот [19]:



Стійкість глюкози та галактози при деградації за Смітом дало змогу припустити, що, принаймні, ці два моносахаридних залишки ацильовані, проте точне місце О-ацилювання АП однозначно встановити не вдалося [19].

Проведений аналіз реологічних властивостей розчинів нативного й дезацильованого етаполану показав, що розчини дезацильованих ЕПС не структуруються катіонами, їх в'язкість не підвищується при низьких швидкостях зсуву, а також при зниженні рН і в системі Cu²⁺-гліцин [2, 8]. Слід зазначити, що саме ці властивості розчинів етаполану визначають його практичну цінність [8]. Отже, реологічні властивості розчинів етаполану зумовлені наявністю жирних кислот у його складі.

Встановлено, що залежно від умов культивування середня молекулярна маса (ММ) етаполану становить 926,0 – 1441,0 кДа [20]. Аналіз молекулярно-масового складу ЕПС показав наявність компонентів з ММ від 13,5 до 2000 кДа, однак основну масу препарату становили фракції з ММ понад 2000 кДа. Після осадження ЕПС етанолом (ізопропанолом, ацетоном) середня молекулярна маса знижувалась у 2-3 рази і становила 400-500 кДа [20]. На нашу думку, це можна пояснити порушенням структури розчинів етаполану у процесі їхньої обробки

органічними розчинниками. Таке явище характерне для більшості мікробних ЕПС [2].

Синтез етаполану на різних вуглецевих субстратах

Біосинтез етаполану на етанолі. Встановлено, що у процесі росту *Acinetobacter* sp. В-7005 на мінеральному середовищі з етанолом без факторів росту рівень біомаси й ЕПС становив 0,3-0,5 г/л, при цьому в культуральній рідині накопичувався ацетат [2, 21, 22].

Внесення в середовище культивування дріжджового автолізату супроводжувалось збільшенням біомаси та ЕПС до 2-3 г/л. Як відомо, дріжджовий автолізат є джерелом амінокислот, вітамінів, пептидів, пуринів, піримідинів та ряду інших факторів [23]. Тому нами були проведені дослідження впливу на ріст *Acinetobacter* sp. В-7005 цих сполук. Встановлено, що штам не потребує амінокислот, а з вітамінів тільки у присутності пантотенату кальцію спостерігали підвищення рівня біомаси і ЕПС [2, 21].

Проте у ряді послідовних пересівів *Acinetobacter* sp. В-7005 на середовищі з етанолом та пантотенатом кальцію спостерігали поступове зниження біомаси, ЕПС та вимивання культури. Внесення в середовище з етанолом додатково до вітаміну В₅ дріжджового автолізату (0,5% об.) приводило до стабілізації росту і синтезу високов'язкого ЕПС (4,5-5,0 г/л). Це свідчило про те, що штам, окрім пантотенату кальцію потребує також інших ростових факторів, що містяться в дріжджовому автолізаті. Наступні експерименти дали змогу виключити з групи можливих ростових факторів пуринові (аденін, гуанін) і піримідинові (тимін, цитозин, урацил) основи, а також відповідні нуклеотиди (моно- і трифосфати).

Процес одержання етаполану на етанолі у присутності С₄-дикарбонових кислот. З метою інтенсифікації процесу біосинтезу ЕПС на етанолі ми використовували підхід, умовно названий „метаболічний”, суть якого полягала в теоретичному визначенні можливих “вузьких місць” метаболізму культури та пошуку шляхів їх усунення [2, 24, 25].

При вирішенні цієї задачі ми виходили з того, що метаболізм етанолу у гетеротрофних бактерій може здійснюватися шляхом його окиснення через

ацетальдегід до ацетату. Ацетат залучається до подальшого метаболізму через ацетил-КоА [26, 27]. При рості на етанолі бактерії використовують ацетил-КоА, головним чином, на синтез жирних кислот, 2-оксоглутарату, C₄-дикарбонових кислот, із яких потім утворюються C₃-інтермедіати, вуглеводи, амінокислоти, нуклеотиди. Синтез C₄-дикарбонових кислот у мікроорганізмів, які ростуть на етанолі, ацетаті, жирних кислотах або вуглеводнях, здійснюється в гліюксилатному циклі [26, 27].

Оскільки для синтезу коферменту А бактерії *Acinetobacter* sp. В-7005 потребують екзогенного пантотенату кальцію – попередника коферменту А [2, 25], ця гілка метаболізму, очевидно, лімітована ацетил-КоА. Виходячи з цього, було запропоновано вносити C₄-дикарбонові кислоти в середовище з етанолом для підсилення глюконеогенезу та збільшення синтезу ЕПС. Показано, що при культивуванні *Acinetobacter* sp. В-7005 на середовищі з етанолом, що містить пантотенат кальцію та C₄-дикарбонові кислоти, вихід ЕПС від субстрату збільшувався в 2 рази, а кількість синтезованих ЕПС підвищувалась на 30 % [2, 24, 25]. Для подальших експериментів як C₄-блоки було обрано фумарат калію; оптимальна концентрація фумарату, що вносився в середовище культивування, становила 0,2%. Внесення фумарату в експоненційній фазі росту *Acinetobacter* sp. В-7005 при культивуванні на середовищі з етанолом і пантотенатом кальцію, повністю пригнічувало ріст клітин та значно підсилювало синтез ними ЕПС. Ці дослідження показали, що екзогенний фумарат калію використовується на утворення ЕПС, тобто внесення фумарату дає змогу регулювати спрямованість процесів біосинтезу етаполану у *Acinetobacter* sp. В-7005 [2, 24, 25]. Подальші експерименти показали, що додавання фумарату на початку стаціонарної фази росту бактерій приводило до збільшення ЕПС-синтезувальної здатності, при цьому екзогенний фумарат стехіометрично метаболізувався в ЕПС. Процес споживання фумарату (фумарат транспортувався в клітини разом з протоном) супроводжувався підвищенням рН середовища, яке досягало максимуму при повному його використанні, після чого поступово знижувалося до вихідного рівня. Досягнення нейтрального значення рН слугувало „сигналом” необхідності

внесення наступної порції C_4 -дикарбонових кислот. Оскільки при повторному внесенні fumarату спостерігалось поступове зниження рН до вихідного рівня, додавання наступних його порцій здійснювали після підкислення культуральної рідини до рН 7,0. Це дало змогу знизити тривалість процесу культивування *Acinetobacter* sp. В-7005 за рахунок скорочення періодичності внесення C_4 -дикарбонової кислоти.

У подальших експериментах було встановлено, що дробне внесення fumarату калію (порціями по 0,2 %) дало змогу підвищити кількість синтезованих ЕПС в 4-5 разів до (10-15 г/л) і вихід ЕПС від спожитого субстрату (етанол + fumarат) досягав 60-80 % [2, 24, 25].

