

УДК 579.22:577.151.03.54

ВЫДЕЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ - ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ, ДЕГРАДИРУЮЩИХ ЭКЗОПОЛИСАХАРИД *Acinetobacter* sp.

© 1997 г. Т. П. Пирог, Т. А. Гринберг, Ю. Р. Малащенко

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 252627

Поступила в редакцию 17.01.96 г.

Из образцов почв выделены накопительные и чистые культуры микроорганизмов, использующие экзополисахариды (ЭПС) *Acinetobacter* sp. в качестве источника углеродного питания. Исследована способность выделенных монокультур синтезировать ферменты, деградирующие ЭПС *Acinetobacter* sp. Ферментативная активность обнаружена как в супернатантах культуральной жидкости, так и в бесклеточных экстрактах; ферменты являются индуцибельными. При изменении природы и концентрации ростовых субстратов, наличии индукторов в среде выращивания монокультур внеклеточная ферментативная активность увеличивалась незначительно. Предполагается, что для полной деградации ЭПС *Acinetobacter* sp. требуется комплекс ферментов, продуцентами которого могут быть накопительные культуры.

Одно из направлений в исследовании микробных экзополисахаридов (ЭПС) — определение их биологической роли в окружающей среде. ЭПС выполняют защитные функции по отношению к микробным клеткам при попадании их в неблагоприятные условия [1,2]. Однако такая биологическая функция ЭПС, как их способность обеспечивать генетическую стабильность штамма-продуцента, практически не изучена.

В литературе отмечается, что ассоциированный с клетками полисахарид эмульсан обуславливает устойчивость штамма *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 и его мутантов к фагам ар-2 и ар-3, выделенным из сточных вод [3-5]. Очевидно, благодаря эмульсану фаги не могут адсорбироваться на поверхности клетки.

Мы предполагаем, что ЭПС уменьшает вероятность проникновения в клетки плазмид и чужеродной хромосомной ДНК, регулируя таким образом уровень изменчивости микробных популяций. В качестве объекта для проверки этого предположения мы использовали бактериальную культуру *Acinetobacter* sp., продуцирующую высоковязкие ЭПС [6]. При попытках скрещивания *Acinetobacter* sp. с *E. coli* и другими грамотрицательными бактериями не удается осуществить перенос плазмид R68.45 и pULB1 13 в клетки *Acinetobacter* sp. В течение 10 лет использования штамма в лабораторных и опытно-промышленных условиях не наблюдали его изменчивости и лизиса клеток. ЭПС *Acinetobacter* sp. - достаточно стабильный биополимер [7]. Вероятно, наличие у этих бактерий ЭПС, обладающего высокой устойчивостью к биоразложению, обуславливает генетическую стабильность штамма. В связи с этим необходимо исследовать возможность гене-

тической изменчивости клеток *Acinetobacter* sp., свободных от ЭПС. Следует отметить, что клетки *Acinetobacter* sp. не удается отмыть от высокомолекулярных высоковязких ЭПС с помощью применяемых для этой цели способов (например, при использовании растворов NaCl различной концентрации). По нашему мнению, одним из подходов, позволяющих получить клетки, свободные от ЭПС, может быть ферментативная деградация ЭПС субстратспецифичными ферментами.

Цель настоящей работы - выделение накопительных культур, способных использовать ЭПС *Acinetobacter* sp. в качестве источника углеродного питания, исследование способности выделенных из ассоциаций монокультур синтезировать ферменты, деградирующие ЭПС *Acinetobacter* sp., установление некоторых закономерностей культивирования продуцентов, позволяющих повысить уровень активности этих ферментов.

МЕТОДИКА

Культивирование *Acinetobacter* sp., выделение и очистку ЭПС, получение дезацелированных ЭПС осуществляли, как описано в работах [8-10]. Накопительные культуры, использующие ЭПС *Acinetobacter* sp. в качестве источника углеродного питания, получали из образцов почв, отобранных в различных районах Киева и Киевской области, при внесении 0.5 г почвы в 10 мл среды Кодама [11], содержащей 0.1-0.2% ЭПС *Acinetobacter* sp. в качестве источника углерода. Культивирование осуществляли при 30°C, pH 7.0 в течение 5 сут. При последовательных пересевах инокулятом служила культура из предыдущей ферментации в количестве 10% от объема. Для получения накопительных культур проводили 5-7 последова

тельных их пересевов на среде, содержащей в качестве источника углерода нативный ЭПС *Acinetobacter* sp., и затем 2–3 пересева на среде с 0.3% дезацелированного ЭПС.

