

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ВОРОНЕНКО АНДРІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ**

УДК 579.841:577.114

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**БІОКОНВЕРСІЯ СУМІШІ ВІДПРАЦЬОВАНОЇ ОЛІЇ ТА  
C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-СУБСТРАТИВ У МІКРОБНИЙ ЕКЗОПОЛІСАХАРИД ЕТАПОЛАН**

Спеціальність 162 – Біотехнології та біоінженерія

Галузь знань 16 – Хімічна та біоінженерія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Вороненко А.А.

Науковий керівник: Пирог Тетяна Павлівна

доктор біологічних наук, професор

**Київ - 2022**

## АНОТАЦІЯ

**Вороненко А.А. Біоконверсія суміші відпрацьованої олії та C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів у мікробний екзополісахарид етаполан. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 162 Біотехнологія та біоінженерія – Національний університет харчових технологій Міністерства освіти та науки України, Київ, 2022.

Мікробні екзополісахариди (ЕПС) завдяки своїм фізико-хімічним властивостям та функціональним характеристикам впродовж десятиліть успішно використовуються в різноманітних галузях промисловості. При цьому справжнього комерційного успіху досягнули лише деякі з них (ксантан, декстран, пулулан та інші), а переважна більшість даних біополімерів продовжують перебувати на початкових стадіях фундаментальних досліджень та становлять виключно науковий інтерес. Головним чином це пов'язано з їхньою високою собівартістю та низькою концентрацією цільового продукту.

Очевидно, що для вирішення даних проблем необхідно проводити пошук дешевої сировини для отримання полісахаридів та загалом здійснювати комплексну оптимізацію умов культивування. З літератури відомо, що одним з перспективних способів підвищення показників синтезу мікробних метаболітів являється використання суміші ростових субстратів.

Дисертаційна робота присвячена встановленню особливостей інтенсифікації синтезу полісахариду етаполану при рості штаму *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші рафінованої соняшникової олії та C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів (ацетат, етанол, м'яса), а також дослідженню можливості заміни рафінованої олії у змішаному субстраті на відпрацьовану.

У дисертаційній роботі вперше продемонстровано можливість підвищення показників синтезу етаполану на суміші енергетично надлишкових субстратів. За молярного співвідношення концентрацій етанолу та рафінованої олії у суміші 1:0,056, максимально наближеного до теоретично розрахованого (1:0,076),

концентрація полісахариду була у 2,6-2,8 разів вищою порівняно з такою на відповідних моносубстратах. У той же час на основі теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ЕПС і біомаси *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на енергетично дефіцитному субстраті (ацетат) визначено, що молярне співвідношення концентрацій ацетату натрію та олії у суміші, за якого досягається максимальний синтез ЕПС, становить 1:0,13.

Встановлено, що незалежно від типу  $C_2$ -субстрату у суміші з олією під час культивування продуцента спостерігалось відхилення рН культуральної рідини від оптимального для синтезу етаполану рівня (7,0-8,0). Для стабілізації рН проведено заміну у середовищі амонійного джерела азоту, транспорт якого у клітини бактерій відбувається антипортом з протоном і супроводжується підкисленням культуральної рідини, на нітратне, що транспортується симпортом з протоном. Додаткове зниження початкової концентрації олії та  $C_2$ -субстратів у середовищі культивування з наступним дробним внесенням у процесі вирощування продуцента на їх суміші супроводжувалося підвищенням синтезу полісахариду у 1,5-6 разів.

Завдяки нейтралізації попередньо гідролізованої меляси у суміші з олією досягнуто додаткового підвищення показників синтезу етаполану на 20-25 %.

Встановлено можливість заміни рафінованої соняшникової олії у суміші з ацетатом, етанолом або мелясою на різні типи відпрацьованої (після смаження картоплі, м'яса, овочів та змішаної після смаження різних продуктів). При цьому продемонстровано, що підвищення з 1,6 до 5,0 мМ вмісту катіонів магнію, які є активатором ацетил-КоА-синтетази – ключового ферменту  $C_2$ -метаболізму у *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005, у середовищі з відпрацьованою олією та  $C_2$ -субстратами супроводжувалося підвищенням синтезу етаполану на 11-58 %.

Розроблено технології одержання етаполану на суміші відпрацьованої соняшникової олії та  $C_2$ - $C_6$ -субстратів (ацетат, етанол, меляса), що включають: 1) вирощування інокуляту на моносубстраті відпрацьованій олії; 2) використання як джерела азоту нітрату калію; 3) підвищення у середовищі культивування вмісту

Mg<sup>2+</sup> до 5 мМ; 4) дробне внесення субстратів. Реалізація таких підходів дала змогу підвищити синтез етаполану до 16-18 г/л, що вище за показники, отримані на відповідних олієвмісних моносубстратах (12-14 г/л), або суміші глюкози (меляси) та C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-субстратів (ацетат, етанол, фумарат) (10-14 г/л).

Одержані результати засвідчують можливість розробки універсальної технології одержання етаполану на суміші відпрацьованої олії та C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів, незалежної від типу та постачальника пересмаженої олії.

**Ключові слова:** бактерія, *Acinetobacter*, процес культивування, позаклітинні полімери, синтез полісахариду етаполан, ростові субстрати, метаболічна активність, рН, олія.

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у періодичних виданнях інших держав

1. Voronenko, A.; Ivakhniuk, M.; Pirog, T. Production of exopolysaccharide ethapolan by *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 on fried oil and oil-containing mixed substrates. *Banat's Journal of Biotechnology*. **2020**, 11(22), pp 66-75. doi: 10.7904/2068-4738-XI(22)-66.

[https://www.bjbabe.ro/wp-content/uploads/2020/11/66\\_VORONENKO.doc.pdf](https://www.bjbabe.ro/wp-content/uploads/2020/11/66_VORONENKO.doc.pdf)

«*Banat's Journal of Biotechnology*» є закордонним виданням (Румунія), міжнародна індексація: *Scopus, Web of Science, CrossRef та ін.*

### Статті у наукових фахових виданнях України

2. Voronenko, A.; Pirog, T. Ethapolan synthesis by *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 on the mixture of C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-substrates and waste sunflower oil. *Ukrainian Journal of Food Science*. **2021**, 9(2), pp 259-268. doi: 10.24263/2310-1008-2021-9-2-12.

<https://nuft.edu.ua/doi/doc/ujfs/2021/2/12>

«*Ukrainian Journal of Food Science*» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162-Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1643 від 28.12.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, EBSCOhost, Google Scholar та ін.*

3. Voronenko, A.; Pirog, T. Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan synthesis on the mixture of energy-excessive substrates. *Ukrainian Food Journal*. **2021**, 10(3), pp 632-645. doi: 10.24263/2304-974X-2021-10-3-15.

<https://nuft.edu.ua/doi/doc/ufj/2021/3/15>

«*Ukrainian Food Journal*» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162-Біотехнології та біоінженерія, категорія А (Наказ Міністерства освіти і науки України № 358 від 15.03.2019); міжнародна індексація: *Web of Science, Google Scholar, Index Copernicus* та ін.

4. Пирог, Т.П.; Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А. Синтез мікробних екзополісахаридів на нетрадиційних субстратах. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*. **2021**, 27(1), с 42-52. doi: 10.24263/2225-2924-2021-27-1-6.

<https://nuft.edu.ua/doi/doc/swnuft/2021/1/6>

«*Наукові праці Національного університету харчових технологій*» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, EBSCOhost, Google Scholar*.

5. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Біоконверсія відпрацьованої олії в мікробний екзополісахарид етаполан для природоохоронних технологій. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*. **2020**, 26(4), с 37-46. doi: 10.24263/2225-2924-2020-26-4-6.

<http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/32053>

«*Наукові праці Національного університету харчових технологій*» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 975 від 11.07.2019); міжнародна індексація: *Index Copernicus, EBSCOhost, Google Scholar*.

6. Pirog, T.P.; Voronenko, A.A.; Yarosh, M.B. Production of exopolysaccharide ethapolan under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on the mixture of acetate and sunflower oil. *Biotechnologia acta*. **2020**, 13(4), pp 71-81. doi: 10.15407/biotech13.04.071.

<https://doi.org/10.15407/biotech13.04.071>

«*Biotechnologia acta*» включений до переліку наукових фахових за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1417 від 28.12.2017), міжнародна індексація: *CrossRef, Google Scholar, Index Copernicus* та ін.

7. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Особливості синтезу етаполану на суміші ацетату натрію та рафінованої соняшникової олії. *Харчова промисловість*. **2019**, 25, с 14-21. doi: 10.24263/2225-2916-2019-25-4.

<https://nuft.edu.ua/doi/doc/fi/2019/25/4>

«*Харчова промисловість*» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 612 від 07.05.2019); міжнародна індексація: *Google Scholar, Index Copernicus*.

8. Вороненко, А.А.; Івахнюк, М.О.; Пирог, Т.П. Синтез екзополісахариду етаполану на суміші меляси та соняшникової олії залежно від способу підготовки меляси. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*. **2019**, 25(3), с 42-48. doi: 10.24263/2225-2916-2019-25-4.

<http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/30025>

«*Наукові праці Національного університету харчових технологій*» включений до переліку наукових фахових видань за спеціальністю 162 – Біотехнології та біоінженерія, категорія Б (Наказ Міністерства освіти і науки України № 241 від 09.03.2016); міжнародна індексація: *Index Copernicus, EBSCOhost, Google Scholar*.

## Патенти

9. Пирог, Т.П.; Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б. Спосіб одержання екзополісахариду. Патент України на винахід 120560, Груд 26, 2019.

### Тези доповідей у матеріалах конференцій

10. Voronenko, A.A. Usage of mixed waste oil in the mixture with acetate for microbial exopolysaccharide ethapolan biosynthesis. *Матеріали XVI Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття»*, Київ, Україна, Червень 3, 2022; с 20-21.

11. Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Вплив відпрацьованих олієвмісних субстратів на реологічні властивості мікробного полісахариду етаполану. *Матеріали II міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»*, Харків, Україна, Травень 20, 2022; с 75-76.

12. Вороненко, А.; Пирог, Т. Особливості біосинтезу етаполану на суміші ацетату натрію та відпрацьованої соняшникової олії. *Матеріали 88 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»*, Київ, Україна, Квітень-Травень, 2022; с 306.

13. Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Оптимізація біосинтезу екзополісахариду етаполану під час культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші етанолу та соняшникової олії. *Матеріали VI Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії»*, Харків, Україна, Листопад 11-12, 2021; с 265-268.

14. Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Мікробний синтез екзополісахариду етаполану на суміші етанолу та відпрацьованої соняшникової олії. *Програма та тези матеріалів X Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 09-10, 2021; с 15-16.

15. Voronenko, A.; Pirog, T. Processing of the mixture of ethanol and refined sunflower oil into the microbial exopolysaccharide ethapolan. *Збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»*, Львів, Україна, Квітень 19-21, 2021; с 124-125.

16. Вороненко, А.; Ярош, М.; Пирог, Т. Використання суміші етанолу та соняшникової олії для біосинтезу мікробного екзополісахариду етаполану. *Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»*, Київ, Україна, Квітень 15-16, 2021; с 393.

17. Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Біоконверсія суміші відпрацьованої соняшникової олії та етанолу в мікробний екзополісахарид етаполану. *Матеріали I міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»*, Харків, Україна, Березень 25, 2021; с 127-128.

18. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Вплив дробного внесення субстратів на синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші етанолу та олії. *Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2020»*, Сєверодонецьк, Україна, Грудень 4, 2020; с 36-37.

19. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Биоконверсия смеси отработанного подсолнечного масла и мелассы в микробный экзополисахарид этаполан. *Матеріали VI Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні питання розвитку біології та екології»*, Вінниця, Україна, Жовтень 21-22, 2020; с 53-54.

20. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Визначення оптимального молярного співвідношення концентрацій ацетату та соняшникової олії у суміші для синтезу етаполану. *Програма та тези матеріалів IX Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 10-11, 2020; с 27-28.

21. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Біосинтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші етанолу та соняшникової олії. *Матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії»*, Харків, Україна, Листопад 26, 2020; с 532-533.

22. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Интенсификация микробного экзополисахарида этаполана на смеси этанола и подсолнечного масла. *Сборник тезисов республиканской научной конференции «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии»*, Ташкент, Республика Узбекистан, Август 12, 2020; с 286-288.

23. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Використання суміші енергетично надлишкових субстратів для синтезу етаполану. *Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття»*, Київ, Україна, Травень 20, 2020; с 21.

24. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Биосинтез микробного экзополисахарида этаполана на смеси энергетически избыточных субстратов. *Збірник тез міжнародної науково-практичної конференції «Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія»*. Київ, Україна, Травень 14-15, 2020; с 41.

25. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Вплив дробного внесення субстратів на синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші ацетату й олії. *Збірник тез доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»*, Львів, Україна, Квітень 27-29, 2020; с 88-89.

26. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Біохімічні особливості синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші енергетично надлишкових субстратів. *Збірник матеріалів XXII Всеукраїнської наукової конференції молодих учених «Актуальні проблеми природничих і гуманітарних наук у дослідженнях*

молодих учених «Родзинка – 2020», Черкаси, Україна, Квітень 23-24, 2020; с 441-443.

27. Вороненко, А.; Ярош, М.; Пирог, Т. Особливості синтезу етаполану на суміші ацетату та олії при дробному внесенні субстратів. *Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті»*, Київ, Україна, Квітень 2-3, 2020; с 374.

28. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Інтенсифікація синтезу екзополісахариду етаполану на суміші ацетату натрію та соняшникової олії. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2019»*, Сєвєродонецьк, Україна, Грудень 12, 2019; с 33.

29. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Биосинтез микробного экзополісахаріда етаполана на смеси ацетата натрия и рафинированного подсолнечного масла. *Сборник тезисов международной конференции молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии»*, Алматы, Республика Казахстан, Ноябрь 28-29, 2019; с 75.

30. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Оптимізація синтезу екзополісахариду етаполану на суміші ацетату натрію та рафінованої соняшникової олії. *Збірник тез VIII Міжнародної науково-практичної онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звернення та надії»*, Київ, Україна, Листопад 15, 2019; с 69-70.

31. Voronenko, A.A.; Yarosh, M.B.; Pirog, T.P. Prospects of microbial exopolysaccharide ethapolan production on the mixture of molasses and mixed waste oil. *Збірник наукових праць VIII Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології»*, Харків, Україна, Листопад 7-8, 2019; с 42-43.

32. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Використання суміші ацетату натрію та рафінованої соняшникової олії для одержання мікробного екзополісахариду етаполану. *Програма та тези матеріалів VIII Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 5-6, 2019; с 64-66.

33. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Использование смеси ацетата натрия и рафинированного подсолнечного масла для синтеза микробного полисахарида этаполана. *Збірник статей V Всеукраїнської наукової конференції студентів «Наукова Україна»*, Дніпро, Україна, Травень 27-28, 2019; с 105-110.

34. Вороненко, А.; Ивахнюк, М.; Ярош, М. Особливості використання різних типів соняшникової олії у суміші з мелясою для синтезу екзополісахариду етаполану. *Book of Abstracts 85 International scientific conference of young scientists and students «Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution»*, Kyiv, Ukraine, April 11–12, 2019; pp 491.

35. Voronenko, A.; Yarosh, M.; Ivakhniuk, M. Determination of optimal molar ratio of acetate and sunflower oil for cultivation of *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 on their mixture. *Book of abstracts of the 85 International scientific conference of young scientists and students «Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution»*, Kyiv, Ukraine, April 11–12, 2019; pp 58.

36. Ярош, М.; Вороненко, А.; Пирог, Т. Влияние способа подготовки мелассы в смеси с подсолнечным маслом на синтез этаполана. *Матеріали II Всеукраїнської науково-практичної конференції «Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи»*, Кропивницький, Україна, Березень 21, 2019; с 121-122.

37. Ярош, М.; Вороненко, А.; Ивахнюк, М. Синтез мікробного полісахариду етаполану на суміші ацетату натрію та соняшникової олії. *Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю*

«Майбутній науковець – 2018 р.», Сєвєродонецьк, Україна, Грудень 14, 2018; с 86-88.

38. Voronenko, A.; Yarosh, M.; Ivakhniuk, M. Influence of molasses neutralization on exopolysaccharide synthesis on mixed substrates. *Матеріали II міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації»*, Київ, Україна, Листопад 15, 2018; с 75.

39. Voronenko, A.A.; Yarosh, M.B.; Ivakhniuk, M.O.; Pirog, T.P. Influence of method of molasses preparation on exopolysaccharide ethapolan synthesis on mixture of substrates. *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Universum View»*, Краматорськ, Україна, Вересень 28, 2018; с 20-21.

## SUMMARY

**Voronenko A.A. Bioconversion of waste oil and C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-substrates mixture into microbial exopolysaccharide ethapolan. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.**

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 162 "Biotechnology and Bioengineering" – National University of Food Technologies of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2022.

Due to its physicochemical properties and functional characteristics, microbial exopolysaccharides (EPS) have been successfully used in various industries for decades. At the same time, only some of them (xanthan, dextran, pullulan, etc.) have achieved a real commercial success, while the vast majority of these biopolymers are still in the initial stages of fundamental research and are of exclusively scientific interest. This is mainly due to their high cost and low concentration of the target product.

Obviously, to solve these problems, it is necessary to search for cheap raw materials for the polysaccharides production and, in general, to carry out complex optimization of cultivation conditions. It is known from the literature that one of the promising methods for increasing the indicators of microbial metabolites synthesis is the use of a mixture of growth substrates.

The dissertation is devoted to the establishment of the peculiarities of intensification of polysaccharide ethapolan synthesis during growth of the strain *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 on the mixture of refined sunflower oil and C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-substrates (acetate, ethanol, molasses), as well as the investigation of the possibility of replacing refined oil in the mixed substrate with a waste one.

In the dissertation, for the first time, the possibility of increasing the synthesis rates of ethapolan on the mixture of energy-excessive substrates was demonstrated. At the molar ratio of concentrations of ethanol and refined oil in the mixture of 1:0.056, as close as possible to the theoretically calculated (1:0.076), the concentration of polysaccharide was 2.6-2.8 times higher compared to that on the corresponding monosubstrates. At the same time, based on theoretical calculations of the energy

requirements of EPS and biomass of *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 synthesis on the energy-deficient substrate (acetate) it was determined that the molar ratio of concentrations of sodium acetate and oil in the mixture, at which the maximum EPS synthesis was achieved, should be 1:0.13.

It was established that regardless of the type of C<sub>2</sub>-substrate in the mixture with oil during the cultivation of the producer, a deviation of the pH of the culture liquid from the optimal level for the ethapolan synthesis (7.0-8.0) was observed. In order to stabilize pH, an ammonium source of nitrogen, which transport into bacterial cells takes place by antiport with proton and is accompanied by acidification of the culture liquid, was replaced with a nitrate source, transported by symport with proton. An additional decrease in the initial concentration of oil and C<sub>2</sub>-substrates in the culture medium followed by fractional application during producer growth on their mixture was accompanied by an increase in polysaccharide synthesis by 1.5-6 times.

Due to neutralization of the pre-hydrolyzed molasses in the mixture with oil, an additional increase in the parameters of the ethapolan synthesis by 20-25% was achieved.

The possibility of replacing refined sunflower oil mixed with acetate, ethanol, or molasses with different types of waste oil (after frying potatoes, meat, vegetables, and mixed after frying various products) has been established. At the same time, it was demonstrated that an increase in the content of magnesium cations from 1.6 to 5.0 mM, which are an activator of acetyl-CoA synthetase – the key enzyme of C<sub>2</sub>-metabolism in *Acinetobacter* sp. IMV B-7005, in the medium with waste oil and C<sub>2</sub>-substrates, was accompanied by an increase in the ethapolan synthesis by 11-58%.

Technologies for the ethapolan production on the mixture of waste sunflower oil and C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-substrates (acetate, ethanol, molasses) have been developed, which include: 1) growing the inoculum on a waste oil monosubstrate; 2) using potassium nitrate as a nitrogen source; 3) increasing the content of Mg<sup>2+</sup> in the culture medium to 5 mM; 4) fractional application of substrates. The implementation of such approaches made it possible to increase the ethapolan synthesis to 16-18 g/l, which is higher than the

indicators obtained on the corresponding oil-containing monosubstrates (12-14 g/l), or the mixture of glucose (molasses) and C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-substrates (acetate, ethanol, fumarate) (10-14 g/l).