Проведені пізніше [28-30] ензимологічні дослідження штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 підтвердили висунуте нами теоретичне припущення про можливі шляхи метаболізму етанолу у даних бактерій. Так, було встановлено, що „вузьким” місцем C_2 -метаболізму у *Acinetobacter* sp. В-7005 є асиміляція ацетату, про що свідчило інгібування іонами натрію як окиснення ацетату в інтактних клітинах, так і активності ацетил-КоА-синтетази в безклітинному екстракті, а також лімітування C_2 -метаболізму коензимом А [28, 29]. При внесенні в середовище з етанолом C_4 -дикарбонових кислот (fumarату калію) в 1,5-2 рази збільшувалася активність ферментів гліоксилатного циклу, а також fumarатгідратази, малатдегідрогенази й фосфоенолпіруват-синтетази (ФЕП-синтетази). Помітнішим (майже в 7,5 раза) було підвищення в цих умовах ФЕП-карбоксикіназної активності [30]. Таким чином, збільшення синтезу етаполану при культивуванні продуцента на етанолі у присутності C_4 -дикарбонових кислот зумовлено посиленням глюконеогенезу.

Синтез етаполану на вуглеводних субстратах. Встановлено можливість синтезу етаполану при вирощуванні штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 на вуглеводних субстратах (моно- і дисахариди, меляса, крохмаль) [31]. Під час росту продуцента на C_6 -субстратах без пантотенату кальцію кількість синтезованих ЕПС становила 2-3 г/л, проте рН культуральної рідини до кінця культивування знижувалось до 5,5-5,7 [31, 32]. Для з'ясування причин, які

зумовлюють зниження рН культуральної рідини, були досліджені основні етапи метаболізму С₆-сполук у *Acinetobacter* sp. В-7005. Показано, що катаболізм глюкози у даних бактерій здійснюється за шляхом Ембдена-Мейергофа-Парнаса та Ентнера-Дудорова, про що свідчила висока активність ключових ферментів цих шляхів [31]. Наявність 2-оксоглутаратдегідрогеназної активності свідчила про те, що у *Acinetobacter* sp. В-7005 функціонує повний цикл трикарбонових кислот (ЦТК). Було виявлено, що „вузьким місцем” метаболізму глюкози у продуцента етаполану є реакція, що каталізується піруватдегідрогеназою, тобто С₆-метаболізм у даних бактерій лімітований коензимом А. Поповнення пулу інтермедіатів для реакцій конструктивного метаболізму відбувається за участю піруваткарбоксілази. Незалежно від джерела вуглецевого живлення (глюкоза, етанол), у клітинах *Acinetobacter* sp. В-7005 виявлена висока активність ключових ферментів С₂- і С₆-метаболізму. При рості бактерій на глюкозі активність ізоцитратліази становила 4,3 нмоль/(хв мг білка). Встановлено, що індукторами цього ферменту у продуцента етаполану є С₂-сполуки (етанол, ацетат). Внесення низьких концентрацій С₂-сполук (0,01-0,1%) в середовище з глюкозою супроводжувалося одночасним споживанням двох субстратів, збільшенням кількості синтезованих ЕПС (5,1-6,1 г/л) і ЕПС-синтезувальної здатності (4,07-4,25 г ЕПС/г біомаси) [31]. Отримані результати стали основою для розробки [32] технології отримання етаполану на вуглеводах, а також на суміші С₂-С₆-субстратів.

Інтенсифікація синтезу етаполану на суміші ростових субстратів.

Принципово новою є технологія інтенсифікації синтезу мікробного ЕПС етаполану на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів [32-36].

У природних місцях існування мікроорганізми розвиваються в присутності декількох вуглецевих субстратів, у той час як в лабораторних умовах для їх культивування використовуються моносубстрати як єдине джерело вуглецю та енергії. У той же час відомо, що значна частина деяких субстратів витрачається на окиснення до СО₂ для одержання енергії, необхідної для конструктивного метаболізму (наприклад, на глюкозі - 40%). Поряд з цим існують роботи, в яких

доведена здатність мікроорганізмів використовувати суміші двох (чи більше) субстратів і досліджені деякі аспекти регуляції таких процесів [27, 37-40]. Проте ці дослідження стосуються використання змішаних субстратів лише для підвищення виходу біомаси.

Відомо, що комбінація енергетично нерівноцінних субстратів дозволяє підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у біомасу [39, 40]. Ми припустили, що такий підхід може бути застосований не тільки для підвищення виходу біомаси, а й для інтенсифікації синтезу вторинних метаболітів (з урахуванням додаткових енергозатрат на їх утворення).

Визначення шляхів енергетичного та конструктивного метаболізму C_2 - C_6 -субстратів у продуцента етаполану дало змогу встановити, які з цих сполук є енергетично надлишковими та енергетично дефіцитними [28, 31]. Встановлено, що окиснення етанолу та ацетальдегіду у даних бактерій здійснюється НАД⁺- та НАДФ⁺-залежними дегідрогеназами [28], тому цей субстрат класифікується як енергетично надлишковий. Катаболізм глюкози у штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 – продуцента етаполану – здійснюється за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса та Ентнера-Дудорова [31]. Згідно з енергетичною класифікацією субстратів Бабеля [39], глюкоза є енергетично дефіцитним субстратом.

У результаті теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ЕПС та біомаси штамом *Acinetobacter* sp. В-7005 встановлено співвідношення концентрацій етанолу та глюкози, що дозволяє уникнути непродуктивних втрат вуглецю та енергії, які мають місце при використанні моносубстратів, а також підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів в ЕПС [33, 35]. Введення етанолу в середовище з глюкозою у молярному співвідношенні 3,1:1 дало змогу збільшити кількість синтезованих ЕПС в 1,8-1,9 рази (до 7,5-8,0 г/л), ЕПС-синтезувальну здатність у 1,4-1,7 рази (до 3,8 г ЕПС/г біомаси), а вихід ЕПС від субстрату в 1,5-2 рази (до 62-65%) у порівнянні з вирощуванням продуцента на моносубстратах.

Дослідження, результати яких викладені в роботах [32-34, 36] показали, що при культивуванні *Acinetobacter* sp. В-7005 на суміші етанолу та глюкози обидва

субстрати споживаються одночасно, при цьому підвищується в 1,3-1,4 рази максимальна питома швидкість росту і значно скорочується час її досягнення.

Проте, при культивуванні продуцента етаполану на суміші етанолу й глюкози, часто спостерігали підвищення не тільки синтезу ЕПС, але і біомаси. Тому у подальших дослідженнях були визначені умови культивування бактерій, які забезпечують максимально повну конверсію вуглецю обох субстратів саме в ЕПС [32, 36]. Встановлено, що при вирощуванні продуцента етаполану на суміші етанолу та глюкози найвища ефективність трансформації вуглецю субстратів в ЕПС спостерігається при: 1) використанні посівного матеріалу, вирощеного на етанолі або суміші етанолу і глюкози; 2) зниженні концентрації джерела азотного живлення (нітрату амонію) в середовищі до 0,3-0,45 г/л; 3) відсутності катіонів натрію в середовищі культивування.