Выделение монокультур из ассоциаций осуществляли путем высева последовательных 10-кратных разведений клеточных суспензий на агаризованные среды: сусловую (СА), мясопептонную (МПА), глюкозокартофельную (ГКА), среду Громыко и минеральную среду с 0.1% ЭПС *Acinetobacter* sp. Культуральные и физиолого-биохимические свойства культур определяли по общепринятым тестам [12], идентификацию микроорганизмов до рода проводили по [13].

При изучении способности выделенных монокультур использовать в качестве источника углерода углеводы, входящие в состав ЭПС *Acinetobacter* sp. (глюкоза, галактоза, манноза и рамноза), их вносили в среду культивирования в концентрации 0.5–1.0%.

Для выявления конститутивности или индуцибельности ферментов, деградирующих ЭПС, культуры выращивали на жидкой минеральной среде Кодама с 0.1–0.5% глюкозы в качестве ростового субстрата. В качестве индукторов синтеза ферментов использовали ЭПС *Acinetobacter* sp., а также углеводы, входящие в состав этого ЭПС, поскольку основная цепь ЭПС *Acinetobacter* sp. состоит из 1,4-β-глюкозы. Использовали целлюлозу и ксантан фирмы "Sigma" (США). Индукторы вносили в среду в количестве 0.01–0.05% одновременно с ростовым субстратом или в конце логарифмической фазы роста культур.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии (D_{540}), углеводы - по реакции с фенолом и серной кислотой [14], белок - по методу Бредфорд.

Активность ферментов, деградирующих ЭПС *Acinetobacter* sp., определяли в супернатантах культуральной жидкости, полученной после выращивания продуцентов на жидкой среде (внеклеточные ферменты), и в бесклеточных экстрактах (внутриклеточные ферменты). Для получения бесклеточных экстрактов биомассу отделяли центрифугированием (5000 g, 15 мин, 4°C), клетки суспендировали в среде Кодама (рН 7.0), полученную клеточную суспензию обрабатывали ультразвуком (22 кГц, 4 раза по 30 с), дезинтеграт центрифугировали (15000 g, 15 мин, 4°C). Супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта.

О ферментативной активности судили по снижению вязкости 0.1 %-ного раствора ЭПС *Acinetobacter* sp. в присутствии супернатантов или бесклеточных экстрактов. К 5 мл 0.1 %-ного раствора ЭПС *Acinetobacter* sp. (30°C) в среде Кодама добавляли 5 мл супернатанта (30°C), при определении внутриклеточной ферментативной актив-

ности к 8 мл 0.1%-ного раствора ЭПС в среде Кодама добавляли 2 мл бесклеточного экстракта, смесь помещали в стеклянный капиллярный вискозиметр типа "Оствальд" и инкубировали при 30°C в течение 2 ч. Через каждые 30 мин измеряли вязкость раствора.

За начальную принимали вязкость раствора, полученного при обработке 0.1 %-ного раствора ЭПС *Acinetobacter* sp. инактивированным супернатантом или бесклеточным экстрактом. Для инактивизации ферментов супернатант (бесклеточный экстракт) выдерживали в кипящей водяной бане в течение 10 мин.

Ферментативную активность определяли как разность значений начальной вязкости раствора (раствор ЭПС + инактивированный фермент) и вязкости раствора через 2 ч после обработки супернатантом (бесклеточным экстрактом), отнесенную к начальной вязкости, и выражали в процентах.

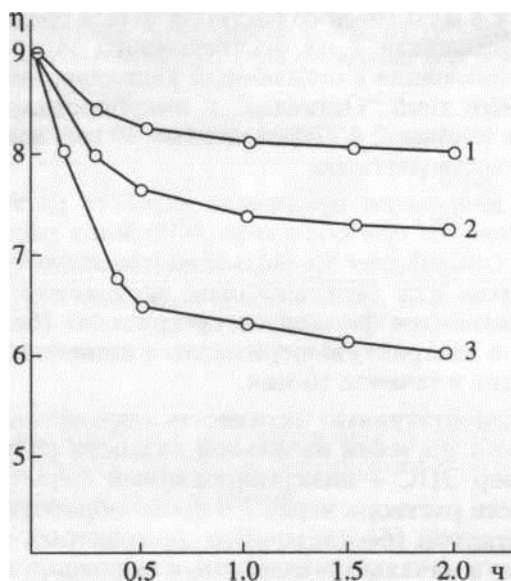
За условную единицу ферментативной активности принимали 10%-ное снижение вязкости 0.1 %-ного раствора ЭПС *Acinetobacter* sp. в течение 2 ч обработки супернатантом или бесклеточным экстрактом. Ферментативную активность выражали в единицах, отнесенных к количеству миллилитров супернатанта или бесклеточного экстракта, взятых для анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ЭПС *Acinetobacter* sp. состоит из остатков нейтральных моносахаридов (глюкозы, галактозы, маннозы, рамнозы); кислые группы представлены остатками глюкуроновой и пировиноградной кислот. Углеводная цепь ЭПС этерифицирована жирными кислотами [6, 8].