The obtained results testify to the possibility of developing a universal technology for ethapolan production on the mixture of waste oil and C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-substrates, independent of the type and supplier of refried oil.

**Key words:** bacteria, *Acinetobacter*, cultivation process, extracellular polymers, synthesis of polysaccharide ethapolan, growth substrates, metabolic activity, pH, oil.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	19
<b>РОЗДІЛ 1. ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТЕХНОЛОГІЙ СИНТЕЗУ МІКРОБНИХ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ</b> .....	27
1.1. Встановлення оптимальних умов культивування .....	27
1.1.1. Поетапна оптимізація біосинтезу полісахаридів з використанням однофакторних досліджень.....	28
1.1.2. Використання багатфакторних досліджень для комплексної оптимізації умов культивування.....	30
1.2. Вдосконалення штамів-продуцентів методами метаболічної та генетичної інженерії.....	45
1.2.1. Основні підходи до регулювання метаболізму продуцентів мікробних полісахаридів.....	45
1.2.2. Використання генетичної інженерії для інтенсифікації синтезу полісахаридів.....	47
1.2.3. Модифікація функціональних характеристик мікробних полісахаридів.....	54
1.3. Використання нетрадиційних субстратів для біосинтезу полісахаридів.....	60
1.3.1. Класичні відходи цукрового виробництва.....	60
1.3.2. Альтернативні джерела азоту у середовищах з відходами цукрового виробництва.....	63
1.3.3. Агропромислові відходи та інші нетрадиційні субстрати.....	66
1.3.4. Невуглеводні альтернативні субстрати .....	69
Висновки до Розділу 1 .....	75
<b>РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ</b> .....	77
2.1. Характеристика об'єктів дослідження.....	77

2.2. Визначення оптимального молярного співвідношення концентрацій моноsubstrатів у суміші.....	77
2.3. Умови культивування штаму продуцента етаполану .....	79
2.4. Визначення показників росту та біосинтезу етаполану.....	85
2.5. Реологічні властивості полісахариду .....	85
2.6. Статистична обробка даних .....	86
<b>РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ РАФІНОВАНОЇ СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ ТА АЦЕТАТУ НАТРИЮ.....</b>	<b>88</b>
3.1. Розрахунок та експериментальна перевірка молярного співвідношення концентрацій моноsubstrатів у суміші .....	88
3.2. Оптимізація умов культивування продуцента для максимального синтезу етаполану на суміші ацетату та олії.....	98
Висновки до Розділу 3 .....	104
<b>РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ ЕНЕРГЕТИЧНО НАДЛИШКОВИХ СУБСТРАТІВ.....</b>	<b>105</b>
4.1. Розрахунок оптимального молярного співвідношення рафінованої соняшникової олії та етанолу у суміші.....	105
4.2. Дослідження можливості синтезу етаполану на суміші енергетично надлишкових субстратів.....	111
4.3. Інтенсифікація синтезу полісахариду на суміші рафінованої соняшникової олії та етанолу.....	113
Висновки до розділу 4 .....	116
<b>РОЗДІЛ 5. УТВОРЕННЯ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ ВІДПРАЦЬОВАНОЇ СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ ТА C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-СУБСТРАТІВ.....</b>	<b>117</b>
5.1. Вплив типу відпрацьованої олії у суміші з мелясою на синтез полісахариду .....	119

5.2. Заміна рафінованої олії на змішану відпрацьовану після смаження різних продуктів у суміші з C <sub>2</sub> -субстратами .....	124
Висновки до розділу 5 .....	129
<b>РОЗДІЛ 6. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ .....</b>	<b>130</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>144</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>	<b>146</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>171</b>
ДОДАТОК А. Акт апробації результатів у навчальний процес .....	171
ДОДАТОК Б. Патент на винахід .....	173
ДОДАТОК В. Список публікацій за темою дисертації .....	175

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Щорічно в світі відкриваються нові та поглиблено досліджуються вже відомі продуценти мікробних екзополісахаридів (ЕПС) [108, 147, 195]. Значний інтерес до даних практично цінних полімерів зумовлений здатністю до змінення реологічних характеристик водних систем та наявністю різноманітних біологічних властивостей (бактерицидна, протизапальна, протипухлинна та ін. [22, 108, 149, 192]), завдяки яким вони знаходять застосування в різноманітних галузях промисловості, від харчової до нафтопереробної [16, 37, 50].

Незважаючи на це впродовж десятиліть в основному продовжують використовуватися одні й ті самі комерційно успішні біополімери [16, 50]. Так, обсяги виробництва лише одного найбільш відомого ЕПС ксантану становлять понад 6 % від світового ринку мікробних полісахаридів [16]. Решту між собою поділяють декстран [36], гелан [48], альгінат [4], леван [163], пулулан [26], сукциноглюкан [72].

У той же час більшість нових мікробних ЕПС, за деякими винятками [103], продовжують перебувати на початкових стадіях фундаментальних досліджень та становлять виключно науковий інтерес [194]. Навіть наявність унікальних практично цінних властивостей [106, 144, 149] не гарантує їхнього успішного промислового впровадження [52, 137]. Основним лімітуючим фактором при цьому є висока собівартість цільового продукту, яка в біотехнологічному виробництві продуктів мікробного синтезу головним чином визначається кінцевою концентрацією полімеру, а також вартістю та ефективністю споживання джерела вуглецю [50, 136].

Оскільки вартість поживного середовища може становити до половини собівартості кінцевого продукту [32, 86, 113], ефективним підходом для її зниження є використання дешевих субстратів, які зазвичай представлені різноманітними вуглеводвмісними відходами агропромислового комплексу (різні види меляси та цукрових сиропів [8, 11, 93, 120, 126, 136, 162, 175, 181], залишки

фруктів та овочів [6, 12, 30, 74, 75, 107, 115, 133, 150, 174], лігноцелюлозні відходи [23, 54, 87, 188] тощо).

Переважає більшість таких відходів містить у своєму складі кілька джерел вуглецю та енергії, які можуть використовуватися продуцентами як ростові субстрати. Відомо, що у разі одночасного споживання кількох субстратів (за умов міксотрофного росту) спостерігається зменшення непродуктивних втрат вуглецю субстратів та підвищення ступеню їх біоконверсії у цільовий продукт [14, 203].

Раніше було продемонстровано можливість інтенсифікації біосинтезу екзополісахариду етаполану (продуцент *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005) на суміші енергетично нерівноцінних (глюкоза та етанол, глюкоза та фумарат) та енергетично дефіцитних (глюкоза та етанол) ростових субстратів [203]. У цих дослідженнях встановлено, що можна суттєво зменшити кількість експериментальних робіт завдяки попередньому теоретичному розрахунку оптимального молярного співвідношення концентрацій субстратів у суміші [203].

Суттєвою перевагою етаполану порівняно з іншими відомими в світі мікробних ЕПС є можливість його одержання не тільки на широкому наборі C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-моносубстратів (етанол, ацетат, органічні кислоти, глюкоза, меляса), а й різноманітній олієвмісній сировині. Так, нещодавно показано можливість синтезу полісахариду на рафінованих та відпрацьованих оліях (соняшниковій, оливковій, кукурудзяній, ріпаковій) [71].

При цьому найвищі показники синтезу етаполану досягалися за умов росту продуцента на пересмаженій (відпрацьованій) соняшниковій олії, що робить її перспективним дешевим енергетично надлишковим моносубстратом для використання у змішаних субстратах [131].

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана на базі кафедри біотехнології та мікробіології Національного університету харчових технологій (НУХТ) згідно держбюджетної наукової тематики кафедри «Розробка високоефективних ресурсозберігаючих біотехнологій з метою їх впровадження у мікробіологічну, фармацевтичну та

харчову промисловість» (2014-2018 рр., № державної реєстрації 0114U003437) та «Біотехнологічний потенціал мікроорганізмів природних та техногенних екосистем» (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U001485).

**Мета і завдання дослідження.**

**Мета дисертаційної роботи** – дослідити можливість біоконверсії суміші рафінованої і відпрацьованої соняшникової олії та  $C_2-C_6$ -субстратів (ацетат, етанол, меляса) у мікробний екзополісахарид етаполан та встановити умови культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005, які б забезпечували максимальні показники синтезу цільового продукту на цих змішаних субстратах.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні **завдання**:

– теоретично розрахувати та експериментально перевірити оптимальне молярне співвідношення концентрацій енергетично нерівноцінних (рафінована олія та ацетат) моносубстратів для синтезу етаполану на їх суміші;

– встановити оптимальні умови культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005, що забезпечують максимальну трансформацію вуглецю олії та ацетату в етаполан;

– визначити енергетичні потреби синтезу ЕПС та біомаси на суміші енергетично надлишкових (олія та етанол) субстратів та розрахувати молярне співвідношення концентрацій під час культивування продуцента етаполану на їх суміші;

– визначити шляхи інтенсифікації синтезу етаполану на суміші олії та етанолу за оптимального молярного співвідношення концентрацій цих моносубстратів у суміші;

– дослідити можливість заміни рафінованої олії у змішаних  $C_2-C_6$ -субстратах на відпрацьовану;

– дослідити синтез етаполану на суміші відпрацьованої олії після смаження різних продуктів та меляси, ацетату або етанолу;

– дослідити реологічні властивості препаратів етаполану, синтезованих на суміші відпрацьованої олії та C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів.

*Об'єкти досліджень* – ЕПС-синтезувальний штам *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005, мікробний полісахарид етаполан.

*Предмет досліджень* – процес синтезу етаполану на суміші рафінованої або відпрацьованої соняшникової олії та C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів (ацетат, етанол, меляса), реологічні властивості етаполану.

**Методи досліджень.** Під час виконання дисертаційної роботи використовували такі методи досліджень: біотехнологічні (культивування штаму *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005); фізико-хімічні (визначення концентрації полісахариду, рН, реологічних властивостей розчинів етаполану); мікробіологічні (визначення концентрації біомаси, морфолого-культуральних ознак бактерій); математичні (статистична обробка результатів досліджень MS Excel, Mathcad).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше встановлено можливість інтенсифікації синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші енергетично надлишкових субстратів. За молярного співвідношення концентрацій етанолу та рафінованої олії у суміші 1:0,056, максимально наближеного до теоретично розрахованого (1:0,076), кількість етаполану була у 2,6-2,8 разів вищою порівняно з такою на відповідних моносубстратах.

На основі теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ЕПС і біомаси *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на енергетично дефіцитному субстраті (ацетат) визначено, що молярне співвідношення концентрацій ацетату натрію та олії у суміші, за якого досягається максимальний синтез ЕПС, становить 1:0,13.

Показано, що зниження початкової концентрації олії та C<sub>2</sub>-субстратів у середовищі культивування з наступним дробним внесенням у процесі вирощування продуцента на їх суміші супроводжувалося підвищенням синтезу етаполану у 1,5-6 разів.

Встановлено, що підвищення з 1,6 до 5,0 мМ вмісту катіонів магнію, які є активатором ацетил-КоА-синтетази – ключового ферменту C<sub>2</sub>-метаболізму у

*Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005, у середовищі з відпрацьованою олією та С<sub>2</sub>-субстратами супроводжувалося підвищенням синтезу етаполану на 11-58 %.

Нейтралізація попередньо гідролізованої меляси у суміші з олією дала змогу додатково підвищити показники синтезу етаполану на 20-25 %.

Встановлено, що заміна у середовищі культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 амонійного джерела азоту, транспорт якого у клітини бактерій відбувається антипортом з протоном і супроводжується підкисленням культуральної рідини, на нітратне, що транспортується симпортом з протоном, дало змогу підвищити кількість етаполану на суміші відпрацьованої олії та С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>-субстратів завдяки підтриманню рН на оптимальному для біосинтезу ЕПС рівні.

**Практичне значення отриманих результатів.** Встановлено можливість заміни рафінованої соняшникової олії у суміші з ацетатом, етанолом або мелясою на різні типи відпрацьованої (після смаження картоплі, м'яса, овочів та змішаної після смаження різних продуктів).

Розроблено технології одержання етаполану на суміші відпрацьованої соняшникової олії та С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>-субстратів (ацетат, етанол, меляса), що включають: 1) вирощування інокуляту на моносубстраті відпрацьованій олії; 2) використання як джерела азоту нітрату калію; 3) підвищення у середовищі культивування вмісту Mg<sup>2+</sup> до 5 мМ; 4) дробне внесення субстратів. Реалізація таких підходів дала змогу підвищити синтез етаполану до 16-18 г/л, що вище ніж на відповідних олієвмісних моносубстратах (12-14 г/л), або суміші глюкози (меляси) та С<sub>2</sub>-С<sub>4</sub>-субстратів (ацетат, етанол, фумарат) (10-14 г/л).

Спосіб одержання екзополісахариду захищено патентом України на винахід – UA 120560 С2. Публікація 26.12.2019.

Показано, що розчини етаполану, синтезованого згідно розроблених технологій, не поступаються за реологічними властивостями розчинам ЕПС, одержаного на суміші рафінованої олії та С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>-субстратів, а також відпрацьованій олії як моносубстраті.

Результати наукових досліджень впроваджені у навчальний процес як модулі навчальних дисциплін «Новітні тренди у природоохоронних технологіях», «Інтенсифікація технологій мікробного синтезу» та «Змішані субстрати у природних умовах та біотехнологічних процесах» для підготовки докторів філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології і біоінженерія».

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною роботою автора. Дисертантом проаналізовано іноземну та вітчизняну наукову літературу з досліджуваної проблеми, проведено теоретичні розрахунки оптимального молярного співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші та проведено відповідні експериментальні дослідження, узагальнено отримані експериментальні дані, проведено їхній порівняльний аналіз з літературними даними.

Планування експериментальних робіт, їх аналіз, підготовка публікацій за результатами досліджень проходили за безпосередньої участі наукового керівника доктора біологічних наук, професора Пирог Т.П.

Визначення показників росту і синтезу полісахариду етаполану (концентрація біомаси, кількість синтезованого ЕПС) на суміші олії та змішаних C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів здійснювалися спільно з магістром кафедри біотехнології і мікробіології НУХТ Ярош М.Б. та аспірантом кафедри біотехнології і мікробіології НУХТ Івахнюком М.О., які є співавторами публікацій.

**Апробація матеріалів дисертації.** Основні матеріали дисертаційної роботи було представлено на Міжнародній науково-практичній конференції «Universum View» (Краматорськ, Україна, 2018); II Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації» (Київ, Україна, 2018); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Майбутній науковець» (Северодонецьк, Україна, 2018, 2019, 2020); II Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи» (Кропивницький, Україна, 2019); 85 International scientific conference of young

scientists and students «Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution» (Kyiv, Ukraine, 2019); V Всеукраїнської наукової конференції студентів «Наукова Україна» (Дніпро, Україна, 2019); VIII, IX, X Міжнародній науково-технічній конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції» (Київ, Україна, 2019, 2020, 2021); VIII Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (Харків, Україна, 2019); VIII Міжнародній науково-практичній онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, Україна, 2019); Международной конференции молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии» (Алматы, Республика Казахстан, 2019); 86, 87, 88 Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (Київ, Україна, 2020, 2021, 2022); XXII Всеукраїнській науковій конференції молодих учених «Актуальні проблеми природничих і гуманітарних наук у дослідженнях молодих учених «Родзинка – 2020» (Черкаси, Україна, 2020); XVI, XVII Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, Україна, 2020, 2021); Міжнародній науково-практичній конференції «Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія» (Київ, Україна, 2020); XIV Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, Україна, 2020); Республиканской научной конференции «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии» (Ташкент, Республика Узбекистан, 2020); V, VI Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, Україна, 2020, 2021); VI Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні питання розвитку біології та екології» (Вінниця, Україна, 2020); I, II міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення

сучасної біотехнології» (Харків, Україна, 2021, 2022); XVI Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття» (Київ, Україна, 2022).

**Публікації.** За результатами роботи опубліковано 39 наукових праць, у тому числі 8 статей, серед яких 1 – у науковому виданні країн Європейського Союзу (міжнародна індексація Scopus та Web of Science); 7 – у наукових фахових виданнях України за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія, з яких – 1 стаття у журналі бази даних Web of Science, категорії «А»; 30 тез доповідей – опублікованих у вітчизняних та закордонних науково-практичних конференціях; одержано 1 патент України на винахід.

**Структура роботи.** Дисертаційна робота складається з вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних джерел (204 найменування), 3 додатки. Основні матеріали викладено на 145 сторінках тексту, який містить 20 таблиць та 8 рисунків.

## **РОЗДІЛ 1. ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТЕХНОЛОГІЙ СИНТЕЗУ МІКРОБНИХ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ**

Оптимізація біотехнологічних процесів являється ефективним інструментом для зниження собівартості мікробних екзополісахаридів (ЕПС) та підвищення їхнього виходу в процесі виробництва в промисловому масштабі, що загалом призводить до підвищення конкурентоспроможності на світовому ринку даних практично цінних полімерів [137]. В контексті промислового виробництва навіть незначне підвищення показників синтезу цільового продукту або зниження його вартості може мати істотну фінансову вигоду, особливо в довгостроковій перспективі.

Відомо, що вихід ЕПС значною мірою варіюється в залежності від умов культивування та природи продуцента. При цьому власне процес культивування є складним та комплексним, а на його ефективність одночасно впливають ряд біологічних та фізико-хімічних факторів [16, 50, 157, 160]. Серед них найбільш вагомими є умови культивування та «природа» продуцента.

### **1.1. Встановлення оптимальних умов культивування**

Умови культивування, за яких досягаються максимальні показники синтезу ЕПС, являються індивідуальною для кожного продуцента комбінацією фізико-хімічних факторів (тип джерела вуглецю та азоту, співвідношення C/N, мінеральний склад поживного середовища, температура, рН, тривалість культивування, швидкість та ефективність масообмінних процесів тощо) [160]. Велика кількість змінних призводить до того, що оптимізація процесу не може обмежуватися варіюванням однією змінною або встановленням оптимальних значень виключно для одного фактору [16].

Для вирішення даного завдання необхідне проведення ґрунтовних експериментальних робіт, які за підходом до планування досліджень можна умовно поділити на однофакторні, під час яких проводиться вивчення впливу параметрів одного фактору варіювання, та багатфакторні, коли одночасно

досліджується взаємодія декількох факторів та їх вплив на процес культивування [49, 78, 96].

### **1.1.1. Поетапна оптимізація біосинтезу полісахаридів з використанням однофакторних досліджень**

Проведення експериментів, в яких одночасно здійснюється варіювання лише однією змінною (*one variable at a time*) є найбільш простим способом встановлення умов культивування, максимально наближених до оптимальних. Зазвичай в таких дослідженнях проводиться послідовне визначення типу та концентрації джерела вуглецю та азоту, рН, температури та оптимальної тривалості культивування.

Так, Elova зі співавт. [41] встановили, що оптимальним для синтезу ЕПС молочнокислими бактеріями *Lactobacillus plantarum* Eb-2 є проведення культивування при рН 5,5 та температурі 37 °С у середовищі з сахарозою (2 %) та пептоном (1 %) впродовж 48 год. За таких умов культивування концентрація полісахариду була у 3,6 разів вищою за показники на базовому середовищі. Варто зазначити, що в даних експериментах для вирощування продуцента використовували середовище, приготоване на молочній сироватці, яке за рахунок наявності катіонів  $Mn^{2+}$  сприяє додатковому підвищенню біосинтетичної активності молочнокислих бактерій [41].

Схожі результати було отримано при дослідженні впливу складу поживного середовища (типу та концентрації джерела вуглецю та азоту), рН та температури на синтез полісахариду штамом *Bacillus* sp. ZBP4. В результаті проведення однофакторних досліджень встановлено оптимальні значення досліджуваних факторів, при яких концентрацію ЕПС було підвищено у 7,5 рази, порівняно з показниками за вихідних умов культивування [42].

Варто зазначити, що у наведених вище дослідженнях [41, 42], незважаючи на істотне підвищення показників синтезу цільового продукту, концентрація отриманого полісахариду була незначною і становила  $\approx 1$  г/л. Зважаючи на це,

вигідно вирізняються роботи [65, 40], в яких кількість синтезованих ЕПС досягала 8-26 г/л.