Дослідження активності ключових ферментів C_2 -метаболізму (алкоголь- та ацетальдегіддегідрогеназ, ацетаткінази, ацетил-КоА-синтетази) та C_6 -метаболізму (фосфофруктокінази та фосфоглюконатдегідратази) при вирощуванні продуцента етаполану на суміші етанолу та глюкози показало, що їх значення були дещо нижчими у порівнянні з вирощуванням на відповідних монособстратах [36, 41]. Більш значним було зниження на змішаному субстраті ізоцитратліазної та малатсинтазної активності (у порівнянні з культивуванням на етанолі). У зв'язку з цим ми припустили, що ацетил-КоА, який утворюється з етанолу в ацетаткіназній та ацетил-КоА-синтетазній реакціях, залучається до подальшого метаболізму переважно через ЦТК. Показано, що при вирощуванні бактерій на суміші етанолу та глюкози активність ферментів ЦТК була вищою, ніж на етанолі (особливо активність ізоцитратдегідрогенази). Можливо, роль гліюксилатного циклу в метаболізмі продуцента етаполану на змішаному субстраті є не такою значною, як на етанолі. Тим більше, що в умовах міксотрофного росту бактерій спостерігали підвищення активності піруваткарбоксилази – ферменту анаплеротичної реакції, що забезпечує поповнення пулу C_4 -дикарбонових кислот при вирощуванні на вуглеводах. Разом з тим одночасне функціонування двох анаплеротичних шляхів (гліюксилатного циклу та піруваткарбоксилазної реакції) може свідчити про

посилення глюконеогенезу в умовах міксотрофного росту продуцента. Дійсно, активність ФЕП-синтетази – ключового ферменту глюконеогенетичної гілки обміну речовин на змішаному субстраті була у 3 і 1,5 рази вищою, ніж на глюкозі та етанолі відповідно. Таким чином, результати ензимологічних досліджень свідчили про зміну напрямку процесів біосинтезу на суміші C₂-C₆-субстратів у бік утворення ЕПС у порівнянні з вирощуванням бактерій на монособстратах.

Одержані дані є основою для створення принципово нових технологій одержання практично цінних вторинних метаболітів на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів.

Регуляція C₂-метаболізму у *Acinetobacter sp. B-7005* і вдосконалення технології біосинтезу етаполану на етанолі. Недоліком розробленої раніше технології одержання етаполану на етанолі була необхідність підтримання нейтрального значення рН у процесі культивування продуцента, що досягалось введенням у середовище високої концентрації солей (11 г/л) для створення достатньо ємного фосфатного буфера (0,05 М). При вирощуванні *Acinetobacter sp. B-7005* на незабуференому середовищі з етанолом спостерігалось зниження рН до 4-5, припинення росту бактерій і синтезу ЕПС [2, 28, 29].

На основі дослідження особливостей енергетичного і конструктивного метаболізму у продуцента етаполану розроблені підходи до регуляції C₂-метаболізму і визначені шляхи управління процесом біосинтезу ЕПС.

Встановлено, що окиснення етанолу й ацетальдегіду здійснюється НАД⁺ і НАДФ⁺-залежними дегідрогеназами, ацетат залучається до метаболізму за участю ацетил-КоА-синтетази [28]. Анаплеротичною послідовністю реакцій, що поповнює пул C₄-дикарбонових кислот в клітинах *Acinetobacter sp. B-7005* і *B-7005* (1НГ), є гліюксилатний цикл, а цикл трикарбонових кислот виконує переважно біосинтетичну роль. Синтез фосфоенолпірувату забезпечується двома ключовими ферментами глюконеогенезу – ФЕП-карбоксикіназою і ФЕП-синтетазою [30].

Встановлено, що „вузьким” місцем метаболізму етанолу у *Acinetobacter sp. B-7005* є асиміляція ацетату: реакція, що каталізується ацетил-КоА-синтетазою, є

швидкість-лімітувальною [28, 29]. Отже, у клітинах бактерій *Acinetobacter* sp. В-7005, що ростуть на етанолі, ацетат утворюється з вищою швидкістю, ніж залучається до подальшого метаболізму.

Наступні дослідження були спрямовані на пошук факторів, що забезпечують однакову швидкість утворення і подальшого метаболізму ацетату в клітинах *Acinetobacter* sp. В-7005, вирощених на етанолі. Встановлено, що інгібіторами ацетил-КоА-синтетази є іони натрію, а також продукти окиснення етанолу й ацетальдегіду – НАДН і НАДФН. Активаторами ферменту є пантотенова кислота, катіони калію й магнію [29]. Зниження початкової концентрації етанолу з 1,0 до 0,5% (з подальшим внесенням 0,5% етанолу у середині експоненційної фази росту), відсутність іонів натрію і наявність 100 мМ K^+ у середовищі культивування продуцента етаполану забезпечували практично однакову швидкість окиснення етанолу, ацетальдегіду і ацетату в інтактних клітинах бактерій, при цьому у три рази підвищувалася активність ацетил-КоА-синтетази в безклітинному екстракті. Це дало змогу реалізувати процес синтезу етаполану на середовищі, молярність якого знижена в 2 рази. Отримання аналогічного результату за початкової концентрації етанолу 1,0% забезпечувалось (на фоні відсутності солей натрію і наявності 100 мМ K^+) при підвищенні концентрації пантотенової кислоти і Mg^{2+} в середовищі до 0,0009-0,0012% і 5 мМ відповідно. Однак при подальшому зниженні концентрації солей і буферної ємності середовища спостерігали зниження синтезу етаполану і накопичення ацетату в культуральній рідині. У таких умовах культивування продуценту етаполану активність ацетил-КоА-синтетази була у два рази нижчою [29].

Літературні дані свідчать про те, що ацетил-КоА-синтетаза, яка функціонує в клітинах багатьох про- і еукаріот, є індукцибельним ферментом [42, 43], індуктором синтезу якого є ацетат [44]. Наші експерименти показали, що внесення в середовище з етанолом екзогенного ацетату дає змогу підвищити активність ацетил-КоА-синтетази в клітинах *Acinetobacter* sp. В-7005 [45].

На основі дослідження регуляції C_2 -метаболізму розроблено спосіб одержання етаполану, ключовими елементами якого є: відсутність у середовищі

культивування катіонів натрію, підвищення у ньому концентрації пантотенату кальцію до 0,0009 %, а також наявність 0,1 % ацетату калію при одержанні інокуляту і біосинтезі полісахариду. Це дало змогу здійснити без зниження показників синтезу процес одержання етаполану на незабуференому середовищі, в якому вміст солей знижено у 4 рази (з 11 до 2,95 г/л).

Принципи регуляції фізико-хімічних властивостей етаполану

Відомо, що умови культивування продуцента впливають не тільки на синтез ЕПС, а й на фізико-хімічні властивості кінцевого продукту [46-48]. У різних умовах культивування може змінюватися хімічний склад ЕПС, їхня молекулярна маса, співвідношення декількох полісахаридів, що впливає на реологічні властивості ЕПС, які визначають практичну значущість цих полімерів. Тому важливою і необхідною умовою розробки біотехнологій мікробних ЕПС є стабільність фізико-хімічних властивостей полісахаридів, а також можливість регуляції властивостей полімерів залежно від області їх практичного використання.