Исследования биодеструкции ЭПС *Acinetobacter* sp. показали, что только ограниченный круг микроорганизмов из проверенных различных таксономических и физиологических групп может использовать этот ЭПС в качестве источника углеродного питания [7]. Это в первую очередь микромицеты, анаэробные сульфатредуцирующие и хромвосстанавливающие бактерии и некоторые аэробные гетеротрофы.

При изучении биодеструкции культуральной жидкости *Acinetobacter* sp., содержащей ЭПС, была выделена грибная культура, предварительно отнесенная к роду *Penicillium* (штамм X), в присутствии которой наблюдали существенное снижение вязкости культуральной жидкости на 7–12-е сут хранения ее при комнатной температуре. В последующих экспериментах осуществляли выращивание штамма X на жидкой минеральной среде, содержащей в качестве источника углерода ЭПС *Acinetobacter* sp. (0.2%) или глюкозу (1%). При обработке растворов ЭПС *Acinetobacter* sp.



Изменение вязкости (η) 0.5%-ного раствора дезацелированного ЭПС (1) и 0.1%-ных растворов нативных ЭПС (2,3) *Acinetobacter* sp. при обработке их супернатантами культуральной жидкости штамма X, полученными после выращивания штамма X на среде с ЭПС (1, 3) и глюкозой (2).

супернатантами культуральной жидкости, полученными после выращивания штамма X как на ЭПС, так и на глюкозе, наблюдали снижение вязкости растворов ЭПС (рисунок). Более высокая ферментативная активность была обнаружена в супернатанте после выращивания культуры на среде с ЭПС. В этом случае наблюдали снижение вязкости 0.1% раствора нативного ЭПС *Acinetobacter* sp. на 25–30% в течение 2 ч. Однако при аналогичной обработке супернатантом раствора дезацелированного ЭПС *Acinetobacter* sp. вязкость снижалась лишь на 10% (рисунок).

Следует отметить, что растворы ЭПС *Acinetobacter* sp. обладают высокой вязкостью, которая снижается после дезацелирования ЭПС. Возможно, что снижение вязкости в этом случае связано с изменением конформации молекул ЭПС, обусловленным отщеплением жирных кислот. Наблюдаемое снижение вязкости раствора нативного ЭПС при обработке супернатантом культуральной жидкости штамма X связано, очевидно, с его дезацелированием под действием фермента, обладающего липазной активностью.

Известно, что большинство ферментов, разлагающих полисахариды, являются гликозидазами (амилаза, целлюлаза и др.). Однако ряд микробных полисахаридов (геллан, альгинат, ксантан) способны разлагаться под действием соответствующих лиаз, которые обуславливают негидролитическое отщепление от субстрата определенных групп атомов с образованием двойной связи

[15–18]. Обычно полисахаридные лиазы расщепляют углеводные цепи, в которых 1,4- α - или β -гликозильный остаток соединен с уреновой кислотой. Так, основные продукты действия гелланлиазы – D-глюкоза и дисахарид (тетрасахарид) с ненасыщенной уреновой кислотой [18].

Продуцентами таких ферментов (гидролаз или лиаз), способных осуществлять деградацию полисахаридов, являются микроорганизмы, использующие тот или иной полисахарид в качестве источника углерода. В связи с этим выделение микроорганизмов – продуцентов ферментов, деградирующих ЭПС *Acinetobacter* sp., осуществляли при использовании в качестве ростового субстрата как нативного, так и дезацелированного ЭПС. Этот прием позволил вести отбор микроорганизмов – продуцентов ферментов, расщепляющих углеводную часть ЭПС *Acinetobacter* sp., и исключить при выделении микроорганизмы – продуценты липаз.