Hereher зі співавт. [65] проводили скринінг перспективних продуцентів мікробних полісахаридів, виділених з різних зразків ґрунту. Встановлено, що серед 16 ізолятів бактерії *Micrococcus roseus* накопичували найбільшу кількість ЕПС (1,8 г/л). Під час подальшої оптимізації складу поживного середовища та умов культивування (рН, температура та тривалість культивування) концентрацію цільового продукту вдалося додатково підвищити до 8 г/л. У результаті подібного скринінгу зі зразків ґрунту було виділено штам *Aspergillus* sp. ДНЕ6, який після оптимізації умов культивування впродовж 240 год вирощування на середовищі з глюкозою (4 %) накопичував 26,1 г/л, що було у 3,6 рази вищим за вихідні показники на базовому середовищі [40].

У роботі [129] продемонстровано можливість інтенсифікації синтезу полісахаридів штамом *Bacillus licheniformis* 24 завдяки реалізації культивування з підживленням на оптимізованих середовищах з глюкозою або фруктозою у 4,9 та 3,3 рази відповідно. Показано, що оптимальний режим внесення субстратів залежав від використовуваного джерела вуглецю. Так, при рості на глюкозі одноразове внесення субстрату на 40 год вирощування призводить до підвищення кількості синтезованого полісахариду на 30 %. У той же час при внесенні трьох додаткових порцій фруктози на 28, 36, 54 год культивування при рості штаму 24 даному субстраті призводило до підвищення показників синтезу ЕПС лише на 12 %.

Незважаючи на простоту планування та проведення однофакторних досліджень вони мають ряд суттєвих недоліків, зокрема потребують значних трудовитрат та додаткових економічних витрат внаслідок необхідності проведення великої кількості експериментальних досліджень для належного оцінювання впливу кожного фактору та визначення його оптимальних значень.

Зважаючи на зазначене, все більшого розповсюдження набувають багатфакторні дослідження, які дозволяють не тільки одночасно вивчати вплив

більшої кількості факторів при проведенні меншої кількості практичних робіт, але й враховують їх комбіновану взаємодію під час впливу на процес культивування [18, 70, 165].

### **1.1.2. Використання багатофакторних досліджень для комплексної оптимізації умов культивування**

Для ефективної оптимізації умов культивування з використанням багатофакторних досліджень спершу доцільним є визначення найбільш критичних факторів, які потребують більш детального дослідження. Ефективним інструментом для вирішення даної задачі є використання методу математичного планування експериментів за планом (дизайном) Плакета-Бурмана (Plackett-Burman design), який дозволяє обчислити рівень впливу на процес великої кількості змінних при проведенні меншої кількості експериментів [20]. Варто зазначити, що хоча дизайн Плакета-Бермана являється зручним інструментом на початковому етапі оптимізації, проте він не враховує взаємодії, які можуть відбуватися між різними досліджуваними факторами [118].

Зважаючи на це для подальшого комбінованого аналізу факторів, які мають найбільший вплив на процес, зазвичай використовують інші більш комплексні математичні моделі, зокрема, метод Бокса-Вілсона (метод поверхні відгуку, response surface methodology) [18, 70, 165], метод Тагучі [21, 138] та ін. При цьому для планування експериментів залежно від поставлених завдань зазвичай використовують центральний композиційний план (central composite design) або дизайн Бокса-Бенкена (Box-Behnken design) [47]. Так, наприклад, план Бокса-Бенкена є більш ефективним за центральний композиційний дизайн при дослідженні впливу трьох факторів на вибрані відгуки. Ще одна перевага дизайну Бокса-Бенкена полягає в тому, що він не містить комбінацій, для яких усі фактори одночасно знаходяться на найвищому або найнижчому рівні [47]. Таким чином, при плануванні досліджень можна уникнути проведення експериментів з використанням екстремальних значення параметрів, при яких з високою вірогідністю будуть отримані незадовільні результати.

Незалежно від використаного для проведення досліджень підходу першочерговим при проведенні оптимізації умов культивування є встановлення оптимального вмісту компонентів поживного середовища [16]. Зазвичай при цьому основними факторами варіювання є тип та концентрація джерела вуглецю та азоту, а також вміст мікро- та макроелементи, які можуть впливати на синтез ЕПС.

Варто зазначити, що визначення оптимальних типів складових поживного середовища, наприклад, джерела вуглецю та азоту, в таких дослідженнях проводять з використанням однофакторних експериментів, з подальшим уточненням їхнього оптимального вмісту в багатофакторних експериментах.

Так, у роботі [178] встановлено, що оптимальним джерелом вуглецю і азоту для *Streptomyces griseorubens* GD5 є галактоза та дріжджовий екстракт відповідно. При їхньому використанні концентрація ЕПС становила 4,8-5,2 г/л. В результаті подальшого встановлення оптимальної концентрації та співвідношення джерела вуглецю та азоту, а також уточнення вмісту мінеральних солей кількість синтезованого полісахариду було підвищено у 2 рази до 9,5 г/л. При використанні аналогічного підходу для інтенсифікації синтезу ЕПС штамом *Klebsiella oxytoca* ICCF 419 після визначення оптимального співвідношення C/N (23,45) концентрацію цільового продукту було підвищено до 17,4-20,5 г/л [172]. Інші дослідники [170] продемонстрували здатність молочнокислих бактерій *Lactobacillus* sp. при рості на середовищі з декстрозою синтезувати 60 г/л полісахариду. Варто зазначити, що дані результати є дещо сумнівними, оскільки концентрація джерела вуглецю в середовищі культивування становила лише 1,5 %, а прогнозований вихід ЕПС згідно розробленої авторами моделі на основі штучного інтелекту становив 30,17 г/л.

Dhagat зі співавт. [33] встановили, що найвищі показники одночасного синтезу полісахариду (17,6 г/л) та біоемульгатору (6,1 г/л) штамом *Brevibacillus borstelensis* спостерігаються при наявності 2,2 % глюкози, 1,4 % глутамату натрію та 0,6 % дріжджового екстракту у середовищі культивування. На основі

отриманих результатів авторами з використанням штучного інтелекту було розроблено математичну модель, яку планується використати під час проведення часткової заміни компонентів поживного середовища на відходи агропромислового комплексу.

Проведення аналогічних досліджень описано у роботах [104, 145, 164]. Так, Moghannem зі співавт. [104] повідомляють про синтез 7,9 г/л ЕПС на середовищі з мелясою (12 %). У роботі [164] досліджено можливість заміни сахарози та дріжджового екстракту на сік цукрової тростини та чорну чечевицю (урд) відповідно при синтезі декстрану бактеріями *Weissella confusa*. Одночасно з цим використовуючи RSM на основі центрального композиційного плану проводили оптимізацію вмісту складових поживного середовища. У результаті проведених досліджень було не тільки встановлено можливість синтезу ЕПС на альтернативній сировині, але й досягнуто підвищення показників синтезу декстрану у 2,6 рази (до 33,5 г/л) порівняно з результатами, отриманими на базовому середовищі. Інші дослідники [56] встановили, що для оптимального синтезу левану штамом *Bacillus licheniformis* NS032 при рості на мелясі, необхідно спершу провести її комплексну обробку кислотою та активованим вугіллям. При цьому кількість синтезованого полісахариду (10,4 г/л) була у 4-5 разів нижчою, ніж за використання аналогічної концентрації сахарози (200 г/л). Під час подальшої оптимізації складу поживного середовища встановлено, що для досягнення максимальних показників синтезу левану (53,2 г/л) до обробленої меляси (12,5 % за вуглеводами) необхідно додатково вносити сахарозу (7,5 %) та фосфат (0,47 %).

У той же час є повідомлення про синтез 80,1 г/л полісахариду штамом *Weissella confusa* XG-3 [198], які було досягнуто після зниження вмісту сахарози (з 10 % до 8 %) та ацетату натрію (з 0,5 % до 0,37 %) в середовищі культивування та підвищення початкового рН культуральної рідини (з 5,5 до 5,8).

Під час оптимізації вмісту компонентів поживного середовища для синтезу ксантану штамом *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 встановлено, що найвищі

розрахункові показники синтезу полісахариду (12,95 г/л) спостерігаються при наявності у середовищі культивування 3,3 % гліцеролу, 0,055 % пептону та 0,073 %  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . У той же час зниження концентрації джерела вуглецю до 1,6 % та органічного та мінерального джерела азотного живлення до 0,018 % та 0,067 % відповідно, дозволяє знизити залишкову концентрацію гліцеролу та загального азоту у культуральній рідині на 73,77 % та 58,90 % відповідно, що суттєво спрощує виділення та очистку цільового продукту. При цьому концентрація ЕПС знижується лише на 9,19 %.

Більш детальну інформацію про можливість використання альтернативних дешевих субстратів для біосинтезу мікробних ЕПС наведено у *Підрозділі 1.3*.

Варто зазначити, що встановлення оптимальних умов культивування передбачає не лише уточнення оптимального вмісту компонентів середовища культивування, але й визначення параметрів культивування, при яких забезпечуються найвищі показники синтезу цільового продукту. Так, у роботі [43] продемонстровано, що оптимізація параметрів культивування (температура, рН та тривалість культивування) при рості молочнокислих бактерій *Lactobacillus brevis* E25 на стандартному середовищі MRS (середовище De Man, Rogosa та Sharpe), з додаванням 1 % сахарози, призводить до підвищення синтезу ЕПС до 35 г/л. Для штаму *Lactobacillus plantarum* SP8 температура та тривалість культивування разом з вмістом глюкози та дріжджового екстракту, мають найбільший вплив на показники синтезу ЕПС [196]. Додаткове дослідження комплексної взаємодії даних факторів за допомогою методу Бокса-Вілсона сприяло підвищенню кількості синтезованого полісахариду у 18,7 разів, порівняно з культивуванням на стандартному середовищі MRS.

При рості *Lactobacillus rhamnosus* MTCC 5462 на середовищі з глюкозою (1 %) рівень впливу рН на синтез полісахариду був на 8 % вищим ніж вплив концентрації джерела азоту [21]. Загалом за оптимальних умов культивування концентрація ЕПС досягала 10,7 г/л. Для інших представників молочнокислих бактерій, *Lactobacillus acidophilus* LA5 та *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

BB12, при вирощуванні на молочній сироватці, критичним виявилася концентрація джерела азоту (дріжджового екстракту), температура та тривалість культивування [7]. За оптимальних умов культивування незалежно від умов культивування, моно- або змішана культура продуцентів, концентрація полісахаридів була дуже низькою і не перевищувала 0,19-0,35 г/л.

У роботі [20] Bhat зі співавт. досліджували комбінований вплив умов культивування (склад поживного середовища, тривалість культивування, рН) на синтез ЕПС бактеріями *Enterococcus faecium* K1 та *Lactobacillus paracasei* M7. Незважаючи на те, що в результаті оптимізації показники синтезу полісахаридів штамів K1 та M7 було підвищено на 101,4 % та 79,6 % відповідно, концентрація цільового продукту залишалася незначною і не перевищувала 0,7 г/л. Після встановлення оптимальних умов культивування дріжджів *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 на середовищі з сахарозою (2 %) показники синтезу ЕПС підвищувались у 6 разів і досягали 4,86 г/л [45]. Інші автори [134, 190] в результаті аналогічної оптимізації процесу встановили умови культивування *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180 та *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17, при яких забезпечується синтез 2,89 г/л та 50,56 г/л полісахаридів відповідно.

У ході дослідження синтезу ЕПС молочнокислими бактеріями *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0943, LOCK 0935 та OM-1 встановлено, що незалежно від штаму продуценту оптимальним джерелом вуглецю є суміш фруктози (20 г/л), глюкози (20 г/л) та сахарози (20 г/л) [118]. В подальших дослідженнях впливу параметрів культивування встановлено, що оптимальні значення температури (25 °C), рН (5,7) та кількості внесеного посівного матеріалу (5 %, об'ємна частка) є однаковими для трьох продуцентів. У той же час штам LOCK 0943 під час культивування потребує проведення додаткової аерації шляхом перемішування [119].

Нао зі співавт. [61] у послідовних дослідженнях впливу складу поживного середовища та параметрів культивування морських бактерій *Pseudoalteromonas agarivorans* Нао 2018 встановили умови, що забезпечуються максимальний синтез

ЕПС (2,6-3,0 г/л). Варто зазначити, що отримане середовище культивування містило значну кількість 3,5 % морської солі, що очевидно зумовлено природнім місцем існування продуценту. У той же час у роботі [167] в ході дослідження синтезу ЕПС арктичним ізолятом *Polaribacter* sp. SM1127 визначено умови культивування, при яких є можливим заміна 3 % морської солі у середовищі культивування на значно меншу кількість NaCl (0,4 %) без зниження показників синтезу цільового продукту (6,27 г/л). При подальшій реалізації культивування з підживленням концентрацію ЕПС було додатково підвищено у 3 рази (до 19,25 г/л).

Про досягнення високих показників синтезу полісахариду в результаті оптимізації умов культивування також повідомляється у роботі [117]. Так, продемонстровано, що додавання 5,1 % сахарози та 14,7 % сульфату амонію при рості *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16 на картопляно-декстрозному бульйоні (містить 2,4 % декстрази) при рН 5 супроводжується синтезом 134,8 г/л полісахариду.

Узагальнені дані щодо факторів варіювання, досліджуваних під час встановлення оптимальних умов культивування, та показників синтезу полісахаридів за даних умов наведено в *табл. 1.1*.

Таблиця 1.1 – Узагальнена характеристика факторів варіювання та показників синтезу мікробних полісахаридів за оптимальних умов культивування

Продуцент	Субстрат для біосинтезу ЕПС, %	Фактори оптимізації*	Значення параметру після оптимізації	Концентрація ЕПС, г/л		Література
				до оптимізації	після оптимізації	
<i>Aspergillus</i> sp. DHE6	Глюкоза, 4	Концентрація глюкози Концентрація дріжджового екстракту рН Температура Швидкість перемішування Тривалість культивування	4 % 0,15 %  6,0 30 °С 150 об/хв  240 год	7,20	26,10	40
<i>Bacillus licheniformis</i> 24	Глюкоза, 20 (вихідна концентрація)	Внесення глюкози на 40 год культивування	н/п	2,2-2,6	12,61	129
<i>Bacillus licheniformis</i> 24	Фруктоза, 20 (вихідна концентрація)	Внесення фруктози на 28, 36, 54 год культивування	н/п	1,90-2,11	7,03	129
<i>Bacillus licheniformis</i> NS032	Бурякова м'яса, 12,5 (за вуглеводами) Сахароза, 7,5	Концентрація бурякової м'яси  Концентрація сахарози Концентрація фосфату	12,5 (за вуглеводами)  7,5 0,47	10,40-10,90	53,20	56

Продуцент	Субстрат для біосинтезу ЕПС, %	Фактори оптимізації*	Значення параметру після оптимізації	Концентрація ЕПС, г/л		Література
				до оптимізації	після оптимізації	
<i>Bacillus sp. ZBP4</i>	Буракова м'яса, 6 (за вуглеводами)	Концентрація бурякової м'яси Концентрація триптонув рН Температура	6 % 0,5 % 5,0 45 °С	0,14	1,07	42
<i>Bacillus velezensis</i> KY471306	М'яса, 12 (за вуглеводами)	Концентрація м'яси Концентрація дріжджового екстракту Температура	12 % 0,6 % 30 °С	4,10	7,90	104
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB12	Лактоза, 4,64	Концентрація дріжджового екстракту Температура Тривалість культивування	2 % 38,2 °С 41,6 год	0,10	0,16	7
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	Глюкоза, 2,2	Концентрація глюкози Концентрація глютамату натрію Концентрація дріжджового екстракту Концентрація MgSO <sub>4</sub>	2,2 % 1,4 % 0,6 % 0,06 %	13,50 (ЕПС) 4,60 (біо-емульгатор)	17,60 (ЕПС) 6,10 (біо-емульгатор)	33
<i>Enterococcus faecium</i> K1	Лактоза, 1,07	Концентрація лактози Концентрація цитрату амонію	1,07 % 0,25 %	0,36	0,72	20

Продуцент	Субстрат для біосинтезу ЕПС, %	Фактори оптимізації*	Значення параметру після оптимізації	Концентрація ЕПС, г/л		Література
				до оптимізації	після оптимізації	
		рН Тривалість культивування	5,4 94,05 год			
<i>Glutamicibacter halophytocola</i> KLBMP 5180	Мальтоза, 0,37	Концентрація мальтози Концентрація солодового екстракту Концентрація MnCl <sub>2</sub> рН Температура Швидкість обертів	0,37 % 0,99 % 0,14 % 7,5 28 °С 200 об/хв	0,74	2,89	190
<i>Klebsiella oxytoca</i> ICCF 419	Лактоза, 3	Концентрація лактози Концентрація кукурудзяного екстракту Співвідношення С/Н Концентрація КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> Концентрація лимонної кислоти	3 % 1,34 % 23,45 0,1 % 0,1 %	15,00	17,40-20,50	172
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5	Лактоза, 4,64	Концентрація дріжджового екстракту Температура Тривалість культивування	2 % 42 °С 12 год	0,13	0,35	7
<i>Lactobacillus</i>	Лактоза, 4,64	Концентрація	2 %	0,08	0,19	7

Продуцент	Субстрат для біосинтезу ЕПС, %	Фактори оптимізації*	Значення параметру після оптимізації	Концентрація ЕПС, г/л		Література
				до оптимізації	після оптимізації	
<i>acidophilus</i> LA5 та <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB12		дріжджового екстракту Температура Тривалість культивування	42 °С 24 год			
<i>Lactobacillus brevis</i> E25	Сахароза, 1 Глюкоза, 2	рН Температура Тривалість культивування	6,5 35 °С 18 год	10,00	35,00	43
<i>Lactobacillus paracasei</i> M7	Глюкоза, 1	Концентрація глюкози рН Тривалість культивування	1 % 7,6 48 год	0,38	0,68	20
<i>Lactobacillus plantarum</i> Eb-2	Сахароза, 2	Концентрація сахарози Концентрація пептону рН 5,5 Температура Тривалість культивування	2 % 1 % 5,5 37 °С 48 год	0,25	0,91	41
<i>Lactobacillus plantarum</i> SP8	Глюкоза, 2,2	Концентрація глюкози Концентрація дріжджового екстракту Температура Тривалість	2,2 % 3 % 35,6 °С 22 год	0,09	0,28	196

Продуцент	Субстрат для біосинтезу ЕПС, %	Фактори оптимізації*	Значення параметру після оптимізації	Концентрація ЕПС, г/л		Література
				до оптимізації	після оптимізації	
		культивування				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0935	Фруктоза, 2 Глюкоза, 2 Сахароза, 2	Концентрація фруктози Концентрація глюкози Концентрація сахароза Концентрація дріжджового екстракту Інокулят рН Температура Тривалість культивування	2 % 2 % 2 % 0,4 % 5 % 5,7 25 °С 24 год	0,10	0,90	118, 119
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LOCK 0943	Фруктоза, 2 Глюкоза, 2 Сахароза, 2	Концентрація фруктози Концентрація глюкози Концентрація сахароза Інокулят рН Температура Тривалість культивування Швидкість перемішування	2 % 2 % 2 % 5 % 5,7 25 °С 30 год 80 об/хв	0,09	1,14	118, 119
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> МТСС	Глюкоза, 1	Концентрація глюкози Концентрація цитрату	1 % 0,3 %	1,10-1,30	10,70	21

Продуцент	Субстрат для біосинтезу ЕПС, %	Фактори оптимізації*	Значення параметру після оптимізації	Концентрація ЕПС, г/л		Література
				до оптимізації	після оптимізації	
5462		амонію Кількість інокуляту рН Температура Тривалість культивування	3 % 7,0 37 °С 72 год			
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> OM-1	Фруктоза, 2 Глюкоза, 2 Сахароза, 2	Концентрація фруктози Концентрація глюкози Концентрація сахароза Кількість інокуляту рН Температура Тривалість культивування	2 % 2 % 2 % 5 % 5,7 25 °С 24 год	0,13	0,99	118, 119
<i>Lactobacillus</i> sp.	Глюкоза, 1,5	Концентрація глюкози Концентрація цитрату амонію Концентрація NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Концентрація KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Концентрація MgSO <sub>4</sub>	1,5 % 0,15 % 0,3 % 0,25 % 0,025 %	10,00	60,00	170
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> JF17	Сахароза, 18	Концентрація сахарози рН Температура	18 % 7,3 20 °С	9,80-10,60	50,56	45

Продуцент	Субстрат для біосинтезу ЕПС, %	Фактори оптимізації*	Значення параметру після оптимізації	Концентрація ЕПС, г/л		Література
				до оптимізації	після оптимізації	
<i>Lipomyces starkeyi</i> VIT-MN03	Сахароза, 2	Концентрація сахарози Концентрація NaCl рН Температура культивування Тривалість культивування	2 % 3 % 4 25 °C 720 год	0,82	4,86	134
<i>Micrococcus roseus</i>	Сахароза, 4,5	Концентрація сахарози Концентрація (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Температура Тривалість культивування	4,5 % 0,02 % 25 °C 96 год	1,80	8,00	65
<i>Polaribacter</i> sp. SM1127	Сахароза, 3,65 (вихідна концентрація)	Внесення сахарози на 72, 96, 120 год культивування Концентрація пептону Концентрація дріжджового екстракту Концентрація NaCl Кількість інокуляту рН Температура Тривалість	3,65 % 0,94 % 0,5 % 0,4 % 2 % 7,5 11,25 °C 144 год	2,11	19,25	167

Продуцент	Субстрат для біосинтезу ЕПС, %	Фактори оптимізації*	Значення параметру після оптимізації	Концентрація ЕПС, г/л		Література
				до оптимізації	після оптимізації	
		культивування				
<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i> Нао 2018	Глюкоза, 3	Концентрація глюкози Концентрація дріжджового екстракту Концентрація морської солі Кількість інокуляту Температура Швидкість перемішування Тривалість культивування	3 % 0,45 % 3,5 % 8,79 % 25 °С 171 об/хв 33,78 год	0,55-1,10	2,60-3,00	61
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> sp. GUMS16	Сахароза, 5,1 Глюкоза, 2,4	Концентрація сахарози Концентрація (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> рН	5,1 % 14,7 % 5	68,40-81,30	134,80	117
<i>Streptomyces griseorubens</i> GD5	Галактоза, 0,75	Концентрація галактози Концентрація дріжджового екстракту Концентрація NaCl Концентрація суміші мікро- та макроелементів	0,75 % 0,25 % 0,2 % 10 мл/л	4,65	9,50	178
<i>Weissella confusa</i>	Сік цукрової тростини, 5	Концентрація соку цукрової тростини	5 %	13,00	33,50	164

Продуцент	Субстрат для біосинтезу ЕПС, %	Фактори оптимізації*	Значення параметру після оптимізації	Концентрація ЕПС, г/л		Література
				до оптимізації	після оптимізації	
		Концентрація чорної чечевиці (ураду) Концентрація MgCl <sub>2</sub> Концентрація MgSO <sub>4</sub> Концентрація K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 % 0,25 % 0,25 % 2,5 %			
<i>Weissella confusa</i> XG-3	Сахароза, 8	Концентрація сахарози Концентрація ацетату натрію рН	8 % 0,37 % 5,8	33,60	97,50	198
<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951	Гліцерол, 1,6	Концентрація гліцеролу Концентрація пептону Концентрація NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,6 % 0,02 % 0,07 %	7,98	11,25	145

**Примітки.** \* – наведено фактори, параметри яких було оптимізовано під час встановлення оптимальних умов культивування. н/п – не передбачено.