Встановлено, що в процесі періодичного культивування *Acinetobacter* sp. В-7005 у складі етаполану змінюється співвідношення АП і НАП [6, 49, 50]. Синтез обох полісахаридів починається з перших годин росту бактерій і здійснюється паралельно. На момент досягнення максимальної в'язкості 0,02% розчинів етаполану вміст АП в його складі був найвищим і становив 65-68%. До кінця періодичного процесу в складі ЕПС збільшувався вміст НАП (до 60%), що супроводжувалось зниженням в'язкості його розчинів [6]. Крім того, розчини ЕПС з високим вмістом НАП не підвищували в'язкість в присутності катіонів, в області низьких швидкостей зсуву, при зниженні рН, а також в системі Cu^{2+} -гліцин, тобто не характеризувалися реологічними властивостями, які визначають практичну цінність етаполану [49]. Таким чином, властивості розчинів етаполану залежать від співвідношення АП і НАП в його складі [50]. Для отримання ЕПС, розчинам яких притаманні необхідні реологічні властивості, процес

культивування продуцента слід зупиняти до стаціонарної фази росту, що призводить до зниження кількості синтезованих ЕПС.

Наступні дослідження показали, що при збільшенні у два рази (з 0,025 до 0,05 М) концентрації K^+ в середовищі спостерігалось поступове підвищення в'язкості розчинів синтезованих ЕПС впродовж всього процесу культивування. За таких умов вміст АП в ЕПС практично не змінювався і становив 70-75%, до того ж його утворення відбувалося і в стаціонарній фазі росту [51]. Аналогічні закономірності встановлені при вирощуванні продуцента на середовищі, яке вміщує 0,10 М K^+ . В цьому випадку вміст АП в ЕПС становив 90-95%. Одержані дані свідчили про те, що при культивуванні *Acinetobacter* sp. В-7005 на середовищі з підвищеним вмістом K^+ можна, незалежно від тривалості процесу, одержувати ЕПС з необхідними реологічними властивостями. Аналіз хімічного складу ЕПС, синтезованих на середовищах з різною концентрацією K^+ (0,025-0,1 М), показав, що вони відрізнялися між собою вмістом АП, а також вмістом жирних кислот в АП [50]. Розчини досліджуваних ЕПС характеризувалися різною в'язкістю в присутності катіонів, при низьких значеннях рН, а також в системі Cu^{2+} -гліцин. Таким чином, реологічні властивості розчинів етаполану визначаються не тільки співвідношенням АП і НАП у його складі, але й вмістом жирних кислот в АП [6, 49-51].

Встановлено, що синтез ацильованого ЕПС залежав від вмісту одновалентних катіонів (K^+ і Na^+) у середовищі культивування продуцента. Для утворення високоацильованого АП, який вміщує 12-16% жирних кислот, концентрація одновалентних катіонів (K^+ і Na^+) у середовищі повинна бути не нижче 0,09 М [49, 52].

Для того щоб віднести етаполан до конкурентноздатних промислових мікробних ЕПС, необхідно було розробити керований технологічний процес його одержання, який забезпечує високий вихід ЕПС з певними, наперед заданими властивостями. Раніше [2, 24, 25] була встановлена можливість інтенсифікації синтезу ЕПС *Acinetobacter* sp. В-7005 за рахунок внесення у середовище C_4 -дикарбонових кислот – попередників глюконеогенезу.

Встановлено, що залежно від концентрації одновалентних катіонів у середовищі з фумаратом калію синтезується АП або НАП [49]. Так, збільшення концентрації одновалентних катіонів у середовищі супроводжувалось підвищенням вмісту АП в складі синтезованих ЕПС, що приводило до покращення реологічних властивостей їх розчинів. Проте при цьому вміст жирних кислот впродовж процесу зменшувався від 7,2% (після внесення 1-ої порції фумарату) до 3,5% (після додання 4-ої порції). Це супроводжувалось зниженням в'язкості розчинів ЕПС, синтезованих наприкінці процесу, у присутності катіонів, в H^+ -формі і в системі Cu^{2+} -гліцин [49].

Подальші дослідження показали, що зниження вмісту жирних кислот в АП, синтезованих після внесення останніх порцій фумарату, зумовлено недостатньою кількістю одновалентних катіонів у середовищі культивування бактерій. При підвищенні початкової концентрації одновалентних катіонів у середовищі до 0,14 М з фумарату калію синтезувався АП з високим вмістом жирних кислот (7,5-8,5%), що не змінювався впродовж усього процесу культивування. При цьому властивості розчинів ЕПС, синтезованих після внесення кожної з 4-х порцій фумарату, не змінювались і були аналогічними властивостям ЕПС, утвореним на середовищі без фумарату. [8, 49].

Пізніші дослідження показали, що синтез високоацильованого етаполану можливий і під час вирощування продуцента на середовищах з етанолом, що містять лише 20-40 мМ K^+ . Так, у результаті досліджень з регуляції C_2 -метаболізму у *Acinetobacter* sp. В-7005 було встановлено, що культивування бактерій в умовах усунення метаболічного лімітування, пов'язаного з утворенням ацетил-КоА (попередника жирних кислот), супроводжується синтезом переважно ацильованого ЕПС з високою молекулярною масою (1,5 млн), яка не знижується у процесі виділення й очистки препарату [45].

Встановлено, що етаполан захищає клітини продуцента від несприятливих факторів зовнішнього середовища: дії токсичних похідних кисню, важких металів (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+}), біоциду (формальдегід), детергенту (додецилсульфат натрію), високих і низьких значень рН, нагрівання, висушування, заморожування

[53-56]. Показано, що етаполан виконує захисні функції не тільки щодо клітин продуцента, а й по відношенню до клітин мікроорганізмів, які знаходяться з *Acinetobacter* sp. B-7005 у трофічних взаємовідносинах [55].

Дослідження, результати яких викладені в роботах [8, 57], показали, що за неоптимальних умов культивування *Acinetobacter* sp. B-7005 (при зміні температури, рН середовища, концентрації розчиненого кисню) кількість ЕПС знижувалася, проте ЕПС-синтезувальна здатність залишалася незмінною і становила 1 г ЕПС/1 г біомаси. Розчини ЕПС, синтезованих за неоптимальних умов, характеризувалися різною в'язкістю в присутності катіонів, в H^+ -формі, в системі Cu^{2+} -гліцин. Отримані результати дозволили припустити, що ефективність захисних функцій таких ЕПС є різною, вона корелює з реологічними властивостями етаполану, і найповніше реалізується в неоптимальних умовах культивування *Acinetobacter* sp. B-7005. Проте, при культивуванні бактерій у неоптимальних умовах знижувалася кількість синтезованих ЕПС. У зв'язку з цим ми припустили, що можна одночасно збільшити концентрацію ЕПС і покращити властивості розчинів етаполану шляхом вирощування продуцента в двостадійному процесі, на першій стадії якого здійснювати культивування бактерій в оптимальних для росту й синтезу ЕПС умовах, а на другій – створювати неоптимальні умови (зниження температури до $24^{\circ}C$, підвищення рН до 8,0, внесення до середовища формальдегіду - 30 мкг/мл). Встановлено, що при культивуванні *Acinetobacter* sp. B-7005 в двостадійному процесі кількість синтезованих ЕПС досягала рівня, аналогічного оптимальним умовам [20]. При цьому розчини ЕПС характеризувалися вищою в'язкістю в присутності катіонів, в H^+ -формі і в системі Cu^{2+} -гліцин, ніж полісахариди, синтезовані в оптимальних умовах.