В результате проведенной работы из исследованных 15 образцов почв было выделено 6 накопительных культур, которые при росте на среде с дезацелированным ЭПС *Acinetobacter* sp. в течение 4–5 сут снижали вязкость среды до вязкости воды. Наиболее “активной” в отношении ЭПС *Acinetobacter* sp. оказалась накопительная культура № 8, которая полностью потребляла дезацелированный ЭПС за 2 сут культивирования. Последующие эксперименты показали, что накопительные культуры состоят из 3–4 типов бактерий. Исследование способности роста монокультур на среде с ЭПС *Acinetobacter* sp. показало, что они менее активно используют ЭПС в качестве ростового субстрата по сравнению с ассоциациями, из которых монокультуры были выделены: снижение вязкости среды на 40–60% достигалось за 6–10 сут культивирования.

Для дальнейшей работы были выбраны монокультуры, выделенные из ассоциации № 8. В ее составе обнаружены три бактериальные культуры.

Культуры № 1 и 3 – грамтрицательные подвижные палочки. Строгие аэробы, каталазо- и оксидазоположительные, температурный диапазон роста 4–40°C. Между собой различаются размером клеток (№ 1 – 0.5–1.0 мкм, в культуре № 3 клетки более крупные: 0.9–1.5 мкм) и рядом морфолого-культуральных и физиологических свойств. По совокупности признаков обе культуры отнесены к роду *Pseudomonas*. Содержание культуры № 1 в ассоциации составляет 70–75%, культуры № 3 – 5–10%.

Культура № 2 – крупные грамположительные кокки (2.0–3.0 мкм в диаметре). Характерно деление более чем в одной плоскости с образованием пакетов. Аэроб, каталазоположительный, температурный диапазон роста 4–40°C. По совокупности морфолого-культуральных и физиолого-био-

химических признаков культура отнесена к роду *Micrococcus*. Содержание культуры № 2 в ассоциации составляет 15–20%.

При росте монокультур на среде с 0.1% ЭПС *Acinetobacter* sp. в качестве источника углерода ферментативная активность обнаружена как в супернатантах, так и в бесклеточных экстрактах (табл. 1). Следует отметить, что при изменении содержания в реакционной смеси супернатантов от 1 до 5 мл или бесклеточных экстрактов от 0.5 до 2 мл наблюдали линейную зависимость ферментативной активности от объема супернатанта (бесклеточного экстракта).

В дальнейших экспериментах исследовали только внеклеточную ферментативную активность, поскольку процесс выделения и очистки внутриклеточных ферментов более сложен.

С целью увеличения ферментативной активности для культивирования продуцентов применяли субстраты, при росте на которых достигается высокий уровень биомассы, а также индукторы синтеза ферментов (при условии, что ферменты индуцибельны).

Исследование способности роста монокультур на углеводах, входящих в состав ЭПС *Acinetobacter* sp., показало, что в дальнейших опытах в качестве ростового субстрата для всех культур может быть использована глюкоза (табл. 2).

Установлено, что при росте на жидкой минеральной среде с глюкозой внеклеточная ферментативная активность составляет 0.1-0.2 ед/мл (табл. 3). При добавлении углеводов (потенциальных индукторов) ферментативная активность увеличивается. Следовательно, синтезируемые ферменты, деградирующие ЭПС, индуцибельны. Индукторами синтеза ферментов, кроме ЭПС *Acinetobacter* sp., могут быть моносахариды, входящие в его состав и не являющиеся для монокультур-продуцентов ростовыми субстратами. Например, для культуры № 1 это может быть галактоза или рамноза. Однако эксперименты показали, что из всех исследуемых возможных индукторов синтеза ферментов только наличие в среде целлюлозы или ЭПС *Acinetobacter* sp. приводит к увеличению ферментативной активности (табл. 3). Следует отметить, что для культуры № 3 активность ферментов, синтезируемых в присутствии целлюлозы, остается невысокой (0.3 против 0.1 ед/мл без индуктора). При исследовании влияния индукторов на синтез ферментов концентрация глюкозы в среде составляла 0,1%. Такая невысокая концентрация глюкозы была использована во избежание возможного ингибирования синтеза ферментов избытком ростового субстрата.

Аналогичные приведенным в табл. 3 результаты по индукции синтеза ферментов, деградирующих ЭПС, были получены при внесении индукто-

Таблица 1. Активность ферментов, деградирующих ЭПС *Acinetobacter* sp., при росте монокультур на среде, содержащей этот ЭПС в качестве источника углерода

Индекс культуры	Ферментативная активность, ед/мл	
	Супернатант культуральной жидкости	Бесклеточный экстракт
1	0.51	0.72
2	0.45	0.53
3	0.39	0.44

Примечание. Концентрация ЭПС в среде составляла 0.1%.