## **1.2. Вдосконалення штамів-продуцентів методами метаболічної та генетичної інженерії**

Одним з визначальних факторів, що безпосередньо впливає на синтез мікробних полісахаридів є генетична «природа» продуцента. Вона являється фундаментальною основою, яка визначає наявність або навпаки відсутність певних метаболічних шляхів, зокрема біосинтезу цільового продукту, що загалом являє унікальну характеристику певного ЕПС-синтезуючого штаму [155, 169]. Зважаючи на це вплив на рівні генів являється потужним інструментом для інтенсифікації синтезу та модифікації властивостей ЕПС.

### **1.2.1. Основні підходи до регулювання метаболізму продуцентів мікробних полісахаридів**

Біосинтез мікробних полісахаридів є складним, комплексним процесом, який розпочинається з поглинання субстрату, його перетворення у центральних метаболічних шляхах, та закінчується безпосереднім синтезом та екскрецією полісахаридів [37, 50, 137]. Для успішного проходження даних перетворень необхідним є функціонування різноманітних ферментів, які кодуються відповідними генами. Пов'язані з синтезом ЕПС гени можна розділити на три основні групи [13, 141, 152, 153, 155]:

1) гени, що приймають участь у активації та послідовному перетворенні субстратів на нуклеозиддифосфатпохідні вуглеводів, які являються вихідними сполуками для біосинтезу ЕПС, та утворені інших складових частин полісахаридів;

2) гени, що кодують глікозилтрансферази, які здійснюють перенесення активованих нуклеозиддифосфатпохідних вуглеводів до зростаючого полісахаридного ланцюга;

3) гени, залучені у полімеризації та експорту полісахаридів.

Переважає більшість генів, які відповідають за безпосередній синтез ЕПС та його обробку зазвичай організовані та кластеризовані в хромосомі продуцента або на великих плазмідах подібним чином [141, 155]. Варто зазначити, що

наявність характерного скупчення генів, пов'язаних з синтезом ЕПС, значно полегшує відкриття нових ЕПС-синтезувальних штамів та відповідних полісахаридних оперонів, навіть при визначенні лише драфту геномних послідовностей [155, 191]. У той же час незважаючи на те, що численні оперони та шляхи синтезу мікробних полісахаридів відомі вже впродовж десятиліть, функції більшості цих генів, а також певні особливості молекулярних та регуляторних механізмів біосинтезу ЕПС залишаються досі повністю нез'ясованими [9, 19, 141, 154]. Окрім цього рівень залучення певних генів та їх внесок у біосинтез даних полімерів може значною мірою відрізнятися у різних ЕПС-синтезувальних штамів, що зумовлює необхідність розробки індивідуальних підходів до модифікації продуцентів полісахаридів та їх метаболічних шляхів.

Вирішення даних проблем передбачає застосування підходів метаболічної інженерії для проведення аналізу метаболічних шляхів продуцента, визначення потенційних лімітувальних реакцій («вузьких» місць) та їх впливу на синтез цільового продукту, з наступним використанням інструментарію генетичної інженерії для усунення даних обмежень [116, 169]. При цьому доцільним є проведення послаблення або повного усунення небажаних побічних реакцій чи конкуруючих метаболічних шляхів, що сприяє додатковому надходженню вуглецю та енергії та загальному спрямовуванню енергетичного метаболізму на синтез ЕПС [152, 169], а також усунення інгібування кінцевим продуктом (ретроінгібування) [148].

Модифікацію різних аспектів метаболізму можна здійснювати за рахунок впливу на рівні білка та внутрішньої регуляції ферментативної активності, яка в більшості випадків досягається завдяки рекомбінантній експресії відповідних генів у мікробних клітинах [116, 180].

Для кожного ЕПС-синтезувального штаму існує велика кількість можливих підходів для регулювання його метаболізму, проте зазвичай відсутнє всебічне розуміння того, які елементи підвищують або знижують ефективність цільових метаболічних шляхів. У той же час велика кількість метаболічних взаємодій

мають нелінійний характер, що може призводити до непередбачуваних наслідків при налаштуванні якогось певного елементу метаболізму та зумовлює необхідність використання комплексного підходу до їх оптимізації. При цьому також не варто забувати про важливість встановлення для кожного продуцента індивідуальних оптимальних умов культивування (див. *Підрозділ 1.1.*) [16, 51].

### **1.2.2. Використання генетичної інженерії для інтенсифікації синтезу полісахаридів**

Біосинтез полісахаридів є енерговитратним процесом, який потребує безперервного надходження значної кількості вуглецю, що призводить до конкурування з основними шляхами конструктивного метаболізму за доступні джерела вуглецю та енергії [13, 141, 152, 153, 155]. Таким чином, однією зі стратегій підвищення показників синтезу ЕПС являється збільшення вуглецевого пулу до клітин продуцента або його перерозподілу серед різних метаболічних шляхів.

**Спрямування центрального метаболізму на біосинтез цільового продукту за рахунок усунення конкуруючих метаболічних шляхів.** У роботі [177] з метою підвищення синтезу ЕПС у ціанобактерій *Synechocystis* sp. PCC 6803 було порушено функціонування гену *glgC*, який кодує синтез глюкозо-1-фосфатаденілтрансферази, що бере участь у синтезі глікогену, а також забезпечено надмірну експресію *gpi* (кодує глюкозо-6-фосфат ізомеразу). Даний підхід сприяв направленню потоків вуглецю на синтез вуглеводних мономерів, які входять до складу ЕПС. Отриманий рекомбінантний штам  $\Delta gpi$ - $\Delta glgC$  синтезував 1,3 г/л ЕПС, який характеризувався підвищеним вмістом глюкози, галактози, ксилози, манози, рамнози, фукози та уроновних кислот, порівняно з диким штамом.

Інші дослідники [59] використовували комплексний підхід для інтенсифікації синтезу коланової кислоти бактеріями *Escherichia coli* JM109(DE3). Спершу завдяки видаленню гену *waaF*, який відіграє ключову роль в синтезі ліпополісахариду, було підвищено кількість дефектів мембрани та створено

стресові умови для бактерій, які зумовили підвищення синтезу коланової кислоти майже в 6 разів. Додатково було проведено підбір умов культивування отриманого рекомбінантного штаму. Так, за оптимальних умов штам ΔwaaF синтезував 1,9 г/л ЕПС, що було максимально наближено до теоретично розрахованого рівня (2,1 г/л) та перевищували показники синтезу полісахариду диким штамом у 12 разів.

У роботі [82] повідомляється про проведення досліджень механізмів регуляції біосинтезу ЕПС та встановлення можливості підвищення показників його синтезу за рахунок кофакторної інженерії. Для цього проводили клонування генів НАДН оксидази *Streptococcus mutans* у *Lactobacillus casei* LC2W під контролем конститутивного промотора P<sub>23</sub>. Рекомбінантний штам LC-*nox* проявляв майже у 20 разів вищу активність ферменту порівняно з диким штамом, що супроводжувалось зниження показників росту та утворення лактату. Загалом це сприяло додатковому направленню вуглецю на синтез ЕПС, показники якого досягли 0,2 г/л, що було на 46 % вище порівняно з диким штамом. Інші дослідники [81] продемонстрували, що надмірна експресія саме генів *nox* має найвищий вплив на синтез ЕПС у штаму LC2W порівняно з іншими досліджуваними генами *pfk*, *rfbB*, *galT*.

Ще одним прикладом підвищення показників синтезу цільового продукту за рахунок усунення конкуруючих метаболічних шляхів є робота [187], у якій досліджувався одночасний синтез полісахариду полі-3-гідроксибутирату та санксану бактеріями *Sphingomonas sanxanigenens* NX02. Незважаючи на те, що місце накопичення полімерів є різним (всередині та ззовні клітини відповідно) вони мали однакові оптимальні умови культивування. Експерименти показали, що повне видалення гену *phbB*, який кодує ацетоацетил-КоА редуктазу – один з ключових ферментів синтезу полі-3-гідроксибутирату, призводив також до значного зниження показників синтезу ЕПС штамом NX02-dPHB. На наступному етапі отриманий штам було піддано плазмовому мутагенезу, в результаті якого концентрація санксану підвищилась до 21,2 г/л, що було у рази 1,4 рази вищим за

показники синтезу вихідного штаму (14,9 г/л). Варто зазначити, що мутантний штам NXdP також характеризувався триразовим зменшенням рівню біомаси (3,1 г/л). Не зі співавт. [64] в результаті опромінення дикого штаму *Bacillus subtilis* NJ509 іонами азоту, отримали мутантний штам NJ308, здатний синтезувати у 5,4 рази більше ЕПС (3,41 г/л) при рості на крохмалі порівняно з вихідним продуцентом. Подальші дослідження показали, що в результаті мутагенезу було порушено експресію генів, які кодують ключові ферменти біосинтезу полісахариду.

Розповсюдженням вузьким місцем при біосинтезі ЕПС являється недостатній рівень відповідних нуклеозиддифосфатсахаридів [152, 169, 180]. Особливо актуальним це являється у грамнегативних бактерій, де дані попередники використовуються для синтезу полісахаридів клітинної стінки, зокрема О-антигену ліпополісахариду та глюканів S-шару. Таким чином, ще одна стратегія інтенсифікації біосинтезу ЕПС полягає у забезпеченні підвищеного і/або сталого рівня нуклеозиддифосфатпохідних.

Бактерії *Aureobasidium pullulans* паралельно з пулуланом здатний синтезувати ще один практично цінний полісахарид –  $\beta$ -глюкан. Обидва практично цінні полімери мають однаковий прекурсор, а саме, уридиніндифосфат. У результаті *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації отримано штам *Aureobasidium pullulans* CGMCC 19650, здатний синтезувати на 78,6 % більше  $\beta$ -глюкану ніж вихідний штам CCTCC M 2012259 [24]. При трансформції трансферну ДНК було вбудовано в кодуючий регіон гену *mal31*, відповідального за кодування задіяного в синтезі пулулану вуглеводного транспортеру, що призвело до підвищення рівня транскрипції генів *pgm2*, *ugp*, *fks1* та *kre6*; кількості ключових ферментів, пов'язаних з біосинтезом УДФГ і  $\beta$ -глюкану, та внутрішньоклітинного вмісту УДФГ. У той же час спостерігалось зниження рівню транскрипції генів *ags2*, які кодують  $\alpha$ -глюкансинтазу – ключовий фермент синтезу пулулану. Загалом порушення функціонування гену *mal31* призвело до зниження концентрації пулулану на 41,7 %.

Яскравим прикладом направлення метаболічних шляхів на синтез цільового продукту є робота [25], у якій на основі метаболічної моделі в масштабі геному *iCW773* було визначено цільові гени та проведено відповідні генетичні маніпуляції, спрямовані на інтенсифікацію синтезу гіалуронової кислоти у *Corynebacterium glutamicum*. Загалом в результаті проведених досліджень було:

- 1) підвищено експресію гену *hasB*, кодуєчого УДФ-глюкозо-6-дегідрогеназу, яка каталізує перетворення УДФ-глюкози на попередник гіалуронової кислоти – УДФ-глюкуронову кислоту;
- 2) знижено метаболічну активність гліколізу за рахунок asRNA-опосередкованого послаблення гену *fba*, який кодує фруктозо-1,6-дифосфат альдолазу;
- 3) зменшено метаболічну активність пентоз фосфатного шляху завдяки делеції гену *zwf*, який кодує глюкозо-6-фосфат 1-дегідрогеназу;
- 4) знижено активність піруватдегідрогенази в результаті комплексного asRNA-опосередковане послаблення гену *aceE* та мутації ініціюючого кодону);
- 5) заблоковано шляхи синтезу лактату та ацетату завдяки видаленню ключових генів відповідних метаболічних шляхів (*ldh*, *ackA-pta*, *cat* та *poxB*). Загалом такий комплексний підхід сприяв максимальному спрямуванню пулу вуглецю на синтезу цільового продукту. При реалізації культивування з підживленням отриманий рекомбінантний штам накопичував 28,7 г/л гіалуронової кислоти, що було у 22 рази вищим за вихідні показники синтезу дикого штаму.

Інші дослідники [184] в результаті комплексного ряду рекомбінацій (делеція репресорів галактозного оперону *galR* та *galS*, підвищення активності кластеру генів *galU-ugd* біосинтезу гіалуронової кислоти, зниження рівня споживання глюкози за рахунок видалення генів *pfkA* та *zwf*) отримали рекомбінантний штам *Escherichia coli*, здатний синтезувати гіалуронову кислоту (0,03 г/л) на середовищі з сумішшю глюкози та галактози. Варто зазначити, що дана робота являється однією з перших, в якій повідомляється про можливість синтезу гіалуронової кислоти з галактози.

**Підвищення рівня експресії ключових генів біосинтезу полісахаридів.** Gu зі співавт. [57] досліджували шляхи підвищення експресії гену *sacB*, що кодує

левансуказу та її секрецію у штаму *Bacillus amyloliquefaciens* NK-ΔLP. Серед усіх досліджених варіантів рекомбінантів штаму ΔLP-Y, у якому використано гетерологічний промотор Pgrac та сигнальний пептид uncM, характеризувався найвищими показниками синтезу полісахариду. Так, при культивуванні з підживленням на середовищі з сахарозою (200 г/л) штаму ΔLP-Y накопичував 102 г/л ЕПС впродовж 48 год культивування, що було в понад 7 разів вищим порівняно з показниками отриманими, при культивуванні вихідного штаму. Варто зазначити, що в даній роботі синтез левану є максимально наближеним до найвищого повідомленого синтезу левану штамом *Bacillus subtilis* (natto) CCT7712 (112 г/л) [121].

Інші дослідники [68] вивчали вплив підвищення експресії гену *pgmG*, який кодує синтез біфункціонального білку з фосфоглюкомутазною та фосфоманомутазною активністю, на синтез полісахариду сфінгану бактеріями *Sphingomonas sanxanigenens*. Експерименти показали, що рекомбінантний штаму з плазмідною рММВ66(ЕН)-*pgmG* здатен накопичувати на 17 % більше ЕПС (12,6 г/л) в порівнянні з диким штамом. Аналогічний підхід було продемонстровано у роботі [73]. Так, мутантний штаму *Sinorhizobium meliloti*, в якому за рахунок введення плазмиди *pstb-LAFR5-exoY* підвищено експресію гену *exoY*, характеризувався здатністю накопичувати в 2,3-2,5 рази більше полісахариду ніж нативні бактерії. Ген *exoY* кодує фермент фосфотрансферазу ундекапреніл-фосфат галактози, який каталізує приєднання галактози до ліпідного переносника та приймає участь в початкових етапах синтезу сукциноглюкану.

У роботі [171] встановлено, що надмірна експресія генів центрального метаболізму *galE*, *galT* та *galK*, кодуєчих УДФ-глюкозо-4-епімеразу, галактозо-фосфатаза уридил трансферази та галактокінази відповідно, у рекомбінантного штаму *Streptococcus thermophilus* ТМВ 6013 супроводжувалася підвищенням виходу ЕПС від субстрату 3,3 рази (до 0,5 г ЕПС/ г лактози) порівняно з диким штамом LY03.

Однією з проблем синтезу пулулану *Aureobasidium* spp. при рості на середовищах з високим вмістом глюкози являється катаболічна репресія. Для зменшення впливу даного явища Wang зі співавт. [182] провели у штаму *Aureobasidium melanogenum* P16 делецію гену, який кодує катаболічний вуглецевий репресор CreA та відіграє ключову роль у механізмі репресії глюкозою. Отриманий штам DG41, з порушеним функціонуванням гену *CREA*, характеризувався підвищеним транскрипційним рівнем генів, кодуючих глікозилтрансферазу, трьох генів транспортерів глюкози, глюкозо-6-фосфат кінази,  $\alpha$ -амілази, глюкоамілази та пулулани. У той же час значною мірою було знижено рівень генів CreA та двох транспортерів глюкози. У процесі культивування на середовищі з високим вмістом глюкози (120 г/л) отриманий штам DG41 накопичував майже 65 г/л пулулану, що було в 1,25 рази вищим порівняно з показниками дикого штаму P16.

Варто зазначити, що в деяких випадках надмірна експресія генів, пов'язаних з біосинтезом полісахаридів не завжди має однозначний позитивний ефект. Штам *Bacillus licheniformis* CGMCC 2876 здатен одночасно синтезувати полісахарид та полі- $\gamma$ -глюматінової кислоти, яким притаманні високі флокулювальні властивості [89]. Експерименти показали, що надмірна експресія гену *epsB*, відповідального за негативну регуляцію синтезу полісахариду, призводила до підвищення виходу біофлокулянту та його флокулювальної активності на 36,6 % (до 10,26 г/л) та 224 % (до 9612 Од/мл) відповідно. При цьому було відмічено зниження вмісту вуглеводної складової біофлокулянту майже на 25 % і підвищення вмісту полі- $\gamma$ -глюматінової кислоти на 10 %. У той же час одночасне підвищення рівня експресії ключових генів біосинтезу ЕПС у бактерій роду *Bacillus* (ген фосфоглюкомутази (*pgcA*) та пірофосфорилази УДФ-глюкози (*gtaB1*), призводило до підвищення синтезу біофлокулянту лише на 21 %. Варто зазначити, що в даних дослідженнях бактерії вирощували на середовищі з глюкозою, на якому, на відміну від росту на цитраті натрію та гліцерину, переважно синтезуються ЕПС.