Практичне використання етаполану

Етаполан – ЕПС багатофункціонального призначення, який може бути застосований у різних галузях промисловості [8, 58-62] і сільському господарстві для створення препаратів захисту рослин [63].

Нафтодобування. Такі фізико-хімічні властивості розчинів етаполану як здатність до емульгування, підвищення в'язкості в присутності катіонів, при низьких швидкостях зсуву, при зниженні рН та в системі Cu^{2+} -гліцин привернули увагу фахівців з нафтовидобутку до цього ЕПС як до нафтовитиснювального агента.

Показано, що для інтенсифікації нафтовидобутку є доцільним використання етаполану, що містять у своєму складі 70-95% АП зі ступенем ацилювання 5-12%.

На сьогоднішній день у світі найперспективнішими для застосування в нафтодобуванні вважаються такі мікробні ЕПС: ксантан (продуцент *Xanthomonas campestris*), склероглюкан (продуцент *Sclerotium glucanicum*, *Sclerotium rolfsii*), емульсан (продуцент *Acinetobacter calcoaceticus*).

Етаполан істотно відрізняється від цих полісахаридів значним підвищенням в'язкості розчинів у мінералізованих середовищах. Важливою особливістю розчинів етаполану є підвищення їх в'язкості при підкисленні, що відкриває можливість використання цього ЕПС для пролонгування кислотної обробки призабійних зон пласту. Розчини етаполану є термостійкішими за розчини ксантану і склероглюкану, що дає змогу використовувати їх на родовищах з високими пластовими температурами [59]. Завдяки наявності ліпофільної частини в молекулі етаполану він може стабілізувати емульсії води з нафтою та іншими вуглеводнями. Розчини етаполану характеризуються вищою спроможністю (у порівнянні з відомими біополімерами) збільшувати в'язкість в області низьких швидкостей зсуву ($0,1-1,0 \text{ c}^{-1}$). Етаполан здатний утворювати гелеподібні системи при взаємодії з іонами металів та іншими зшивальними агентами. При цьому спостерігається підвищення в'язкості розчинів модифікованого етаполану більш ніж в 10 разів і стабілізація отриманого розчину при тривалому зберіганні [2, 59].

У нафтодобуванні можливе використання етаполану у вигляді культуральної рідини, що виключає необхідність виділення і попередньої очистки препарату. Застосування такої товарної форми етаполану має додатково ту перевагу, що в ній полісахариди стабілізовані інгредієнтами, які входять до складу культуральної рідини. Крім того, він не має мікрогелевих згустків. Цим

пояснюється легка розчинність етаполану навіть у мінералізованих середовищах і сумісність з іншими хімічними реагентами при приготуванні композицій.

Композиції етаполану і поліакриламід, а також етаполану і силікату натрію, розроблені спільно із співробітниками Інституту “Союзнефтеотдача” (м. Уфа, Росія) і “ВНИИнефть” (м. Москва, Росія), були використані в 1988-1990 роках для інтенсифікації нафтовидобутку на вироблених свердловинах ВО “Башнефть” (Башкортостан). Виготовлення дослідних партій етаполану було здійснене на Башкирському біохімічному заводі, та на ВО “Ензим” (м. Ладижин Вінницької обл.).

Спільно із співробітниками Інституту “ВНИИнефть” (м. Москва, Росія) і ЕНТО “ИТИН” (м. Москва, Росія) розроблено спосіб ізоляції притоку пластових вод за допомогою гелеутворювальних композицій на основі етаполану, неорганічних солей міді і гліцину, який забезпечує високоефективну ізоляцію водопроникних пропластків, і супроводжується збільшенням нафтовидобутку та істотним зниженням обводнення нафти [64]. Розроблений спосіб ізоляції притоку пластових вод був використаний у 1991-1992 роках для гідроізоляції вироблених свердловин на Прилуцькому нафтородовищі (Чернігівська обл.). Промислові партії етаполану були вироблені на дослідній мобільній установці, розробленій спільно з ЕНТО “ИТИН”, в умовах Трипільського біохімічного заводу ВАТ “Стиролбіотех” (м. Обухів Київської обл.).

Застосування 1 т етаполану в нафтодобуванні дає змогу отримати додатково до 240 т нафти.

Побутова хімія й косметологія. У побутовій хімії й косметології використовуються препарати етаполану, розчинам яких притаманна висока емульгувальна активність [8]. Таким вимогам задовольняє етаполан, який вміщує 70% АП зі ступенем ацилювання 12-16%. На основі етаполану розроблено технічний миючий засіб БІМС-1, обсяг реалізації якого в 1989-1990 рр. становив 1000 тон. На основі етаполану розроблена технологія виробництва косметичних кремів під загальною назвою “Екол” [8].

Етаполан з високим вмістом у його складі неацильованого полісахариду

може бути використаний як загущувальний агент у лужних середовищах (наприклад, при виготовленні деяких миючих засобів, пральних паст і т.д.). Застосування в таких умовах етаполану з високим вмістом жирних кислот є недоцільним, оскільки в лужному середовищі (при рН 10 і вище) може спостерігатись часткове дезацильовання ЕПС, що призводить до зниження в'язкості його розчинів і, отже, до зниження ефективності використання ЕПС [8].

Харчова промисловість. Дослідженнями, проведеними в Українському державному університеті харчових технологій (УДУХТ, з 2002 року – Національний університет харчових технологій) під керівництвом чл.-кор. УААН Дробот В.І., показана можливість і доцільність застосування етаполану при виробництві хліба і хлібопродуктів [60-62].

Відпрацьовані технологічні режими і параметри виготовлення хліба "Житомирський" і "Поліський", які забезпечують стабільний ритм тістоутворення і високу якість готового продукту. Встановлена технологічна доза етаполану для випічки хліба, яка становить 0,3-0,5% до маси борошна. Економічний ефект від застосування етаполану полягає в можливості використання борошна 2-го і 3-го сортів (борошна з низьким змістом клейковини), економії борошна за умов додавання до нього етаполану і в уповільненні черствіння хлібопродуктів.

В УДУХТ на основі етаполану розроблені комплексні добавки К-1, К-2 і К-3 для використання при виробництві хліба і булочних виробів з пшеничного борошна з низьким вмістом клейковини. На хлібокомбінаті № 2 (м. Київ) проведено промислові випробування по виробництву хлібопродуктів з комплексними добавками К-1, К-2 і К-3. Об'єм дослідних партій хлібопродуктів, вироблених на основі добавки К-1, становив 21,4 т; К-2 – 24,5 т; К-3 – 21,7 т.

Дослідженнями, проведеними в НДІ гігієни харчування Міністерства охорони здоров'я України, показана відсутність мутагенності, ембріотоксичності, тератогенності і алергенності етаполану, а також встановлена комплексоутворювальна здатність етаполану по відношенню до солей важких металів (на прикладі свинцю). Завдяки здатності етаполану адсорбувати і виводити з організму солі важких металів, хлібопродукти з його використанням

можуть бути рекомендовані для профілактичного харчування.