Таблица 2. Рост монокультур на средах, содержащих в качестве источника углерода углеводы, которые входят в состав ЭПС *Acinetobacter* sp.

Индекс культуры	Оптическая плотность, ×10				
	глюкоза	галактоза	манноза	рамноза	ЭПС
1	0.40	–	0.10	–	0.03
2	0.15	0.08	0.07	0.05	0.02
3	0.20	0.15	0.18	0.14	0.02

Примечание. Концентрация углеводов в среде 0.5%; ЭПС - 0.1%. Время культивирования 3 сут. - роста нет.

Таблица 3. Влияние углеводов (потенциальных индукторов) на синтез ферментов, разлагающих ЭПС *Acinetobacter* sp., при росте монокультур (1,2, 3) на среде с 0.1% глюкозы

Углевод	Внеклеточная ферментативная активность, ед/мл		
	1	2	3
Без добавления	0.20	0.17	0.10
Галактоза	0.23	–	–
Рамноза	0.26	–	–
Ксантан	0.30	0.23	0.20
Целлюлоза	0.60	0.52	0.30
ЭПС <i>Acinetobacter</i> sp.	0.77	0.65	0.57

Примечание. Индуктор в концентрации 0.01% вносили в среду одновременно с ростовым субстратом; “–” не определяли.

ров в конце логарифмической фазы роста продуцента (т.е. к моменту практически полного потребления ростового субстрата).

Дальнейшие эксперименты показали, что наиболее высокая ферментативная активность обнаружена в супернатантах культуральной жидкости на 2-е и 3-и сут роста культур, причем в присутст

Таблица 4. Изменение внеклеточной ферментативной активности в процессе культивирования продуцентов

Индекс культуры	Внеклеточная ферментативная активность, ед/мл					
	24 ч		48 ч		72 ч	
	А	Б	А	Б	А	Б
1	0.48	0.60	0.61	0.78	0.63	0.79
2	0.35	0.50	0.50	0.63	0.49	0.60
3	0.20	0.40	0.30	0.55	0.33	0.51

Примечание. А - индуктор целлюлоза, Б - индуктор ЭПС *Acinetobacter* sp. Концентрация глюкозы (ростовой субстрат) в среде составляла 0.1%.

Таблица 5. Влияние концентрации ростового субстрата на синтез ферментов, разлагающих ЭПС *Acinetobacter* sp.

Индекс культуры	Концентрация глюкозы, %	Внеклеточная ферментативная активность, ед/мл		Содержание белка в супернатанте, мкг/мл	
		А	Б	А	Б
1	0.1	0.61	0.77	14.4	13.8
	0.5	0.65	0.80	32.6	14.0
2	0.1	0.50	0.61	12.3	11.5
	0.5	0.56	0.67	25.9	12.0
3	0.1	0.30	0.54	10.3	11.0
	0.5	0.33	0.57	21.4	11.7

Примечание. А - индуктор целлюлоза, Б - индуктор ЭПС *Acinetobacter* sp. Время культивирования 2 сут.

вии как целлюлозы, так и ЭПС, используемых в качестве индукторов синтеза ферментов (табл. 4).

При повышении содержания глюкозы в среде до 0.5% увеличения ферментативной активности не наблюдали (табл. 5). При использовании в качестве индуктора синтеза ферментов целлюлозы содержание белка в супернатантах повышалось в 2 раза. Очевидно, это связано с синтезом каких-то других внеклеточных ферментов при увеличении концентрации глюкозы в среде.

Из этого следует, что при выращивании исследуемых культур на глюкозе (0.1-0.5%, ростовой субстрат) в присутствии индукторов (целлюлоза или ЭПС *Acinetobacter* sp.) внеклеточная ферментативная активность повышается незначительно по сравнению с таковой при использовании в качестве ростового субстрата 0.1% ЭПС *Acinetobacter* sp. (табл. 1 и 5). Возможно, глюкоза, необходимая в качестве субстрата для роста продуцентов ферментов, образуется при разложении ЭПС

Acinetobacter sp., т.е. является продуктом ферментативной деградации ЭПС.