**Оптимізація процесу культивування.** Окремо варто виділити модифікацію продуцентів, яка має на меті оптимізацію біотехнологічного процесу. У роботі [90] продемонстровано можливість оптимізації біосинтезу велану штамом *Sphingomonas* sp. за рахунок гетерологічної експресії гену гемоглобіну (*vgb*) бактерій *Vitreoscilla*. Використання даного підходу дало змогу мінімізувати лімітування кисню, яке має місце при підвищенні в'язкості культуральної рідини при накопиченні ЕПС, та підвищити показників синтезу велану з 25,3 г/л до 34,6 г/л без суттєвої зміни реологічних властивостей полімеру. Автори припускають, що позитивний ефект даного підходу зумовлений покращенням респірації та постачання АТФ.

Інші дослідники [168] в результаті електротрансформації *Enterobacter cloacae* JD з генетичним матеріалом, виділеним з термофільного штаму *Geobacillus* sp. GW3, отримали трансформант GW3-3.0, який здатен синтезувати 8,83 г/л ЕПС на середовищі з мелясою при температурі 54 °С. У той же час при підвищенні температури до 59 °С синтез полісахариду майже повністю припинявся. Дані властивості отриманого трансформанту роблять перспективним його використання у контрольованій інтенсифікації вторинного видобутку нафти.

Варто зазначити, що термофільні та інші екстремофільні організми, зокрема психро- та галофіли, можуть бути не тільки джерелом генів підвищеної стійкості до подразнюючих факторів навколишнього середовища, але й виступати перспективною біологічною моделлю для створення нових промислово важливих продуцентів ЕПС [180]. Незважаючи на те, що полісахаридам екстремофілів можуть бути притаманні унікальні властивості, внаслідок низької ЕПС-синтезувальної здатності, їхнє комерційне впровадження є дуже обмеженим [132].

Зазначимо, що в переважній більшості з наведених вище робіт рекомбінантні штами продуцентів отримано з використанням відповідних плазмід.

Оскільки плазмідні та інші мобільні генетичні елементи можуть бути легко сконструйовані, перенесені та експресовані в організмі-господаря, вони являються

зручним інструментом для проведення тестувань та досліджень [116]. У той же час існує ряд недоліків при використанні даного підходу для налагодження біотехнологічного виробництва. Так, наявність плазмід вимагає проведення безперервного відбору рекомбінантів, який зазвичай реалізовано за допомогою включення генів стійкості до певних. При промисловому виробництві це являється додатковим фактором витрат, а забруднення продукту антибіотиками залишається невід'ємним ризиком, що викликає занепокоєння з екологічної точки зору. Окрім цього, генетична нестабільність може призвести до видалення, перестановки плазмиди або зниження кількості копій, що може призвести до втрати продуктивності.

### **1.2.3. Модифікація функціональних характеристик мікробних полісахаридів**

Окрім інтенсифікації синтезу ЕПС завдяки методам генетичної інженерії можливим є проведення модифікація їхньої структури та властивостей [62].

Ще в 1990 р. продемонстровано, що модифікований тетрамер ксантану, з якого завдяки інактивації гену, кодуєчого глюкозилтрансферазу, видалено термінальну манозу мав нижчу в'язкість порівняно з вихідним штамом [62]. Нещодавно з'явилася робота [186], в якій окрім впливу термінальної манози додатково досліджувався вплив наявності залишків ацетату та пірувату на реологічні характеристики ксантану *Xanthomonas campestris* CGMCC 15155. З цією метою було сконструйовано 8 рекомбінантних штамів, в яких було здійснено делецію або навпаки надмірно експресовано гени *gumF*, *gumG*, *gumL* та *gumI*. Аналогічно наведеним вище дослідженням полісахарид з відсутньою термінальною манозою мав низьку в'язкість при нульовій швидкості зсуву. У той же час встановлено, що наявність залишків ацетату на відміну від пірувату сприяла стабілізації подвійної спіралі полімеру, а полісахарид, з якого додатково було вилучено глюкуронову кислоту мав підвищену в'язкість. Відомим також є можливість регулювання молекулярної маси ксантану завдяки комбінованому підвищенню активності генів *gumB* та *gumC* [53].

Інші автори [35] продемонстрували можливість збільшення молекулярної маси альгінату *Azotobacter vinelandii* за рахунок підвищення експресії гену *alg8*, який кодує синтез каталітичної субодиниці альгінат-полімеразного комплексу. У той же час в експериментах з рекомбінантним штамом *Pseudomonas aeruginosa* PDO300  $\Delta$ alg8, нездатними до синтезу ЕПС, продемонстровано, що ген *alg8* являється вузьким місцем біосинтезу альгінату, а його введення призводить до підвищення кількості синтезованого альгінату в 15 разів порівняно з нативним штамом PDO300 [142].

Варто зазначити, що за допомогою використання методів генетичної інженерії також можливо конструювати продуцентів з повним циклом синтезу не властивих їм практично цінних біополімерів [19, 185]. Так, Gu зі співавт. [15] сконструювали рекомбінантний штам *Escherichia coli* MG1655 $\Delta$ cysH(DE3) pETM6-PCAFSw, здатний синтезувати приблизно 27 мкг/ г біомаси низькомолекулярний хондроїтин сульфат з високим рівнем сульфатування (96 %). Для цього: 1) використовуючи плазмиду pETM6-Sw було забезпечено синтез сульфотрансферази; 2) порушено синтез фруктозильованого хондроїтину, який входить до складу капсульного полісахарид продуцента; 3) завдяки репресії гену *cysH*, відповідального за відновлення 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфате до неорганічного сульфіту забезпечено достатній внутрішньоклітинний пул донору сульфату.

У роботі [183] продемонстровано можливість гетерологічної експресії генів *Pasteurella multocida*, що кодують гепарозан синтазу (PmHS2), в бактеріях *Bacillus megaterium*. В результаті культивування з підживленням на середовищі з ксилозою рекомбінантний штам накопичував до 2,74 г/л гепарозану. Stingele зі співавт. [166] досліджували особливості гетерологічної експресії кластеру генів *Streptococcus thermophilus* Sf16, які кодують синтез ЕПС, в молочнокислих бактеріях *Lactococcus lactis* MG1363, нездатних до синтезу полісахариду. Встановлено, що отриманий рекомбінантний штам внаслідок низької активності УДФ-*N*-ацетоглюкозамін С4-епімеразної активності характеризувався здатністю

до синтезу полісахариду, в якому на відміну від батьківського штаму N-ацетилгалактозамін був замінений на галактозу.

Узагальнені дані щодо синтезу ЕПС рекомбінантними продуцентами, отриманими в результаті застосування методів генетичної інженерії, та модифікації властивостей даних практично цінних метаболітів наведено в *табл. 1.2.*

Таблиця 1.2 – Використання генетичної інженерії для інтенсифікації синтезу ЕПС або модифікації їхніх властивостей

Вихідний штам продуцента	Використаний підхід до генетичної модифікації продуцента	Вплив на показники синтезу ЕПС або його властивості	Література
<i>Aureobasidium melanogenum</i> P16	Делеція гену <i>CREA</i>	Підвищення показників синтезу пулулану у 1,25 рази (до 65,00 г/л)	182
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Підвищення експресії генів <i>pgm2</i> , <i>ugp</i> , <i>fks1</i> та <i>kre6</i>	Підвищення показників синтезу $\beta$ -глюкану у 5,4 рази (до 3,41 г/л)	24
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Підвищення експресії гену <i>alg8</i>	Регуляція молекулярної маси альгінату	35
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NK- $\Delta$ LP	Підвищення експресії гену <i>sacB</i>	Підвищення показників синтезу ЕПС у 7 разів (до 102,00 г/л)	57
<i>Bacillus licheniformis</i> CGMCC 2876	Підвищення експресії генів <i>epsB</i>	Підвищення показників синтезу біофлокулянту на 36,6 % (до 10,26 г/л) Підвищення флокулювальної активності на 224 % (до 9612 Од/мл)	89
<i>Bacillus megaterium</i>	Експресія генів, які кодують гепарозан синтазу (PmHS2)	Встановлено принципову можливість синтезу гепарозану (2,74 г/л)	183
<i>Bacillus subtilis</i> NJ509	Опромінення іонами азоту	Підвищення показників синтезу ЕПС у 5,4 рази (до 3,41 г/л)	64
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Підвищення експресії гену <i>hasB</i> Послаблення експресії генів <i>fba</i> та <i>aceE</i> Делеція генів <i>zwf</i> , <i>ldh</i> , <i>ackA-pta</i> , <i>cat</i> та <i>roxB</i>	Підвищення показників синтезу гіалуронової кислоти у 22 рази (до 28,70 г/л)	25

Вихідний штам продуцента	Використаний підхід до генетичної модифікації продуцента	Вплив на показники синтезу ЕПС або його властивості	Література
<i>Enterobacter cloacae</i> JD	Електротрансформація з генетичним матеріалом <i>Geobacillus</i> sp. GW3	Встановлено здатність синтезувати ЕПС при температурі 54 °С (8,83 г/л)	168
<i>Escherichia coli</i>	Делеція генів <i>galR</i> , <i>galS</i> та <i>pfkA</i> та <i>zwf</i> Підвищення експресії генів <i>galU-ugd</i>	Встановлено принципову можливість синтезу гіалуронової кислоти при рості продуцента на галактозі (0,03 г/л)	184
<i>Escherichia coli</i>	Забезпечено експресію генів, які кодують сульфотрансферазу Делеція генів, які кодують фруктозилтрансферазу Репресія гену <i>cysH</i>	Встановлено принципову можливість синтезу низькомолекулярного хондроїтин сульфату з високим рівнем сульфатування (ЕПС-синтезувальна здатність 27 мкг/ г біомаси)	15
<i>Escherichia coli</i> JM109(DE3)	Делеція гену <i>waaF</i>	Підвищення показників синтезу коланової кислоти у 12 разів (до 1,90 г/л)	59
<i>Lactobacillus casei</i> LC2W	Підвищення експресії гену <i>nox</i>	Підвищення показників синтезу ЕПС на 46 % (до 0,20 г/л)	82
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	Експресія кластеру ЕПС генів <i>Streptococcus thermophilus</i> Sfi6	Синтез ЕПС, який на відміну від батьківського штаму мав у своєму складі галактозу замість N-ацетилгалактозаміну	166
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Підвищення експресії гену <i>exoY</i>	Підвищення показників синтезу ЕПС у 2,3-2,5 рази	73
<i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	Підвищення експресії гену <i>pgmG</i>	Підвищення показників синтезу ЕПС на 17 % (до 12,60 г/л)	68
<i>Sphingomonas</i>	Делеція гену <i>phbB</i>	Підвищення показників синтезу ЕПС у 1,4 рази	187

Вихідний штам продуцента	Використаний підхід до генетичної модифікації продуцента	Вплив на показники синтезу ЕПС або його властивості	Література
<i>sanxanigenens</i> NX02	Плазмовий мутагенез	(до 21,20 г/л)	
<i>Sphingomonas</i> sp.	Експресія гену гемоглобіну <i>vgb</i>	Підвищення показників синтезу пулулану у 1,4 рази (до 34,60 г/л) Мінімізація лімітування за киснем при глибинному культивуванні	90
<i>Streptococcus thermophilus</i> TMB 6013	Підвищення експресії генів <i>galE</i> , <i>galT</i> та <i>galK</i>	Підвищення виходу ЕПС від субстрату у 3,3 рази (до 0,50 г ЕПС/ г лактози)	171
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Порушення експресії гену <i>glgC</i> Підвищення експресії гену <i>gpi</i>	Підвищення показників синтезу ЕПС у 7,4 рази (до 1,30 г/л)	177
<i>Xanthomonas campestris</i>	Підвищення експресії генів <i>gumB</i> та <i>gumC</i>	Регуляція молекулярної маси ксантану	53
<i>Xanthomonas campestris</i> CGMCC 15155	Підвищення експресії або делеція генів <i>gumF</i> , <i>gumG</i> , <i>gumL</i> та <i>gumI</i>	Досліджено вплив наявності термінальної манози, залишків ацетату та пірувату на реологічні характеристики ксантану	186

### **1.3. Використання нетрадиційних субстратів для біосинтезу полісахаридів**

Можливість ефективного промислового впровадження нових мікробних полісахаридів та підвищення конкурентоспроможності полімерів, вже представлених на світовому ринку, значною мірою залежить від їх вартості, яка головним чином складається з вартості поживного середовища, витрат на проведення культивування та виділення цільового продукту [16, 50, 158].

Внесок кожної складової в кінцеву вартість цільового продукту залежить від багатьох факторів і може значною мірою відрізнитися для різних ЕПС-синтезувальних штамів. У той же час, прийнято вважати, що витрати на поживне середовище, які головним чином визначаються вартістю джерел вуглецю та азоту, становлять в середньому 30-50 % від кінцевої собівартості мікробних полісахаридів [32, 86, 113]. Зважаючи на зазначене все більш актуальним становиться пошук та дослідження різноманітних альтернативних субстратів для їх біосинтезу. При цьому перевага надається використанню різноманітних, зазвичай харчових, відходів, значні обсяги накопичення яких призводять до проблем їх належної переробки [101].

Так, відходи, які не були піддані вторинній переробці зазвичай утилізуються шляхом захоронення на звалищах, спалювання, або просто неконтрольованого зливання або скидання у навколишнє середовище [44]. Варто зазначити, що переважна більшість таких відходів внаслідок значного вмісту біодеградабельних вуглеводів, білків та жирів мають велику біохімічну потребу кисню та хімічного споживання кисню [105]. З однієї сторони, це призводить до порушення належного функціонування екосистем, а з іншого робить можливим використання даних відходів в якості субстратів в біотехнологічних процесах [79].

#### **1.3.1. Класичні відходи цукрового виробництва**

Меляса та інші відходи цукрового виробництва завдяки значному вмісту вуглеводів, мікро- та макроелементів на сьогоднішній день можна вважати

класичними альтернативними субстратами, які використовують для проведення первинних досліджень з заміни рафінованої сировини на відпрацьовану.

Виробництво 1 т цукру супроводжується утворенням 0,38 тон меляси, а щорічне накопичення досягає 55 млн т [197]. Вміст сахарози та редуруючих цукрів в мелясі зазвичай перебуває в межах 40-60 % (масова частка), що робить можливим її використання в біотехнологічних процесах в якості дешевої альтернативи глюкозі та іншим рафінованим вуглеводам [126, 197].

Так, у роботі [175] досліджувалась можливість заміни сахарози в середовищі культивування *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126 на альтернативні дешеві джерела вуглецю та енергії. Встановлено, що при рості на мелясі з цукрової тростини (1,8 % за вуглеводами) та крохмалю (2 %) кількість синтезованого склероглюкану досягала 5,11 та 7,95 г/л відповідно, що лише незначною мірою відрізнялося від показників синтезу цільового продукту (6,87 г/л) на сахарозі (2 %). Автори припускають, що зниження концентрації полісахариду при рості на мелясі може бути зумовлено наявністю в її складі важких металів, які можуть певною мірою інгібувати активність ферментів, відповідальних за синтез ЕПС. З іншого боку наявність додаткового азоту в мелясі також могла призводити до порушення оптимального співвідношення C/N [126], хоча даний вплив в роботі не досліджувався. Інші автори повідомляють про здатність діазотрофних бактерій *Rhizobium haultense* SEMIA 6450, *Ensifer meliloti* SEMIA 135, *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 при рості на буряковій мелясі (1 % за вуглеводами) синтезувати 4,47, 4,12 та 3,76 г/л відповідно [120]. За аналогічної концентрації соєвої меляси в середовищі культивування гриби *Lasiodiplodia theobromae* MMPI накопичували 1,06 г/л полісахариду лазіодіплодану [1]. Інші дослідники [162] встановили здатність молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* BR2 при рості в середовищі, що містить 4 % (за вуглеводами) гідролізату крохмалю маніоки накопичувати 6,5 г/л полісахариду. Варто зазначити, що отримані показники синтезу ЕПС були у 1,48 рази вищими за показники (4,4 г/л) при рості на середовищі, яке містить 4 % лактози.

Мутантний штам *Bacillus licheniformis* М4, отриманий в результаті обробки етилметансульфатом, здатний синтезувати майже у 1,3 рази більшу кількість ЕПС (2,89 г/л) на середовищі з мелясою з цукрової тростини порівняно з диким штамом (2,26 г/л) [11]. Варто зазначити, що вміст вуглеводів у отриманому полісахариді був майже на 15 % вищим ніж у синтезованого нативним продуцентом. Подальша оптимізація умов культивування (рН, температури, кількості внесеного інокуляту, тривалості культивування) з використанням методу Бокса-Вілсона супроводжувалась додатковим підвищенням кінцевої концентрації цільового продукту у 3,15 рази (до 9 г/л) [11].

Ап зі співавт. [8] повідомили про можливість заміни в поживному середовищі для одержання пулулану штамом *Aureobasidium pullulans* 201253 сахарози на більш дешевий гідролізат картопляного крохмалю. Встановлено, що при культивуванні штаму 201253 на моносубстраті гідролізаті картопляного крохмалю максимальна концентрація ЕПС досягалася на 110 год культивування, а при використанні суміші ГКК (80 г/л) та сахарози (20 г/л) – за 60 год. При цьому концентрація пулулану становила 54,57 г/л і була практично такою самою, як і під час культивування на середовищі з моносубстратом сахарозою (100 г/л). Варто зазначити, що при рості продуцента на суміші гідролізату картопляного крохмалю та сахарозі у співвідношенні 80:20 питома швидкість споживання субстрату та утворення продукту становила 0,559 та 0,212 г/(л·год) відповідно, що було вищим ніж при використанні моносубстрату гідролізату картопляного крохмалю (0,450 та 0,146 г/(л·год) відповідно) або суміші гідролізату картопляного крохмалю, глюкози та фруктози (співвідношення 80:10:10) (0,52 та 0,166 г/(л·год)). У той же час всі досліджувані показники процесу культивування були найвищими при використанні моносубстрату сахарози.

Автори роботи припускають, що незначна кількість сахарози у суміші може стимулювати активність ферментів, відповідальних за синтез ЕПС і підсилювати ефективність конверсії гідролізату картопляного крохмалю [8]. Підтвердженням даного припущення може бути зниження показників синтезу цільового продукту

при заміні сахарози у суміші з гідролізатом картопляного крохмалю на рівні частини глюкози та фруктози.

Схожі закономірності було також виявлено Maalej зі співавт. [93] під час оптимізації синтезу полісахариду бактеріями *Pseudomonas stutzeri* AS22. Встановлено, що додавання незначних кількостей манози (1 г/л) при вирощуванні бактерій на крохмалі (50 г/л) супроводжувалось підвищенням концентрації цільового продукту на 32 % (до 10,2 г/л) порівняно з показниками, отриманими на моносубстраті крохмалі (7,7 г/л). У той же час накопичення біомаси та біосинтез ЕПС при рості штаму AS22 на моносубстратів манозі практично відсутній, хоча даний вуглевод входить до складу полісахариду. На нашу думку, це може бути пов'язано з явищем кометаболізму, тобто проведенням трансформації допоміжного субстрату спряженим з використанням ростового [88].

У роботах [136, 181] продемонстровано можливість одночасного зменшення вартості поживного середовища на 25-30 % та підвищення показників синтезу цільовго продукту завдяки заміні рафінованих субстратів на сік цукрової тростини. При використанні соку цукрової тростини (3-5 % за вуглеводами) кількість синтезованих ЕПС штамами *Kosakonia cowanii* TL-1 та *Leuconostoc mesenteroides* MTCC 7337 становила 15,61 та 14,6 г/л відповідно і була на 5-6 % вищою за показники, отримані на рафінованому субстраті.

### **1.3.2. Альтернативні джерела азоту у середовищах з відходами цукрового виробництва**

Меляса також може бути використана як основа для розробки технологій які передбачають комплексну заміну джерела вуглецю та азоту на альтернативну сировину. Так, при рості на мелясі (6,6 % за вуглеводами) бактерії *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246 синтезували лише 1,08 г/л [10]. У той же час додаткове внесення 1,2 % протеїнового гідролізату (вміст білку в гідролізаті становив 70,6 %), отриманого шляхом послідовної обробки овечої вовни 2,5 н КОН та 6 н  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , супроводжувалося додатковим підвищенням показників синтезу

полісахариду до 3,54 г/л, що було у 1,4 вищим ніж при використанні класичних органічних джерел азоту (триптонового та протеазного пептонів).