У харчовій промисловості, на відміну від нафтодобування і косметології, можливе використання етаполану з нижчим вмістом жирних кислот (40-50% АП зі ступенем ацилювання 3-5%).

Захист рослин від вірусних та інфекційних хвороб. Відомо, що мікробні полісахариди різної будови мають антивірусні властивості [64]. Найбільший інтерес привертають гетерополісахариди, в складі яких, поряд з нейтральними моносахаридами, присутні уронові кислоти. Такі полімери мають поліаніонну структуру і завдяки цьому здатні індукувати резистентність організму до вірусних інфекцій *de novo*. У зв'язку з тим, що у препаратах етаполану, поряд з нейтральними моносахаридами, було виявлено значну кількість уронових кислот [8, 32], ми вважали за доцільне дослідити їхню антивірусну активність, зокрема, на моделях фітовірусів.

Випробування препаратів у контактних дослідах *in vitro*, показали, що незалежно від джерела вуглецю в середовищі культивування продуцента (етанол, глюкоза, етанол + глюкоза), ЕПС пригнічували інфекційність вірусу тютюнової мозаїки та Х-вірусу картоплі в рослинах дурману (*Datura stramonium*) і гомфрени (*Gomphrena globosa L.*) у широкому діапазоні концентрацій. Цікаво зазначити, що таку активність мали як нативні, так і дезацильовані препарати етаполану. Це свідчило про те, що жирні кислоти не були, принаймні, головними детермінантами у визначенні антифітовірусних властивостей цього ЕПС [64].

Встановлено, що препарати етаполану в концентрації 500-2000 мкг/мл здатні індукувати стійкість надчутливих рослин тютюну сорту Імунний 580, *Nicotiana sanderae* та дурману до ВТМ-інфекції.

* * *

Таким чином, для синтезу етаполану може бути використаний великий набір субстратів (етанол, С₄-дикарбонові кислоти, вуглеводи – моно- і дисахариди, крохмаль, меляса). Ця властивість вигідно відрізняє продуцент етаполану від відомих мікробних синтетиків, які здебільшого синтезують ЕПС тільки при вирощуванні на вуглеводах (*Xanthomonas campestris*, *Azotobacter*

vinelandii, *Sclerotium glucanicum*, *Aureobasidium pullulans* та ін.). Слід зазначити, що дослідження, проведені в 70-80-х роках ХХ сторіччя, продемонстрували можливість розширення сировинної бази мікробіологічного виробництва ЕПС за рахунок застосування нехарчових субстратів - метану, нижчих спиртів, етиленгліколю, вуглеводнів та нафтопродуктів [48]. Представником нової генерації мікробних ЕПС є емульсан (продуцент *Acinetobacter calcoaceticus*), одержуваний в промисловому масштабі на основі етанолу [17]. Проте в літературі відсутні дані про мікроорганізми, здатні активно синтезувати ЕПС як на вуглеводних, так і на неуглеводних субстратах.

Здатність *Acinetobacter* sp. В-7005 до утворення ЕПС на C_2 - C_6 -сполуках дала нам змогу розробити комплекс різних технологій одержання етаполану на основі широкого набору вуглецевих субстратів, кожна з яких може бути реалізована залежно від економічної доцільності, наявності та доступності того чи іншого субстрату, необхідності одержання ЕПС з певними фізико-хімічними властивостями.

Для інтенсифікації синтезу етаполану нами були використані такі підходи:

- встановлення сукупності оптимальних зовнішніх факторів (природа і концентрація факторів росту, джерел вуглецевого і азотного живлення, співвідношення С/Н, спосіб подачі субстрату та ін.);
- внесення у середовище культивування попередників біосинтезу полісахаридів;
- використання суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів;
- виявлення „вузьких” місць метаболізму й розробка підходів до їхнього усунення.

Для регуляції фізико-хімічних властивостей етаполану ми застосовували такі підходи:

- виявлення в складі ЕПС функціональних груп, що визначають їх реологічні властивості, та пошук факторів, які забезпечують синтез ЕПС з необхідними функціональними групами;

- дослідження змінення складу і властивостей ЕПС в процесі культивування продуцента і визначення фази росту, в якій відбувається синтез ЕПС з необхідними фізико-хімічними властивостями;

- дослідження взаємозв'язку між реологічними властивостями ЕПС та їх захисними функціями та визначення умов культивування продуцента, необхідних для прояву захисних функцій.

Деякі з цих підходів до інтенсифікації синтезу ЕПС і регуляції їх фізико-хімічних властивостей реалізовані нами вперше.

Так, відомі на теперішній час літературні дані про використання мікроорганізмами змішаних субстратів свідчать лише про підвищення синтезу біомаси на суміші ростових і неростових субстратів. Ми вперше показали можливість інтенсифікації синтезу вторинних метаболітів (на прикладі мікробного екзополісахариду етаполану) на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів. На основі експериментальних даних розроблена технологія одержання етаполану, що дає змогу підвищити майже у 2 рази максимальну швидкість росту продуцента, кількість синтезованих ЕПС, їх вихід по відношенню до біомаси та вихід ЕПС від субстрату, а також скоротити тривалість культивування та покращити реологічні властивості розчинів ЕПС, що визначають його практичну цінність.

У літературі відсутні також будь-які відомості про можливість регуляції реологічних властивостей мікробних ЕПС шляхом змінення ефективності їх захисних функцій. На теперішній час дослідження, пов'язані з вивченням фізіологічних функцій мікробних ЕПС, залишаються поза увагою біотехнологів. На нашу думку, з'ясування причин, які зумовлюють необхідність синтезу ЕПС для самого продуцента, дозволить з нових позицій підійти до вирішення ряду проблем біотехнології мікробних полісахаридів, в тому числі, і одержання ЕПС з заданими властивостями.

Слід зазначити, що способи одержання мікробних ЕПС в двостадійному процесі відомі [65, 66], але вони характеризуються тим, що на першій стадії створюються умови, оптимальні для росту продуцента, а на другій – оптимальні

умови для синтезу ЕПС. Відмінною рисою нашого підходу є те, що на першій стадії процесу продуцент вирощується в оптимальних як для росту, так і для синтезу ЕПС умовах, а на другій стадії створюються неоптимальні (або навіть стресові) для продуцента умови, в яких найповніше проявляються захисні функції мікробних ЕПС. У відповідь на несприятливі умови синтезуються полісахариди із зміненими реологічними характеристиками.

У літературі відзначається стимулююча дія органічних кислот (пірувату, цитрату, сукцинату, α -кетоглутарату) на утворення ксантану бактеріями *Xanthomonas campestris* [67]. Автори вважають, що дія органічних кислот пов'язана з встановленням сприятливого для синтезу ксантану значення рН. Аналогічний ефект має місце при введенні в середовище культивування *X. campestris* фумарової кислоти [68]. У цьому разі спостерігається збільшення виходу ксантану з 6.0 до 9.1 г/л. Механізм дії екзогенного фумарату при рості продуцента етаполану на C_2 -сполуках принципово інший, оскільки у даному разі C_4 -дикарбонові кислоти є інтермедіатами метаболізму етанолу, що безпосередньо залучаються до глюконеогенезу.