При замене глюкозы на другие ростовые субстраты, не являющиеся продуктами разложения ЭПС *Acinetobacter* sp. (этанол, фумарат натрия, ксилосу, арабинозу), не наблюдали увеличения внеклеточной ферментативной активности. Во всех случаях она оставалась не выше 0.7-0.8 ед/мл для культуры № 1, 0.6-0.7 ед/мл для культуры № 2 и 0.3-0.6 ед/мл для культуры № 3, т.е. была такой же, как и с глюкозой в качестве источника углерода.

Таким образом, применение использованных нами подходов (наличие индукторов, изменение природы и концентрации ростового субстрата) не позволило существенно увеличить уровень ферментативной активности у монокультур, выделенных из накопительной культуры № 8. По нашему мнению, это связано с тем, что каждая из монокультур, входящих в ассоциацию, синтезирует "свой" фермент, расщепляющий какую-то определенную связь в углеводной цепи ЭПС *Acinetobacter* sp.; в результате такого разрыва вязкость растворов ЭПС снижается не более чем на 30-40%. Вполне вероятно, что для полной деструкции ЭПС *Acinetobacter* sp. необходим комплексный ферментный препарат, продуцентом которого может быть только накопительная культура. Приведенные в настоящей работе результаты подтвердили полученные ранее данные о том, что в отличие от известных микробных полисахаридов ЭПС *Acinetobacter* sp. – достаточно биологически стабильный полимер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ботвинко ИВ. // Успехи микробиологии. 1985. Т. 20. С. 79-122.
2. Семенова Е.В., Гречушкина Н.Н. Экологическая роль микробных метаболитов. М.: Изд-во МГУ, 1986. С. 121-130.
3. Gutnick D.L., Bayer F.A., Rubinovitz G. et al. // Adv. Biotechnol. Proc. 6th Int. Ferment. Symp. Toronto, 1981. V. 3. P. 455-459.
4. Pines O., Guthick D.L. // Arch. Microbiol. 1981. V. 130. № 1. P. 129-133.
5. Pines O., Bayer F.A., Gutnick D.L. // J. Bacteriol. 1983. V. 154. №2. P. 893-905.
6. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C₁-C₂-соединениях. Киев: Наук. думка, 1992. 212 с.
7. Гринберг Т.А., Буклова В.Н., Пирог Т.П. и др. // Микробиол. журн. 1990. Т. 52. № 2. С. 35-39.
8. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э. и др. // Микробиология. 1994. Т. 63. № 5. С. 840-846.
9. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Пинчук Г.Э. и др. // Микробиология. 1994. Т. 63. № 6. С. 1015-1019.
10. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Буклова В.Н. и др. // Микробиология. 1995. Т. 64. № 1. С. 51-54.

11. *Кодама Т., Накахага Т., Омори Т. и др.* //Рост микроорганизмов на С]-соединениях. Тез. докл. симп. Пушино: НЦБИ АН СССР, 1977. С. 213-215.
12. Методы общей бактериологии / Под ред. Герхард- та Ф. М.: Мир, 1984. Т. 3. 264 с.
13. Краткий определитель бактерий Берги / Под ред. Хоулга Дж. М.: Мир, 1980. 496 с.
14. *Dubois M., Gilles K., Hamilton J. et al.* // *Anal. Chem.* 1956. V. 28. № 3. p. 350-356.
15. *Margaritis A., Pace G.W.* // *Comprehens. Biotechnol.* Oxford: Pergamon Press, 1985. V. 3. P. 1005-1044.
16. *Sutherland I.W.* // *Abstr. Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol.* Washington, 1986. P. 272.
17. *Takeshita S., Sato N., Igarashi M., Muramatsu T.* // *Bio- sci. Biotechnol. and Biochem.* 1993. V. 57. № 7. P. 1125-1128.
18. *Kennedy L., Sutherland I.W.* // *Microbiology.* 1994. V. 140. № п. p. 3007-3013.

Isolation of Microorganism-Producers of Enzymes Degrading Exopolysaccharides from *Acinetobacter* sp.

T. P. Pirog, T. A. Grinberg, and Yu. R. Malashenko

Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 252627 Ukraine

Mixed and pure cultures of microorganisms utilizing exopolysaccharides (EPS) from *Acinetobacter* sp. as a carbon source were isolated from soil samples. The isolates were tested for their ability to synthesize enzymes degrading EPS. Enzyme activity was detected in both culture liquid and cell-free extracts. The enzymes were inducible. The extracellular enzyme activity increased slightly in response to variations of the nature and concentration of growth substrates, as well as the presence of inducers in the growth media. The data suggest that the whole complex of enzymes produced by mixed cultures is necessary for complete degradation of EPS from *Acinetobacter* sp.