Доцільність використання альтернативних джерел азоту також продемонстровано у роботі [125]. Так, заміна в середовищі культивування триптон, бактопептону або дріжджового екстракту на гідролізат курячого пір'я (0,4 %) при рості штаму *Xanthomonas campestris* MO-03 на буряковій мелясі (4 % за вуглеводами) призводила до підвищення показників синтезу ксантану з 16,5-17,5 г/л до 20,5 г/л. Інші дослідники [176] продемонстрували, що пептон з курячого пір'я є не лише ефективним джерелом азоту, але й може успішно замінити мінеральні компоненти у складі поживного середовища. Так, бактерії *Bacillus subtilis* MTCC 441 при рості на середовищі, в якому джерело азоту (бактеріальний пептон або дріжджовий екстракт) та всі мінеральні солі ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  та  $\text{MnSO}_4$ ) було замінено на 0,2 % гідролізату курячого пір'я здатні накопичувати 25,83 г/л левану. Варто зазначити, що дані показники синтезу було лише на 15 % нижчим за результати, отримані під час культивування на базовому напівсинтетичному середовищі. Можливість такої заміни являється можливою внаслідок комплексного складу гідролізату курячого пір'я. Так, до його складу входить велика кількість різноманітних амінокислот, мікро- та макроелементів, а вміст загального білку становить приблизно 70 % [122].

Загалом використання альтернативних джерел азоту може мати істотний вплив на вартість поживного середовища. Так, наприклад, кукурудзяний екстракт має у 95,5 та 19,1 рази нижчу вартість ніж пептон та дріжджовий екстракт відповідно, та являється у 9,6 рази – ніж відносно дешевий соєвий шрот. За оптимальних умов культивування *Sphingomonas paucimobilis* ZJUT 1008 при рості на глюкозі (3,4 %) та використанні комбінованого органічного (1 % кукурудзяного екстракту) та мінерального (0,25 % сечовини) джерела азотного живлення синтезував 14,41 г/л гелану [69].

Інші автори [63] продемонстрували, що комплексна заміна глюкози на крохмаль маніюки, а дріжджового екстракту на кукурудзяний сироп або гідролізат

соєвого шроту, дозволяють не тільки вдвічі знизити вартість середовища культивування, але й забезпечити високі показники синтезу цільового продукту. Так, після проведення оптимізації умов культивування за допомогою методу Бокса-Вілсона та використання моделі на основі штучного інтелекту штам *Aureobasidium pullulans* ССТСС М 2012259 на середовищі з крохмалем маніоки (5,01-5,24 %) та кукурудзяним екстрактом (0,46 %) або гідролізатом соєвого шроту (0,98 %) накопичував 21,07-25,89 г/л пулулану. При цьому показники синтезу ЕПС на контрольному середовищі з глюкозою та дріжджовим екстрактом становили 22,26 г/л. Аналогічну кількість пулулану (25,19 г/л) було отримано при вирощуванні штаму *Aureobasidium pullulans* LB83 на середовищі з 6 % (за вуглеводами) гідролізату жому цукрової тростини [66].

Варто зазначити, що вартість пулулану є відносно високою (\$25 за кг) порівняно з іншими всесвітньо відомими мікробними полісахаридами [8]. Загалом це призводить до активного пошуку дешевої сировини для його виробництва. Так, в огляді [159] підсумовано відомості, наявні за останні два десятиріччя, щодо синтезу пулулану на агропромислових відходах (меляса, сиропи, вичавки з цукрової тростини та цукрового буряку, перероблене насіння та лушпиння тощо). При цьому показано, що концентрація полісахариду залежно від умов культивування, типу та концентрації використаного відпрацьованого субстрату може варіювати від 6,5 до 125 г/л.

Нещодавно з'явилося одне з небагатьох повідомлень про синтез пулулану в умовах твердофазному культивуванні. Так, при культивуванні рості *Aureobasidium pullulans* МТСС 1991 на середовищі з відходами переробки маніоки, в якому додатково проведено оптимізацію вмісту неорганічних солей та дріжджового екстракту, концентрація полісахариду досягала 6,45 г/л [179]. У той же час інші автори [140] при культивуванні даного штаму на аналогічних відходах отримували значно більший вихід цільового продукту (27,5 г ЕПС/ кг субстрату). Основною причиною такої розбіжності може бути варіабельність компонентного складу відходів та способів їхньої попередньої обробки.

### 1.3.3. Агропромислові відходи та інші нетрадиційні субстрати

Останнім часом у літературі почали з'являтися нові публікації про використання для синтезу мікробних ЕПС не тільки класичних відходів цукрового виробництва (меляси, жому, соку цукрової тростини тощо) (див. *Підрозділ 1.3.2.*), а дійсно нетрадиційних субстратів, до яких можна віднести: залишки різноманітних фруктів та овочів [6, 12, 30, 74, 75, 107, 115, 133, 150, 174], пальмовий сік [46, 109, 110], лігноцелюлозні відходи [23, 54, 87, 188], відходи біодизелю [38, 135], синтетичні поліютант [58] тощо.

**Залишки фруктів та овочів.** У процесі вирощування *Bacillus* sp. SRA4 на середовищі з екстрактом залишків фруктових відходів (8 % за вуглеводами) накопичував впродовж 72 год 25,1 г/л полісахариду [174]. Інші автори [6] повідомляють про здатність бактерій *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 за оптимальних умов культивування на середовищі з виноградними вичавками (5 % за вуглеводами) синтезувати 12,08 г/л гелану.

У роботі [107] повідомляється, що заміна в середовищі культивування штаму *Aureobasidium pullulans* 51 сахарози (10 %) на фініковий сироп (12,5 % за вуглеводами) супроводжувалося збільшенням концентрації полісахариду з 5,01 г/л до 14,06 г/л.

Проведення оптимізації умов культивування *Macrocooccus brunensis* при рості на суміші порошку з мангових кісточок (7 %) та сахарозі (1 %) призвело до підвищення показників синтезу ЕПС у 2,1 рази (до 30,93 г/л) [133]. У роботі [12] продемонстровано здатність мутантного штаму *Bacillus licheniformis* MS3 в умовах твердофазного культивування на подрібнених мангових шкірках синтезувати 15,6 г/л ЕПС. Інші дослідники [74] встановили, що при рості на середовищі, яке містить порошок некондиційного ламаного рису (джерело вуглецю) та соєвий шроту (джерело азоту), штам *Bacillus tequilensis* PS21 здатен накопичувати 28,47 г/л полісахариду.

Kazemi зі співавт. [75] займалися розробкою комплексної технології отримання практично цінних сполук з баклажанових шкірок. Відповідно до даної

технології екстракт, отриманий з оброблених шкірок, використовувався для виділення пектинів та фенольних з'єднань, а сухий залишок – для культивування *Aureobasidium pullulans* KY767024 та отримання пулулану. При використанні даного субстрату за оптимальних умов вирощування концентрація синтезованого ЕПС досягала 16,8 г/л.

**Шкірки картоплі.** У роботі [115] досліджено можливість заміни сахарози та дріжджового екстракту в середовищі культивування *Shewanella chilikensis* WAS11 на різноманітні агропромислові відходи (мелясу з цукрової тростини, шкірки солодкої картоплі та овочевих бананів, екстракт пташиного посліду, стручки арахісу, бобові висівки). Встановлено, що при використанні шкірок солодкої картоплі (2 %) та бобових висівок (0,5 %) в якості джерела вуглецю та азоту відповідно концентрація полісахариду зростала у 1,8 рази та була найвищою порівняно з використанням інших досліджуваних відходів. Загалом після проведення додаткової оптимізації процесу культивування за допомогою методу Бокса-Вілсона отримано 38,14 г/л цільового продукту.

Інші дослідники [30] проводили порівняння впливу умов культивування (напівтвердофазне або глибинне) на синтез ксантану штамом *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* ISBF 1182 при рості на картопляних шкірках. Експерименти показали, при напівтвердофазному культивуванні кількість синтезованого полісахариду досягала 20,9 г/л, що було у 10,3 рази вищим порівняно з глибинним. У роботі [150] повідомляється, що за оптимальних умов вихід альгінату при твердофазному культивуванні *Azotobacter nigricans* FCBP-PB-0422 на картопляних шкірках становив 0,2 г ЕПС/ г субстрату.

**Пальмовий сік.** Mammaleti зі співавт. [109] встановили, що при використанні соку кокосової пальми, яка містить у своєму складі 17 % сахарози та 0,25 % білку, в якості субстрату для біосинтезу бактерії *Bacillus subtilis* NCIM 5021 здатні синтезувати 57,2 г/л левану. У подальших дослідженнях [110] продемонстровано декілька підходів для інтенсифікації синтезу ЕПС на даному субстраті. Так, при додатковому внесенні чотирьох порцій субстратів кожні 3 год

після 11 год вирощування продуцента супроводжувалось накопиченням 62,1 г/л полісахариду, що було на 8,5 % вище за показники, отримані без проведення підживлення. При культивуванні на суміші соку з кокосової пальми, меляси, та ананасового екстракту (сумарна концентрація субстратів 17 % за вуглеводами) показники синтезу полісахариду досягали 69,40 г/л. У той же час при культивуванні на відповідних моносубстратах концентрація левану не перевищувала 60, 50 і 20 г/л відповідно.

У роботі [46] продемонстровано здатність бактерій *Acetobacter xylinum* при рості на суміші соку листя олійної пальми та кокосової води (оптимальне співвідношення 60:40) накопичувати 4,5 г/л бактеріальних целюлоз.

**Лігноцелюлозні відходи.** При рості на оброблених паровим вибухом стеблах кіноа (1 % за вуглеводами) галофільний штам *Bacillus* BU-4 синтезував 2,73 г/л ЕПС, що було дещо вищим за показники, отримані на глюкозі (2,34 г/л) [23]. При цьому за аналогічної концентрації ферментативного гідролізату дерев'яної тирси штам BU-4 накопичував всього 0,89 г/л ЕПС. Інші дослідники [87] повідомляють про здатність *Aureobasidium melanogenum* TN2-1-2 на середовищі, яке містить 11 % (масова частка за вуглеводами) гідролізату пшеничної соломи (співвідношення глюкози та ксилози 78 %:22 %), синтезувати 55,1 г/л пулулану. При рості на моносубстратах глюкозі та ксилозі концентрація ЕПС становила 58,3 та 50,2 г/л відповідно.

У роботі [188] показано здатність *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 синтезувати мікробний ЕПС санксан суміші глюкози та ксилози. Встановлено, що незалежно від співвідношення субстратів у суміші (7:3, 5:5, 3:7) їх швидкість споживання, концентрація ЕПС та рівень біомаси в перші 24 год культивування були в 1,1-2,3 рази вищими за результати, отримані на відповідних моносубстратах. Наприкінці культивування показники синтезу вирівнювалися і перебували на одному рівні незалежно від типу використовуваного субстрату (моно- або змішаного). Варто зазначити, що заміна рафінованих вуглеводів на 4 % (масова частка за вуглеводами) гідролізату кукурудзяної соломи (співвідношення

глюкози та ксилози 3,48:1) супроводжувалася додатковим підвищенням кількості синтезованого санксану до 13,1 г ЕПС/ кг культуральної рідини.

Gao зі співавт. [54] встановили, що додаткове внесення 5,09 % (масова частка за вуглеводами) порошку меляси з цукрової тростини при твердофазному культивуванні штаму *Kosakonia cowanii* TL-1 на середовищі, яке містить суміш жому цукрової тростини та капсули насіння квасолі (оптимальне співвідношення 2:1), супроводжувалося підвищенням виходу ЕПС у понад 7 разів (до 0,042 г ЕПС/ г субстрату).

### 1.3.4. Невуглеводні альтернативні субстрати

**Відходи виробництва біодизелю.** На кожні 100 л біодизелю утворюється майже 10 л технічного гліцерину [28, 34], який внаслідок значного вмісту різноманітних домішок перед можливим подальшим використанням, наприклад, у косметичній промисловості тощо, потребує проведення додаткових дорогих стадій попередньої очистки. Варто зазначити, що підвищена лужність та наявність метанолу у складі технічного гліцерину роблять його зберігання та утилізацію серйозною екологічною проблемою.

Нещодавно з'явилися декілька нових повідомлень про можливість використання даного відходу для синтезу мікробних ЕПС. Так, Raghunandan зі співавт. [135] повідомляють про виділення з ємностей для зберігання біодизелю двох перспективних ЕПС-синтезувальних представників роду *Sphingomonas*, які при рості на технічному гліцерині (8 %) синтезують 51,6 та 52,6 г/л гелану відповідно. У роботі [38] продемонстровано здатність бактерій *Pseudomonas aeruginosa* LVD-10 та *Enterobacter* sp. SW при культивуванні на середовищі з технічним гліцерином (4,5 %) накопичувати 3,2 та 2,5 г/л ЕПС відповідно.

**Пестициди.** Gupta зі співавт. [58] під час дослідження синтезу ЕПС штамом *Bacillus* sp. ISTL8 на різних вуглеводних субстратах (сахароза, мальтоза, коричневий цукор, фруктоза, меляса), пестицидах та поліциклічних ароматичних вуглеводнях (карбофуран, пентахлорфенол, 2,4-динітрофенол, пірен, флуорен) встановили, що кількість синтезованого полісахариду при використанні в якості

субстрату коричневого цукру (2 %) або карбофурану (0,04 %) є однаковою і становить 6,2 г/л.

Узагальнені дані щодо синтезу ЕПС на альтернативних нетрадиційних субстратах наведено в *табл. 1.3*.

Таблиця 1.3 – Показники синтезу полісахаридів на альтернативних субстратах

Продуцент	Тип та концентрація, %		Концентрація ЕПС, г/л	Література
	джерела вуглецю	джерела азоту		
<i>Acetobacter xylinum</i>	Суміш соку листя олійної пальми та кокосової води (60:40)	н/п	4,50	46
<i>Aureobasidium melanogenum</i> TN2-1-2	Гідролізат пшеничної соломи, 11 за вуглеводами	Співвідношення C/N 13,07	55,10	87
<i>Aureobasidium pullulans</i> 201253	Гідролізат картопляного крохмалю, 8 Сахароза, 2	Дріжджовий екстракт, 0,25 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,06	54,57	8
<i>Aureobasidium pullulans</i> 51	Фініковий сироп, 12,5 за вуглеводами	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,06	14,06	107
<i>Aureobasidium pullulans</i> CCTCC M 2012259	Крохмаль з маніюки, 5,24	Гідролізат соєвого шроту, 0,98 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,1	25,89	63
<i>Aureobasidium pullulans</i> CCTCC M 2012259	Крохмаль з маніюки, 5,01	Кукурудзяний екстракт, 0,46 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,06	21,07	63
<i>Aureobasidium pullulans</i> KY767024	Гідролізат залишків баклажанів, 3	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,06	16,80	75
<i>Aureobasidium pullulans</i> LB83	Гідролізат жому цукрової тростини, 6	Дріжджовий екстракт, 0,19	25,19	66
<i>Aureobasidium pullulans</i> MTCC 1991	Вижимки маніюки (твердофазне культивування)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,02 Дріжджовий екстракт, 0,06	6,45	179

<i>Azotobacter nigricans</i> FCBP-PB-0422	Картопляні шкірки	Кукурудзяний екстракт, 0,1	197,6 мг ЕПС/ г субстрату	150
<i>Bacillus licheniformis</i> MS3	Подрібнені мангові шкірки (твердофазне культивування)	Дріжджовий екстракт, 0,06	15,60	12
<i>Bacillus licheniformis</i> M4	Меляса з цукрової тростини, 2 за вуглеводами	М'ясний екстракт, 1,5	9,00	11
<i>Bacillus</i> sp. BU-4	Оброблені стеблі кіноа, 1 за вуглеводами	Пептон, 0,5 Дріжджовий екстракт, 0,3	2,73	23
<i>Bacillus</i> sp. BU-4	Оброблена дерев'яна тирса, 1 за вуглеводами	Пептон, 0,5 Дріжджовий екстракт, 0,3	0,89	23
<i>Bacillus</i> sp. ISTL8	Карбофуран, 0,04	Пептон, 1 М'ясний екстракт, 0,3	6,20	58
<i>Bacillus</i> sp. SRA4	Екстракт залишків фруктових відходів, 8 за вуглеводами	Казеїн, 1,8 Дріжджовий екстракт, 0,03	25,10	174
<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 441	Сахароза, 10	Пептон з курячого пір'я, 0,2	25,83	176
<i>Bacillus subtilis</i> NCIM 5021	Сік з кокосової пальми, 17 за вуглеводами	Білок, 0,25 (міститься в субстраті)	57,20	109
<i>Bacillus tequilensis</i> PS21	Порошок з некондиційного ламаного рису, 5	Соевий шрот, 3	28,47	74
<i>Ensifer meliloti</i> SEMIA 135	Бурякова меляса, 1 за вуглеводами	Дріжджовий екстракт, 0,04	4,12	120

<i>Enterobacter</i> sp. SW	Технічний гліцерин, 4,5	н/п	2,5	38
<i>Kosakonia cowanii</i> TL-1	Жом цукрової тростини та капсули насіння квасолі у співвідношенні 2:1 (твердофазне культивування) Меляса з цукрової тростини, 5,09	NaNO <sub>3</sub> , 4,16	0,042 г ЕПС/ г субстрату	54
<i>Kosakonia cowanii</i> TL-1	Сік цукрової тростини, 3 за вуглеводами	Дріжджовий екстракт, 0,3	15,61	181
<i>Lactobacillus plantarum</i> BR2	Гідролізат крохмалю маніоки, 4 за вуглеводами	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,55 Дріжджовий екстракт, 4	6,50	162
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> ММРІ	Соєва меляса, 1 за вуглеводами	Дріжджовий екстракт, 0,2	1,06	1
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MTCC 7337	Сік цукрової тростини, 5 за вуглеводами	Дріжджовий екстракт, 2	14,60	136
<i>Macrococcus brunensis</i>	Порошок з мангових кісточок, 4 Сахароза, 1	Дріжджовий екстракт, 0,7	30,93	133
<i>Mesorhizobium</i> sp. SEMIA 816	Бурякова меляса, 1 за вуглеводами	Дріжджовий екстракт, 0,04	3,76	120
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LVD-10	Технічний гліцерин, 4,5	н/п	3,20	38
<i>Pseudomonas stutzeri</i> AS22	Крохмаль, 5 Маноза, 0,1	Дріжджовий екстракт, 0,5	10,20	93
<i>Rhizobium haultense</i> SEMIA 6450	Бурякова меляса, 1 за вуглеводами	Дріжджовий екстракт, 0,19	4,47	120
<i>Sclerotium rolfsii</i> ATCC 201126	Крохмаль, 2	NaNO <sub>3</sub> , 0,3	7,95	175
<i>Sclerotium rolfsii</i> ATCC	Меляса з цукрової тростини, 1,8 за	NaNO <sub>3</sub> , 0,3	5,11	175

201126	вуглеводами			
<i>Shewanella chilikensis</i> WAS11	Шкірка солодкої картоплі, 2	Бобові висівки, 0,5	38,14	115
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ATCC 31461	Виноградні вичавки, 5 за вуглеводами	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1	12,08	6
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ZJUT 1008	Глюкоза, 3,4	Кукурудзяний екстракт, 1 Сечовина 0,25	14,41	69
<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>	Технічний гліцерин, 8	NH <sub>4</sub> Cl, 0,1	51,60	135
<i>Sphingomonas sanxanigenens</i> NX02	Гідролізат кукурудзяної соломи, 4 за вуглеводами	Дріжджовий екстракт, 0,02	13,10 г ЕПС / кг культура- льної рідини	188
<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>	Технічний гліцерин, 8	NH <sub>4</sub> Cl, 0,1	52,60	135
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> ATCC 35246	Бурякова м'яса, 6,6 за вуглеводами	Протеїновий гідролізат з овечої вовни, 1,2	3,54	10
<i>Xanthomonas campestris</i> MO- 03	Бурякова м'яса, 4 за вуглеводами	Пептон з курячого пір'я, 0,4	20,50	125
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> ISBF 1182	Картопляна шкірка, 10	Дріжджовий екстракт, 0,1	20,90	30

**Примітки.** н/п – не передбачено.

## Висновки до Розділу 1

Проаналізовані літературні дані останніх років щодо шляхів підвищення ефективності технологій мікробних ЕПС засвідчили необхідність застосування комплексного підходу для вирішення даної задачі. Так, на першому етапі необхідним є встановлення оптимального складу поживного середовища (тип та концентрація джерела вуглецю та азоту, мінеральних солей та інших компонентів) та умов культивування (рН, температура, тривалість культивування тощо) продуцента. При цьому найбільш сучасним підходом являється проведення багатофакторних досліджень з використанням комплексних математичних моделей (метод Бокса-Вілсона, метод Тагучі та інші), які враховують взаємозв'язок різних досліджуваних факторів і дають змогу більш точно встановити оптимальні умови процесу культивування.