Наведені підходи до інтенсифікації синтезу і регуляції властивостей етаполану можуть бути застосовані не тільки при розробці технологій мікробних полісахаридів, а й будь-яких практично важливих вторинних метаболітів.

Унікальні реологічні властивості розчинів етаполану (здатність до емульгування, підвищення в'язкості у присутності одно- та двовалентних катіонів, при зниженні рН, в області низьких швидкостей зсуву, у системі Cu^{2+} -гліцин), сукупність яких не характерна для жодного з відомих мікробних ЕПС, дають змогу розглядати його як полісахарид мультифункціонального призначення, який може бути використаний у нафтовидобувній, хімічній, парфумерно-косметичній, харчовій промисловості і сільському господарстві.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гринберг Т.А., Дерябин В.В., Краснопецева Н.В., Пирог Т.П., Бедрина Е.В., Степанюк В.В., Малащенко Ю.Р. Некоторые свойства полисахарида, синтезируемого культурой *Acinetobacter* sp. // Микробиол. журнал. – 1987. – Т.49, № 4. – С. 24-30.
2. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C₁-C₂-соединениях. – К.: Наукова думка, 1992. – 212 с.
3. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. – 9 th ed. – Baltimore; London: Williams & Wilkins Co. – 1984. – Vol.1. – 945 p.
4. Bouvet P.J.M., Grimont P.D.D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii* // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1986. – Vol.36, №2. – P.228-240.
5. Романовская В.А., Рокитко П.В., Шилин С.О., Малащенко Ю.Р. Актуальные проблемы филогенетической классификации бактерий // Микробиол. журн. – 2003. – Т.65, № 5. – С. 46-65.
6. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Пинчук Г.Э., Буклова В.Н., Малащенко Ю.Р. Изменение состава и свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования // Микробиология. – 1994. – Т.63, № 6. – С.1015-1019.
7. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э., Сенченкова С.Н., Малащенко Ю.Р. Разделение экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp., на ацилированный и неацилированный компоненты // Микробиология. – 1994. – Т.63, № 5. – С.840-846.
8. Пирог Т.П. Принципы регуляции состава и физико-химических свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. – Дисс..... докт. биол. наук. – Киев, Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1999. – 450 с.
9. Kochetkov N.K., Vyramova N. E., Tsvetkov Yu.E, Baskinovskiy L.V. Synthesis of the O-specific polysaccharide of *Shigella flexneri* // Tetrahedron. – 1985. – Vol.41, № 16. – P.3363-3375.
10. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В., Воцелко С.К. Физико-химические свойства микробного экзополисахарида этаполана, синтезированного на смеси ростовых субстратов // Микробиология. – 2004. – Т.73, № 1. – С. 19-24.
11. Пирог Т.П., Краснопецева Н.В., Гринберг Т.А., Власов С.А., Воцелко С.К., Малащенко Ю.Р. Изменение некоторых свойств экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования //

- Биотехнология. – 1991. – № 4. – С. 67-70.
12. *Детерман Г.* Гель-хроматография. - М.: Мир, 1970. - 252 с.
 13. *Votselko S.K., Pirog T.P., Malashenko Y.R., Grinberg T.A.* A method for determining the mass-molecular composition of microbial exopolysaccharides // *Journal of Microbiological Methods.* – 1993. – 18. – P. 349-356.
 14. *Елинов Н.П.* Химия микробных полисахаридов. - М.: Высш. шк., 1984. - 254с.
 15. *Методы химии углеводов / Под ред. Кочеткова Н.К.* - М.: Мир, 1967. - 512 с.
 16. *Захарова И.Я., Косенко Л.В.* Методы изучения микробных полисахаридов. - Киев: Наук. думка, 1982. - 192 с.
 17. *Pat. 4234689 USA IC³ C 12 P 19/04.* Production of α -emulsans / *Gutnick D.L., Rosenberg E., Shabtai Y.* - Publ. 18.11.80.
 18. *Гринберг Т.А., Дерябин В.В., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р.* Микробный синтез экзополисахаридов на C₁-C₂-соединениях // *Прикл. биохимия и микробиология.* – 1990. – Т. 26, № 4. – С. 445—455.
 19. *Пирог Т.П., Сенченкова С.М., Гринберг Т.О., Малащенко Ю.Р.* Структура ацильованого екзополісахариду, синтезованого бактеріями *Acinetobacter* sp. // *Український біохімічний журнал* 2001.– Т.73, № 3. – С. 71-79.
 20. *Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Воцелко С.К.* Двухстадийный способ получения микробного экзополисахарида этаполана с улучшенными реологическими свойствами // *Прикл. биохимия и микробиология.* – 2001. – Т.37, № 4. – С. 449-435.
 21. *Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Буклова В.Н., Малащенко Ю.Р.* Взаимоотношения микроорганизмов в экзополисахаридобразующей смешанной культуре // *Микробиология.* – 1990.– Т.59, № 5. – С. 797-805.
 22. *Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Супрун В.Н., Буклова В.Н., Закардонец Л.А., Малащенко Ю.Р.* Микробные ассоциации – продуценты экзополисахаридов на этаноле // *Микробиол. журнал.* – 1990. – Т.52, № 6. – С. 30-34.
 23. *Мейнелл Д.Ж., Мейнелл Э.* Экспериментальная микробиология. – М.: Мир, 1967. – 347 с.
 24. *Малащенко Ю.Р., Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э.* Регуляция синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на этаноле // *Микробиол. журнал.* – 1993. – Т.55, № 2. – С. 35-41.
 25. *Пирог Т.П.* Регуляция синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на этаноле: Дисс... канд. биол. наук. – К., 1989. – 189 с.
 26. *Готшалк Г.* Метаболизм бактерий. – М.: 1982. – 310 с.
 27. *Малащенко Ю.Р., Соколов И.Г., Романовская В.А.* Микробный метаболизм неростовых субстратов. – К.: Наукова думка, 1987. – 192 с.
 28. *Пирог Т.П., Соколов И.Г., Кузьминская Ю.В., Малащенко Ю.Р.* Некоторые