У той же час однофакторні дослідження в комплексі з сучасними дизайнами проведення експериментальних досліджень (наприклад, Плакета-Бурмана) залишаються ефективним інструментом для первинного визначення найбільш критичних факторів, які мають найбільший вплив на процес і потребують додаткової оптимізації.

Доцільним також є використання методів генетично інженерії для виявлення та усунення вузьких місць біосинтезу ЕПС, модифікації властивостей отриманих біополімерів та розширення набору субстратів для їхнього виробництва. При цьому основним підходом являється спрямування пулу вуглецю на синтез цільового продукту за рахунок підвищення активності ключових генів біосинтезу полісахаридів і делеції генів конкуруючих метаболічних шляхів.

Наведені вище дослідження зазвичай проводяться з використанням дорогих рафінованих вуглеводних субстратів (глюкоза, сахароза, лактоза тощо), що негативно впливає на собівартість мікробних ЕПС. Зважаючи на це активно ведеться пошук та проводяться дослідження з особливостей використання альтернативних більш дешевих субстратів для їхнього отримання. При цьому

найбільш розповсюдженими являються відходи цукрового виробництва (меляса, жом, патока тощо), до складу яких окрім легкозасвоюваних вуглеводів зазвичай входять ряд інших нутрієнтів (вітаміни, амінокислоти, мікро- та макроелементи), необхідних для синтезу ЕПС.

Варто зазначити, що останнім часом починають активно з'являтися повідомлення про розширення спектру можливих альтернативних субстратів для синтезу полісахаридів за рахунок використання дійсно нетрадиційних джерел вуглецю та енергії (залишки різноманітних фруктів та овочів, лігноцелюлозні відходи, відходи біодизелю, синтетичні поліютантати тощо).

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1. Характеристика об'єктів дослідження

**Об'єкти досліджень.** Як об'єкт досліджень використовували продуцента мікробного екзополісахариду (ЕПС) етаполану штам *Acinetobacter* sp. 12S, депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології Національної академії наук України за номером ІМВ В-7005.

До складу етаполану входять один нейтральний та два кислих полісахариди, неацильований (НАП) та ацильований (АП), які являються ідентичними за молярним співвідношенням *D*-глюкози, *D*-манози, *D*-галактози, *L*-рамнози, *D*-глюкуронової і піровиноградної кислот (3:2:1:1:1:1) та структурі повторюваної ланки вуглеводного ланцюга (рис. 2.1). Різниця між НАП та АП полягає в тому, що останній додатково містить у своєму складі залишки жирних кислот (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>) [203].

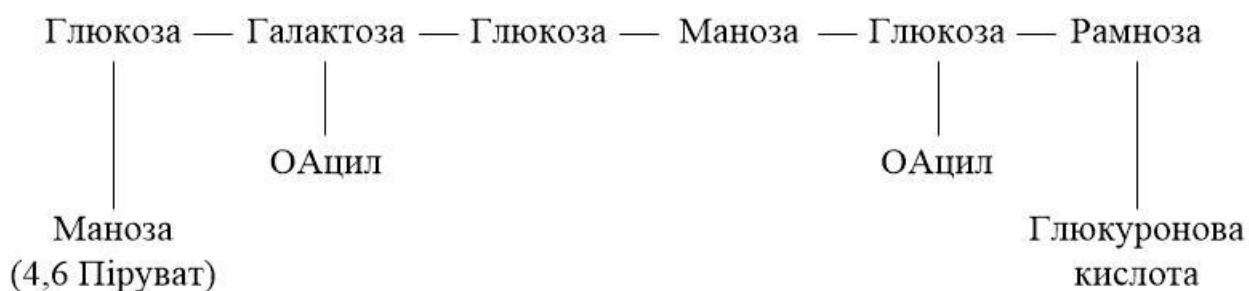


Рисунок 2.1 – Структура повторюваної ланки полісахариду етаполану [203]

### 2.2. Визначення оптимального молярного співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші

Енергетичні потреби синтезу етаполану з жирних кислот олії (лінолевої та олеїнової), ацетату та етанолу визначали на основі інформації про активність ферментів циклу Кребса, гліоксилатного циклу та глюконеогенезу у штаму *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 [203], а також даних про β-окиснення жирних кислот [139].

**Суміш енергетично нерівноцінних субстратів.** Методологія проведення розрахунків при рості на суміші енергетично нерівноцінних субстратів складається з двох основних етапів:

1) визначення генерації та витрат енергії під час синтезу полісахариду та біомаси при рості бактерій на ацетаті (енергетично дефіцитний субстрат);

2) встановлення кількості енергії, яка генерується при катаболізмі жирних кислот соняшникової олії (енергетично надлишковий субстрат) до фосфогліцеринової кислоти, яка являється центральним вуглецевим попередником;

3) розрахунок кількості соняшникової олії, необхідної для забезпечення «покриття» енергетичної потреби, яка має місце при метаболізмі енергетично дефіцитного субстрату.

**Суміш енергетично надлишкових субстратів.** При рості на суміші енергетично надлишкових субстратів передбачається проведення:

1) визначення кількості енергії, що генерується після синтезу біомаси та полісахариду при рості штаму ІМВ В-7005 на кожному енергетично надлишковому субстраті суміші (соняшниковій олії та етанолі);

2) розрахунок загального внеску кожного енергетично надлишкового субстрату суміші в розподіл надлишкової енергії, утвореної під час їхнього метаболізму.

Для врахування особливостей складу етаполану та використовуваних субстратів при проведенні наведених вище розрахунків приймали наступні припущення:

1) до складу етаполану входить 50 % АП та 50 % НАП;

2) АП ацильований двома залишками жирних кислот, а саме, пальмітинової та лауринової;

3) основними вищими жирними кислотами, що входять до складу рафінованої соняшникової олії, являються олеїнова (50 %) та лінолева (50 %) [139];

4) НАДФН, що утворюється у процесі катаболізму субстратів, є джерелом відновлюваних еквівалентів, які окиснюються до води через дихальний ланцюг;

5) коефіцієнт Р/О (кількість молекул АТФ, утворених в розрахунку на один

атом кисню) становить 2. Зважаючи на це в розрахунках 1 моль НАД(Ф)Н приймали еквівалентним 2 молям АТФ, 1 моль ФАДН – 1 моль АТФ.

Для графічного зображення схем синтезу фосфогліцеринової кислоти та повторювальної ланки етаполану при рості *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на відповідних енергетично дефіцитних або надлишкових субстратів використовували MS Visio.

### 2.3. Умови культивування штаму продуцента етаполану

Узагальнену схему проведення експериментальних досліджень при вирощуванні *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на суміші олії та C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів представлено на *рис. 2.2*.



Рисунок 2.2 – Принципова схема проведення експериментальних досліджень з біосинтезу етаполану штамом *Acinetobacter* sp. IMB B-7005

**Склад поживних середовищ.** Бактерії вирощували у рідких мінеральних

середовищах наступного складу (г/л):

*середовище 1 (базове):*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 6,8;  $\text{KOH}$  – 0,9;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,4 (1,6 мМ);  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 0,6;  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,001 [203];

*середовище 2:* аналогічне середовищу 1, в якому концентрація  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  знижена в 3 рази;

*середовище 3:* аналогічне середовищу 1, в якому відсутній  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;

*середовище 4:* аналогічне середовищу 1, в якому  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  замінено на еквімолярну за нітрогеном концентрацію  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,8 г/л);

*середовище 5:* аналогічне середовищу 4, в якому концентрація  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  знижена в 2 рази;

*середовище 6:* аналогічне середовищу 5, в якому концентрація  $\text{KOH}$  знижена в 2 рази;

*середовище 7:* аналогічне середовищу 6, в якому відсутній  $\text{KOH}$ ;

*середовище 8:* аналогічне середовищу 7, в якому концентрація  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  знижена в 2 рази;

*середовище 9:* аналогічне середовищу 7, в якому концентрація  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  підвищена до 1,25 г/л (5,0 мМ).

*середовище 10:* аналогічне середовищу 1, в якому  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  замінено на еквімолярну за нітрогеном концентрацію  $\text{KNO}_3$  (1,5 г/л);

*середовище 11:* аналогічне середовищу 9, в якому концентрація  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  підвищена до 1,25 г/л (5,0 мМ).

Розчини солей стерилізували вологим жаром при температурі 131 °С (1,5 атм) впродовж 40 хв.

Узагальнена характеристика поживних середовищ наведена в *табл. 2.1*.

Оскільки продуцент етаполану є природним ауксотрофом, який потребує для росту у синтетичних та напівсинтетичних середовищах пантотенову кислоту та неідентифікований ростовий фактор, що міститься у дріжджовому автолізаті [199, 203], у середовище додатково вносили 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізату, а також мультивітамінний комплекс «Комплевіт» в концентрації

0,00085 % (масова частка в перерахунку на пантотенат), який являється альтернативним джерелом пантотенату.

Таблиця 2.1 – Узагальнена характеристика середовищ для вирощування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005

Номер середовища	Джерело азотного живлення	Концентрація, г/л			
		Джерела азоту	Лужної складової		MgSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O
			KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KOH	
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,6	6,8	0,9	0,4 (1,6 мМ)
2		0,2	6,8	0,9	0,4 (1,6 мМ)
3		0	6,8	0,9	0,4 (1,6 мМ)
4	NH <sub>4</sub> Cl	0,8	6,8	0,9	0,4 (1,6 мМ)
5		0,8	3,4	0,9	0,4 (1,6 мМ)
6		0,8	3,4	0,45	0,4 (1,6 мМ)
7		0,8	3,4	0	0,4 (1,6 мМ)
8		0,8	1,7	0	0,4 (1,6 мМ)
9		0,8	3,4	0	1,25 (5,0 мМ)
10		KNO <sub>3</sub>	1,5	6,8	0,9
11	1,5		6,8	0,9	1,25 (5,0 мМ)

Для приготування розчину препарату «Комплевіт» вміст однієї капсули (концентрація пантотенату кальцію – 25 мг) розчиняли у 50 мл дистильованої води та стерилізували вологим жаром при температурі 112 °С (0,5 атм) впродовж 30 хв.

Дріжджовий екстракт готували наступним чином: 5 г екстракту розчиняли у 100 мл дистильованої води та стерилізували вологим жаром при температурі 112 °С (0,5 атм) впродовж 30 хв.

**Підготовка інокуляту.** Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі, що містило як джерело вуглецю та енергії:

*моносубстрати* – рафіновану соняшникову олію (0,5 %), змішану відпрацьовану після смаження різних продуктів соняшникову олію (0,5 %), ацетат натрію (0,5 %) або етанол (0,5%);

*змішані субстрати* – суміш рафінованої соняшnikової олії (0,25 %) та ацетату натрію (0,25 %), рафінованої соняшnikової олії (0,25 %) та суміш етанолу (0,25 %).

Концентрація інокуляту становила 10 %.

**Субстрати для біосинтезу етаполану.** Як джерело вуглецю та енергії використовували:

*моносубстрати* – рафінована соняшnikова олія 0,9-1,0 % (об'ємна частка), ацетат натрію 2,2 % (масова частка), етанол 1,7 % (об'ємна частка);

*змішані субстрати* – суміш рафінованої соняшnikової олії 0,15-1,75 % (об'ємна частка) та ацетату натрію 0,5-3,0 % (масова частка); суміш рафінованої соняшnikової олії 0,2-1,2 % (об'ємна частка) та етанолу 1,0-4,0 % (об'ємна частка); суміш рафінованої соняшnikової олії 1,5-4,0 % (об'ємна частка) та гідролізованої меляси 1,5-4,0 % (масова частка за вуглеводами).

В одному з варіантів рафіновану соняшnikову олію заміняли різні типи відпрацьованої олії (після смаження картоплі, м'яса, овочів або змішаної відпрацьованої олії після смаження різних продуктів).

Відпрацьовану олію після смаження картоплі та змішану відпрацьовану після смаження різних продуктів (після смаження м'яса, картоплі, цибулі та сиру) отримували з закладів ресторану швидкого харчування McDonald's (м. Київ) та кафе Rocker pub Tarantino'S (м. Київ) відповідно. Відбір пересмаженої олії проводився тричі з інтервалом в два місяці.

Відпрацьовану олію після смаження м'яса або овочів отримували в домашніх умовах після триразового смаження відповідних продуктів харчування впродовж 20 хв.

Розчини ацетату натрію стерилізували вологим жаром разом з розчинами солей при температурі 131 °C (1,5 атм) впродовж 40 хв.

Етанол, рафіновану та відпрацьовану соняшникову олію не стерилізували.

Гідроліз меляси здійснювали наступним чином: до 100 г меляси додавали дистильовану воду до кінцевого об'єму 200 мл, отриманий розчин підкислювали 1 н  $H_2SO_4$  до рН 4,0 і стерилізували при температурі 112 °С (0,5 атм) впродовж 30 хв. В одному з варіантів використовували мелясу, яку після стерилізації нейтралізували (рН 6,5-7,0) стерильним 10 %-м розчином КОН.

**Дробне внесення субстратів.** В одному з варіантів здійснювали дробне внесення субстратів (підживлення).

*Суміш олії та ацетату* – початкова концентрація олії у середовищі становила 0,25-0,75 %, а ацетату – 0,5-1,5 %, а в процесі культивування здійснювали дробне внесення субстратів порціями (сумарно 2 порції) по 0,25-0,5 % (олія) та 0,5-1,0 % (ацетат) до кінцевої концентрації субстратів 0,75-1,5 % та 1,5-3,0 % відповідно. Якщо перед підживленням рН культуральної рідини перевищувало 8,0-8,5, замість ацетату вносили оцтову кислоту в еквімолярній за вуглецем концентрації (0,35 %, об'ємна частка).

Принципова схема дробного внесення субстратів при рості штаму ІМВ В-7005 на суміші олії та ацетату натрію наведена на *рис. 2.3*.



Рисунок 2.3 – Схема дробного внесення субстратів при рості бактерій на суміші соняшникової олії та ацетату натрію

Суміш етанолу та олії – початкова концентрація олії у середовищі становила 0,2-0,6 %, а етанолу – 0,66-2,0 %. У процесі культивування через кожні 24 год здійснювали дробне внесення субстратів порціями (сумарно 1-4 порції) по 0,2-0,6 % (олія) та 0,66-2,0 % (етанол) до кінцевої концентрації субстратів 0,6-1,2 % та 2,0-4,0 % відповідно.

Принципова схема дробного внесення субстратів при рості штаму ІМВ В-7005 на суміші олії та етанолу наведена на *рис. 2.4*.

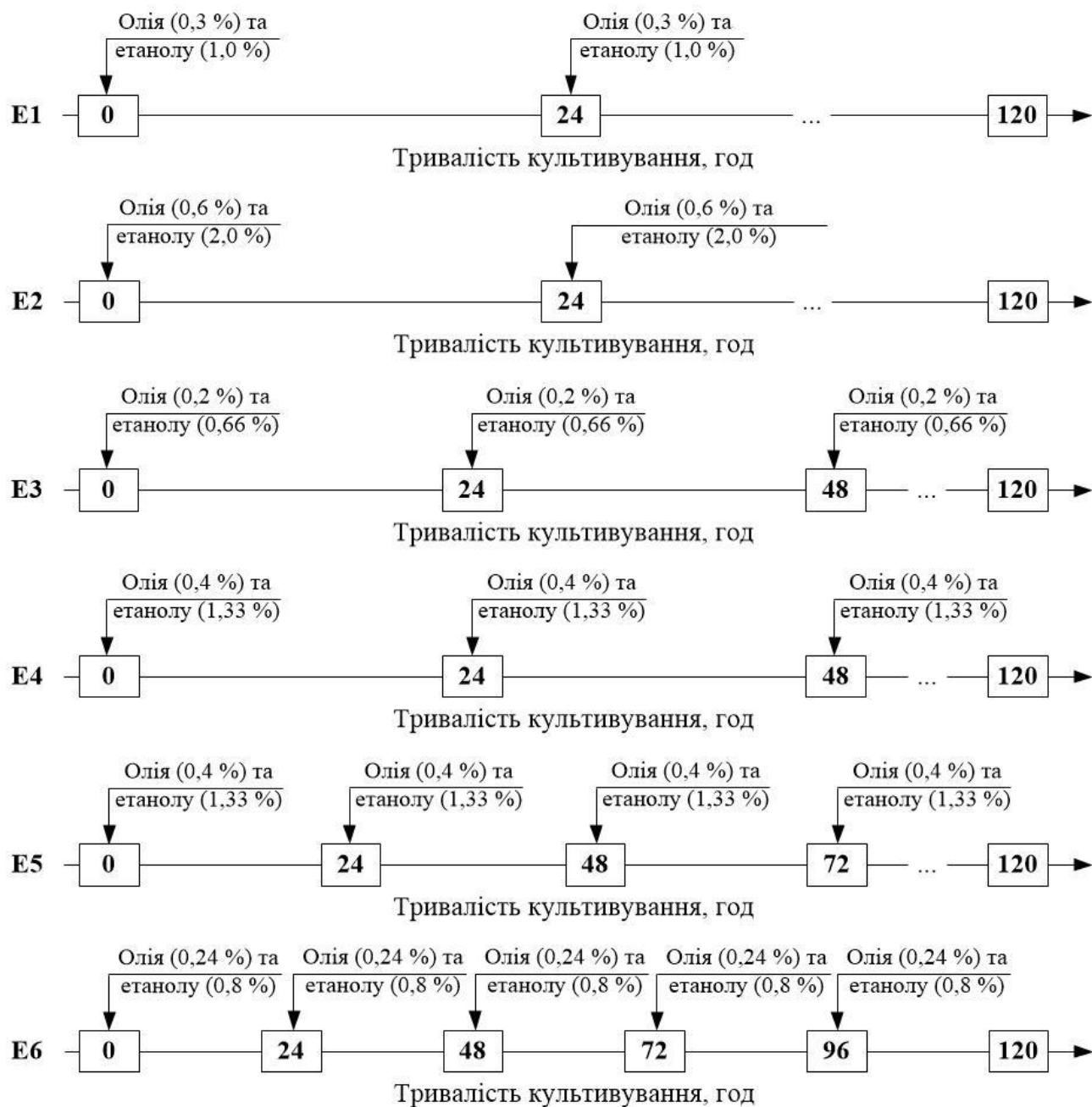


Рисунок 2.4 – Схема дробного внесення субстратів при рості штаму *Acinetobacter* ІМВ В-7005 на суміші соняшникової олії та етанолу

**Умови культивування.** Продуцента етаполану культивували у качалочних колбах (об'єм 750 мл) із 100 мл середовища на качалці (швидкість обертів 320 об/хв) при температурі 30 °С впродовж 120 год.

#### **2.4. Визначення показників росту та біосинтезу етаполану**

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком.

Кількість синтезованого етаполану визначали ваговим методом. Для цього до певного об'єму культуральної рідини (зазвичай 10-15 мл) додавали 1,5-2 об'єми ізопропанолу, осад ЕПС промивали чистим ізопропанолом і висушували при кімнатній температурі впродовж 24 год.

ЕПС-синтезувальну здатність розраховували як відношення концентрації ЕПС до концентрації біомаси та виражали у г ЕПС/ г біомаси:

$$\text{ЕПС-синтезувальна здатність} = \frac{\text{ЕПС}}{\text{Біомаса}} \quad (2.1)$$

Теоретичний вихід етаполану від субстрату розраховували з урахуванням наступних припущень: 1) біомаса та полісахарид на 50 % складаються з вуглецю [203]; 2) половина вуглецю субстратів окислюється з метою одержання енергії («холосте окислення»); 3) соняшникова олія складається з 50 % лінолевої та 50 % олеїнової вищих жирних кислот [139]; 4) вміст азоту у біомасі становить 10 %.

Так, наприклад, з 1 % (10 г/л) ацетату натрію (вміст вуглецю 2,93 г/л) та 0,5 % (4,6 г/л) олії (вміст вуглецю 3,54 г/л) з урахуванням «холостого окислення» можна отримати сумарно 6,46 г/л ЕПС та біомаси. Враховуючи, що за використання 0,8 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (вміст азоту 0,21 г) рівень біомаси становить 2,1 г/л, максимальна концентрація ЕПС дорівнює 4,39 г/л.