- особенности метаболизма этанола у мутантного штамма *Acinetobacter* sp., не образующего экзополисахариды // Микробиология. – 2002. – Т.71, № 2. – С. 222-229.
29. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Регуляция метаболизма ацетата у штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – 39, № 2. – С. 180-188.
 30. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // Микробиология. – 2003. – 72, № 4. – С. 459-465.
 31. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Образование на углеводных субстратах экзополисахаридов штаммом *Acinetobacter* sp. и особенности его С₆-метаболизма // Микробиология. – 2002. – Т.71, № 2. – С. 215-221.
 32. Коваленко М.О. Синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші ростових субстратів: Дисс... канд. биол. наук. – К., 2003. – 136 с.
 33. Пирог Т.П., Коваленко М.А. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахарида этаполана на смеси этанола и глюкозы // Междун. конф. “Микробиология и биотехнология XXI столетия» (Минск, 21-25 мая 2002). – С. 56-57.
 34. Пирог Т.П., Коваленко М.А. Интенсификация синтеза микробного экзополисахарида этаполана на смеси энергетически неравноценных субстратов// VIII Украинский биохимический съезд (Черновцы, 1-3 октября 2002). – Укр. биохим. журнал. – 2002.– Т.74, № 46. – С. 74.
 35. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на смеси этанола и глюкозы // Микробиология. – 2003. – Т.72, № 3. – С.348-355.
 36. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В., Криштаб Т.П. Интенсификация синтеза экзополисахарида этаполана на смеси ростовых субстратов // Микробиология. – 2003. – Т.72, № 1. – С. 26-32.
 37. Eggeling L., Sahm H. Enhanced utilization-rate of methanol during growth on a mixed substrate: a continuous study with *Hansenula polymorpha* // Arch. Microbiol. - 1981. - 130, N 5. - P. 362-365.
 38. Egli Th., Käppeli O., Fiechter A. Regulatory flexibility of methylotrophic yeasts in chemostat cultures: simultaneous assimilation of glucose and methanol at a fixed dilution rate // Arch. Microbiol. - 1982. - 131, N 1. - P. 1-7.
 39. Babel W., Müller R.H. Mixed substrate utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics // J. Gen. Microbiol. - 1985. - 131, N 1. - P. 39-45.
 40. Пирог Т.П., Коваленко М.О. Використання мікроорганізмами суміші ростових та неростових субстратів // Мікробіологічний журнал. –2004. – Т.66, № 6. – С. 80-100.

41. Пирог Т.П., Кузьмінська Ю.В., Коваленко М.О. Метаболізм С₂-С₆-субстратів в умовах міксотрофного росту штамів *Acinetobacter* sp. В-7005 та В-7005 (1НГ) // Укр. біохім. журнал. – 2004. - 76, №1. - С. 33-38.
42. Brasen C., Schonheit P. Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea // Arch. Microbiol. - 2001. - V. 175, N 5.- P. 360-368.
43. De Virgilio C., Burckert N., Barth G., Neuhaus J.M., Boller T., Wiemken A. Cloning and disruption of a gene required for growth on acetate but not on ethanol: the acetyl-coenzyme A synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast. - 1992. - V. 8, N 12. - P. 1043-1051.
44. Kumari S., Tishet R., Eisenbach M., Wolfe A.J. Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli* // J.Bacteriol. - 1995. - V. 177, N 10. - P. 2878-2886.
45. Корж Ю.В., Пирог Т.П. Регуляція С₂-метаболізму у *Acinetobacter* sp. в-7005 – продуцента екзополісахариду етаполана // Вісник Одеського Національного університету, серія “Біологія”. – 2005.-Т.10, №3.- С.51-57.
46. Sutherland I.W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides // Annu. Rev. Microbiol. - 1985. - 39. - P. 243-270.
47. Margaritis A., Pace G.W. Microbial polysaccharides // Comprehens. Biotechnol. - Oxford. etc. Pergamon press, 1985. - Vol.3. - P. 1005-1044.
48. Пирог Т.П., Кузьмінська Ю.В. Вплив умов культивування мікроорганізмів-продуцентів екзополісахаридів на їхній синтез та фізико-хімічні властивості // Біополімери і клітина. – 2003. - 19, № 5. - С. 393-413.
49. Пирог Т.П. Образование ацилированных экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. // Микробиология. – 1996. – Т.65, № 5. – С.644-648.
50. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Сенченкова С.Н., Малащенко Ю.Р. Химический состав экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием К⁺ // Микробиология. – 1995. – Т.65, № 4. – С.527-532.
51. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Буклова В.Н., Воцелко С.К., Малащенко Ю.Р. Образование экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием К⁺ // Микробиология. – 1995. – Т.64, № 1. – С.51-54.
52. Пирог Т.П. Влияние одновалентных катионов на образование ацилированных экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. // Микробиология. – 1996. – Т.65, № 5. – С.639-643.
53. Пирог Т.П. Роль экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. в защите клеток продуцента от действия тяжелых токсичных металлов // Микробиология. –

1997. – Т.66, № 3. – 341-346.
54. Пирог Т.П. Роль экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в различных условиях культивирования, в защите клеток продуцента от действия Ba^{2+} и Zn^{2+} // Микробиол. журн. – 1999. – Т.61, № 5. – С. 64-71.
 55. Пирог Т.П. Биологические функции экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. // Биополимеры и клетка. – 1998. – Т.14, № 2. – С. 136-143.
 56. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Малащенко Ю.Р. Защитные функции экзополисахаридов, синтезируемых бактериями *Acinetobacter* sp. // Микробиология. – 1997. – Т.66, № 3. – С.335-340.
 57. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Малащенко Ю.Р. Влияние факторов внешней среды на образование и свойства экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. // Прикл. биохимия и микробиология. – 1998. – 34, N 1. – С. 70-74.
 58. Малащенко Ю.Р., Романовская В.А., Соколов И.Г., Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Мучник Ф.В. Биология бактерий, ассимилирующих C_1 - C_2 -соединения, и биотехнологические аспекты их использования // Микробиол. журн. – 1998. – Т.60, № 6. – С. 38-55.
 59. Grinberg T.A., Pirog T.P., Malashenko Yu.R., Vlasov S.A. Ethapolan: A New Microbial Exopolysaccharide for Oil Industry // Energy & Fuels. – 1995. – Vol.9, № 6.– P. 1086-1089.
 60. Дробот В.И. Использование нетрадиционного сырья в хлебопекарной промышленности. – Киев: Урожай, 1988. – 152 с.
 61. Дробот В.И., Арсеньева Л.Ю., Гринберг Т.А. Структурно-механические свойства пшеничного теста и клейковины при использовании микробных полисахаридов // Изв. вузов. Пищ. технология. – 1987. – №5. – С.53-56.
 62. Дробот В.И., Гринберг Т.А. Влияние микробных экзополисахаридов на структурно-механические свойства теста // Третий симпоз. соц. стран по биотехнологии (Братислава, 25-29 апреля 1983 г.): Сб. тез. – Братислава, 1983. – С.221.
 63. Коваленко М.О., Коваленко О.Г., Пирог Т.П. Антифітовірусна активність нативних та дезацильованих препаратів мікробного екзополісахариду етаполану // Вісни Київського Національного Університету ім. Т. Шевченка. – 2001. – Вип. 35. – С. 32-35.
 64. А.с. 1726732 СССР, МКИ⁵ Е 21 В 33/138. Способ изоляции притока пластовых вод / Власов С.А., Гринберг Т.А., Дерябин В.В., Капырин Ю.В., Краснопевцева Н.В., Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Московцев О.А., Полищук А.М., Потапов А.М. – 15.04.92.
 65. Pat. 2090847 Britain, IC³ C 12 P 19/04. A two-stage continuous process for the production of gelable exopolysaccharide. – Publ. 21.07.82.
 66. Pat. 0112661 Eur. Pat., IC³ C 12 P 19/04. Fermentation process for the production of polysaccharide/ V.G.Tolbot, P.D.Brouing. – Publ. 04.07.84.

67. *Souw P., Demain A.Z.* Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459 // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1979. - 37, N 6. - P. 1186-1192.
68. *Гвоздяк Р.И., Матышевская М.С., Григорьев Е.Ф., Литвинчук О.А.* Микробный полисахарид ксантан. - Киев: Наук. думка, 1989. - 212 с.