#### **2.5. Реологічні властивості полісахариду**

Реологічні властивості 0,05 % розчинів культуральної рідини або сухого полісахариду визначали за зміною в'язкості в присутності 0,1 М  $\text{KCl}$  та у системі  $\text{Cu}^{2+}$ -гліцин, що являється індивідуальною властивістю полісахариду етаполану

[203]. Обробка його розчинів неорганічними солями призводить до утворенням осаду полісахариду, який переходить у розчин за присутності хелатоутворюючого агенту (гліцину).

При визначенні в'язкості розчинів полісахариду за присутності 0,1 М КСІ до 0,05 % розчину етаполану або 0,05 % розчину культуральної рідини вносили сухий КСІ до кінцевої концентрації 0,1 М та перемішували до повного розчинення хлориду калію. Перед вимірюванням в'язкості розчин попередньо витримували впродовж 60 хвилин.

Для вивчення поведінки розчинів етаполану у системі  $\text{Cu}^{2+}$ -гліцин до 0,05 % розчинів полісахариду послідовно при постійному перемішуванні додавали 0,003 М  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  та 0,015 М гліцин. Отриманий розчин нагрівали до 80 °С та витримували при даній температурі впродовж 5 хв. Перед вимірюванням в'язкості отриманий розчин охолоджували на повітрі до 20 °С.

## 2.6. Статистична обробка даних

Всі досліді проводили в трьох повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила від трьох до п'яти. Достовірність результатів досліджень оцінювали у відповідності з  $t$ -критерієм Стьюдента. Визначення проводили наступним чином [204]:

1) Розраховували середньоарифметичне значення одержаних результатів (середнє арифметичне вибірки):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{l=1}^n x_l, \quad (2.2)$$

де  $x_l$  – значення варіанту,  $\sum_{l=1}^n$  – знак суми варіантів у межах від першого

( $x_1$ ) до  $n$ -го варіанту,  $n$  – загальне число варіантів або об'єм даної сукупності.

2) Визначали різницю між середніми значеннями вибірок:

$$d = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2|, \quad (2.3)$$

3) Для встановлення, вірогідна або випадкова дана різниця, розраховували помилку різниці середніх значень за формулою:

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum(x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum(x_2 - \bar{x}_2)^2}{(n-1) \times n}}, \quad (2.4)$$

4) Розраховували фактично визначену величину  $t$ -критерію:

$$t_\phi = \frac{d}{S_d}, \quad (2.5)$$

5) Визначали число ступенів вільності:

$$k = n_1 + n_2 - 2, \quad (2.6)$$

6) Вибирали значення стандартного  $t$ -критерію ( $t_{st}$ ) для прийнятого рівня значимості  $\alpha$  [204].

При умові, що  $t_\phi \geq t_{st}$  нульова гіпотеза спростовується на високому рівні значимості ( $P < 0,05$ ).

Отримані в ході досліджень результати відповідно  $t$ -критерія Стьюдента виявилися статистично достовірними при 5 %-му рівні значимості.

Відповідні розрахунки проводили з використанням математичного програмного забезпечення Mathcad.

### **РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ РАФІНОВАНОЇ СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ ТА АЦЕТАТУ НАТРІЮ**

Підвищити показники синтезу мікробних екзополісахаридів (ЕПС) можливо різними шляхами (див. *Розділ 1*). Одним з перспективних підходів являється використання змішаних субстратів для їхнього біосинтезу. Переваги такого підходу є чимось подібними до таких при рості мікроорганізмів за міксотрофних умов [88]. Зокрема спостерігається одночасне споживання субстратів, що супроводжується зменшенням непродуктивних втрат під час їхнього катаболізму та загальним підвищенням ступеню утилізації [14].

Загалом позитивний ефект від використання суміші ростових субстратів може спостерігатися внаслідок [14, 203]: 1) одночасного залучення обох моносубстратів суміші до енергетичного та конструктивного метаболізму; 2) роздільного використання кожного з субстратів суміші виключно в якості джерела вуглецю або джерела енергії; 3) розширення або усунення «вузьких місць» катаболізму моносубстрату за рахунок додаткового введення «допоміжного субстрату».

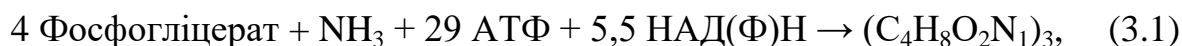
Варто зазначити, що максимальний позитивний ефект при використанні змішаних субстратів досягається лише при їхньому оптимальному молярному співвідношенні, яке являється індивідуальним для кожного продуцента та значною мірою залежить від особливостей його метаболічної активності.

Визначення даного співвідношення потребує проведення значної кількості експериментальних досліджень. У той же час їхній обсяг можна істотно скоротити завдяки попередньому визначенню оптимального теоретичного співвідношення.

#### **3.1. Розрахунок та експериментальна перевірка молярного співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші**

Відповідно до енергетичної класифікації Бабеля [14] всі субстрати, в залежності від кількості енергії, яка генерується під час їхнього перетворення на центральний вуглецевий попередник (фосфогліцерат), можна умовно поділити на

енергетично надлишкові та дефіцитні. Кількість енергії, яка є необхідною для синтезу клітинних компонентів з фосфогліцеринової кислоти, являється приблизно однаковою для всіх мікроорганізмів та становить 1 моль АТФ на 10,5 г біомаси [203]. Рівняння синтезу біомаси з даного попередника при використанні  $\text{NH}_3$  в якості джерела азотного живлення можна представити наступним чином:



де  $(\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_1)_3$  – формула моля біомаси.

Відповідно до даної класифікації соняшникову олію, яка в основному складається з лінолевої та олеїнової жирних кислот, можна вважати енергетично надлишковим субстратом, а ацетат – енергетично дефіцитним.

Варто зазначити, що повне розкриття потенціалу від використання змішаних ростових субстратів, досягається лише при певному молярному співвідношенню їхніх концентрацій у суміші, яке безпосередньо пов'язано з особливостями метаболізму відповідних моносубстратів.

Визначення даного співвідношення є комплексним завданням, вирішення якого можна значною мірою оптимізувати завдяки попередньому проведенню теоретичних розрахунків та встановленню оптимального розрахункового співвідношення.

Для цього спершу необхідно провести розрахунок енергетичних потреб синтезу клітинних компонентів та цільового продукту при рості продуцента на енергетично дефіцитному субстраті, тобто ацетаті.

**Потреба в АТФ під час синтезу етаполану з ацетату.** Повторювана ланка ацильованого полісахариду (АП) складається з нейтральних моносахаридів, деякі з яких, на відміну від неацильованого полісахариду (НАП), є ацильованими, а також залишків пірувату та глюкуронової кислоти (*рис. 2.1*).

Зі схеми, наведеної на *рис. 3.1*, видно, що синтез даних сполук при рості *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на ацетаті нерозривно пов'язаний з витратами енергії під час синтезу моносахаридів (глюкози, галактози, манози та рамнози) та

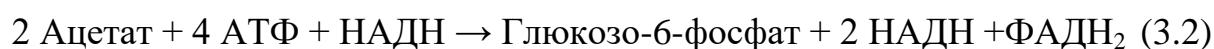


**Витрати енергії на синтез моносахаридів.** Процес утворення вуглеводної частини етаполану можна умовно поділити на 3 етапи:

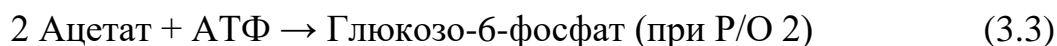
1. *Синтез фосфорильованих вуглеводів (глюкозо-6-фосфату та фруктозо-6-фосфату).*

Спочатку ацетат через неповний цикл трикарбонових кислот (у *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 2-оксоглутаратдегідрогеназа функціонує з низькою активністю [203]) та цикл Кребса-Корнберга (гліоксилатний цикл) залучається до реакцій глюконеогенезу (у продуцента етаполану ключовим ферментом глюконеогенезу являється фосфоенолпіруватсинтетаза [203]), під час яких відбувається утворення глюкозо-6-фосфату (фруктозо-6-фосфату). Зазначені перетворення супроводжуються відновленням ФАД і НАД, а також витратою енергії АТФ.

Беручи до уваги наведену вище інформацію, сумарне рівняння одержання 1 моль глюкозо-6-фосфату (або фруктозо-6-фосфату) з ацетату можна виразити наступним чином:



або



2. *Утворення попередників ЕПС.*

На наступному етапі відбувається синтез відповідних нуклеозиддифосфатсахаридів (наприклад, гуанозиндифосфат-манози (ГДФ-манози) з манозо-1-фосфату чи уридиндифосфат-глюкози (УДФ-глюкози) з глюкозо-1-фосфату тощо). Синтез кожного попередника супроводжується витратою 1 моль гуанозинтрифосфату (ГТФ) або уридинтрифосфату (УТФ).

3. *Полімеризація полісахариду.*

Наприкінці повторювана ланка приєднується до наростаючої молекули полісахариду, що супроводжується додатковою витратою енергії одного макроергічного зв'язку.

До складу повторюваної ланки етаполану входять 7 залишків нейтральних моносахаридів та 1 залишок глюкуронової кислоти. Для їх синтезу необхідно 8 моль глюкозо-6-фосфату (фруктозо-6-фосфату). Дану кількість фосфорильованих вуглеводів можна отримати з 16 моль ацетату.

Таким чином, загальна витрата АТФ на синтез моносахаридів, які входять до складу повторювальної ланки АП, та приєднання цієї ланки до молекули полісахариду становить:

$$8 \times 2 + 1 = 17 \text{ моль АТФ}$$

У той же час на даному етапі відбувається додаткова генерація 2 моль НАД(Ф)Н під час утворення глюкуронової кислоти, в результаті чого отримується 4 моль АТФ.

Отже, загальні витрати енергії під час синтезу моносахаридів становлять:

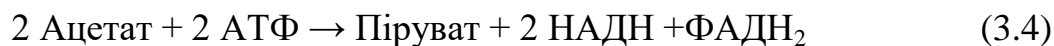
$$17 - 4 = 13 \text{ моль АТФ}$$

**Витрати енергії на синтез жирних кислот.** Відомо [139], що утворення вищих жирних кислот у вигляді відповідних ацил-КоА відбувається завдяки послідовній взаємодії з малоніл-КоА та подальшим декарбоксілюванням, що в кінцевому рахунку призводить до циклічного нарощуванню ацил-КоА на двовуглецевий фрагмент. На проведення одного такого циклу витрачається 1 моль АТФ. З *рис. 3.1* видно, що додатково 1 моль АТФ витрачається під час перетворення ацетату на ацетил-КоА.

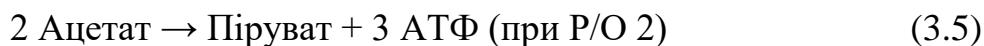
Таким чином, для одержання пальмітинової та лауринової кислот, які містять 16 та 12 атом вуглецю відповідно, необхідне проведення 7 та 5 циклів нарощування вуглецевого ланцюга. При цьому залучається 8 та 6 моль ацетил-КоА відповідно. Зважаючи на це, енерговитрати на синтез жирних кислот, що входять до складу повторюваної ланки АП, становлять:

$$(7 + 5) + (8 + 6) = 26 \text{ моль АТФ}$$

**Генерація енергії при синтезі пірувату.** Сумарну реакцію утворення піровиноградної кислоти з ацетату можна виразити наступним рівнянням:



або



Узагальнені дані щодо енергетичних потреб (рівняння 3.2-3.5) мікробного синтезу НАП і АП у перерахунку на моль використаного ацетату можна представити у вигляді таблиці (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Енергетичні потреби синтезу ацильованого та неацильованого полісахаридів з ацетату

ЕПС	Витрата ацетату на синтез ланки ЕПС, моль	Витрати енергії, моль АТФ		Генерація енергії, моль АТФ	
		На синтез ланки ЕПС	На моль використаного ацетату	На синтез ланки ЕПС	На моль використаного ацетату
НАП	18	17	0,94	7	0,39
АП	32	43	1,34	7	0,22
АП+НАП	50	60	1,20	14	0,28

Таким чином, загальна витрата енергії під час синтезу повторюваної ланки НАП і АП (НАП + АП) становить:

$$1,20 - 0,28 = 0,92 \text{ моль АТФ / моль ацетату}$$

На наступному етапі теоретичних розрахунків для визначення оптимальної концентрації енергетично надлишкового субстрату, тобто соняшникової олії, проводиться визначення енергії, яка генерується під час його катаболізму.

#### **Генерація енергії при катаболізмі лінолевої та олеїнової жирних кислот.**

Перетворення лінолевої ( $C_{17}H_{31}COOH$ ) та олеїнової ( $C_{17}H_{33}COOH$ ) жирних кислот на ФГК, проходить у декілька етапів [139] (рис. 3.2).

##### *1. Активація жирних кислот.*

Спочатку відбувається активація жирної кислоти, під час якої за допомогою ферменту ацил-КоА-синтетази вона перетворюється на відповідний ефір

коферменту А. При цьому виділяється АМФ і витрачається енергія двох макроергічних зв'язків.

## 2. $\beta$ -окиснення жирних кислот.

Утворений КоА-ефіру циклічно окиснюється по  $\beta$ -положенню, що супроводжується утворенням ацетил-КоА та відповідного скороченого на два вуглецевих атоми КоА-ефіру жирної кислоти, який піддається подальшому окисненню. У ході даного ряду реакцій відновлюється по 1 моль НАД і ФАД. Варто зазначити, що на ділянках з ненасиченими зв'язками ФАД не відновлюється, оскільки немає потреби в утворенні подвійного зв'язку.

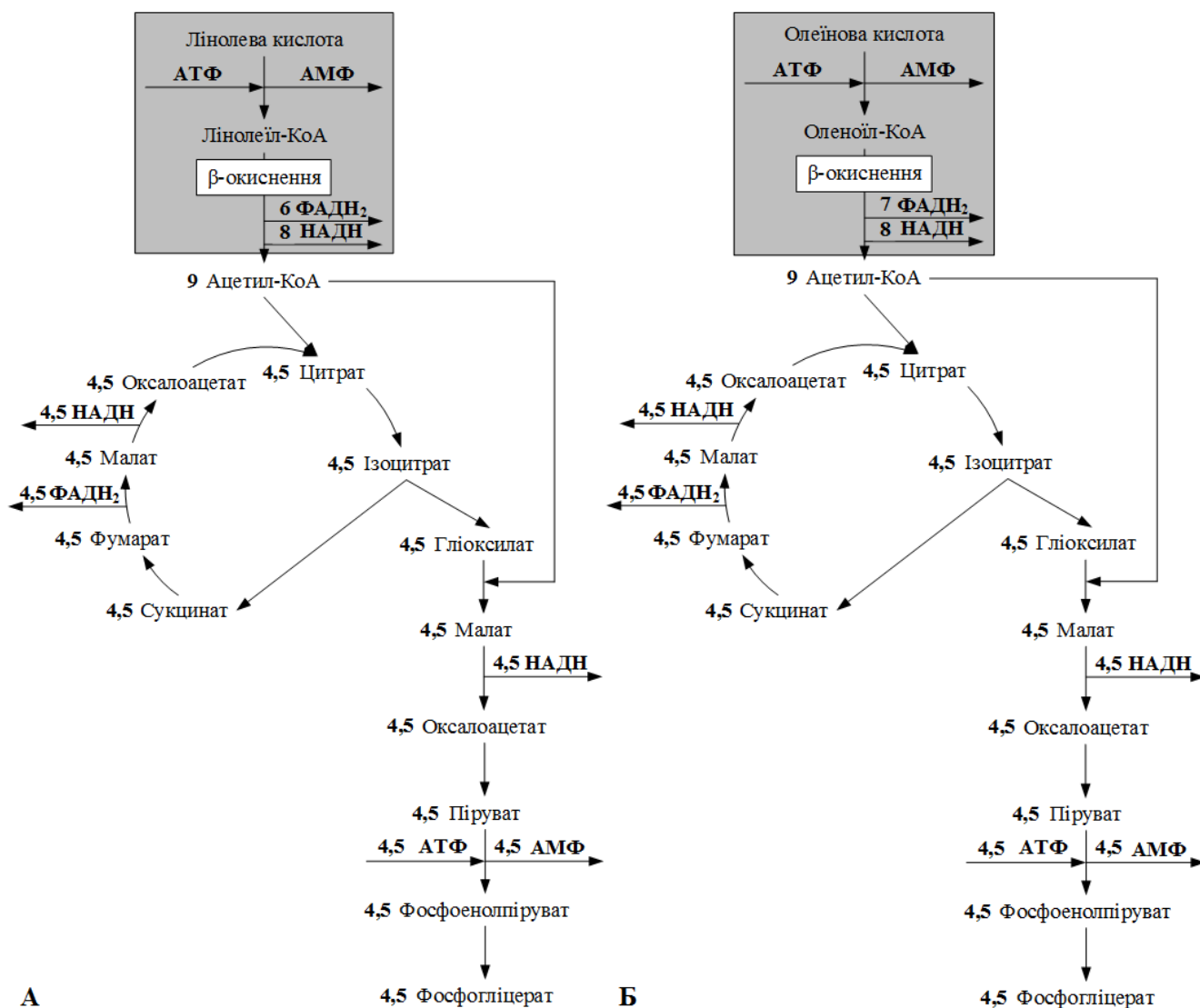


Рисунок 3.2 – Схеми перетворення лінолевої (А) та олеїнової (В) жирних кислот на ФГК (сірим кольором виділено літературні дані)

Кількість утворених ацетил-КоА, ФАДН і НАДН у процесі β-окиснення можна розрахувати за наступними формулами:

$$\text{Ацетил-КоА} = n/2, \quad (3.6)$$

де  $n$  – кількість атомів вуглецю у складі жирної кислоти;

$$\text{НАДН} = n/2 - 1; \quad (3.7)$$

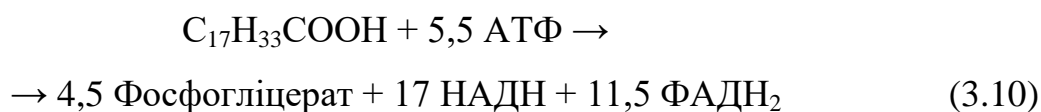
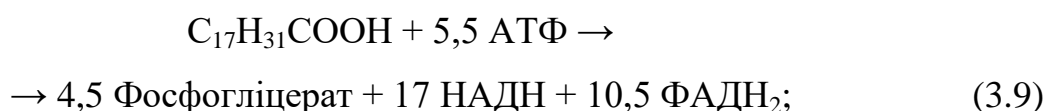
$$\text{ФАДН} = n/2 - 1 - m, \quad (3.8)$$

де  $m$  – кількість ненасичених зв'язків у жирній кислоті.

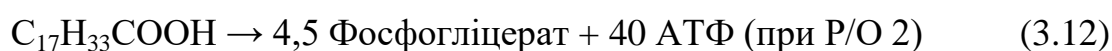
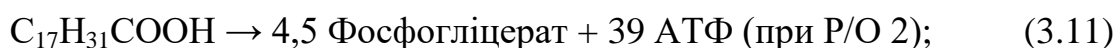
### 3. Синтез фосфогліцеринової кислоти з ацетил-КоА

На даному етапі у процесі глюконеогенезу відбувається синтез фосфогліцерату, під час якого утворюється НАДН і витрачається енергія АТФ.

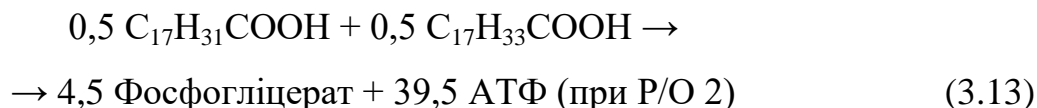
Беручи до уваги наведену вище інформацію, рівняння перетворення лінолевої та олеїнової кислот на фосфогліцеринову кислоту можна представити наступним чином:



або



Враховуючи припущення, що рафінована соняшникова олія містить 50 % лінолевої та 50 % олеїнової кислот, *рівняння 3.11 та 3.12* набуває наступного вигляду:



**Енергетичні витрати на синтез біомаси.** Згідно *рис. 3.1* сумарну реакцію перетворення ацетату на ФГК можна виразити наступними рівняннями:



або



Виходячи з рівняння синтезу біомаси з фосфогліцеринової кислоти (рівняння 3.1) та рівняння катаболізму ацетату до фосфогліцерату (рівняння 3.15), можна розрахувати, що при рості на ацетаті потреба в АТФ для синтезу біомаси (у розрахунку на моль ацетату) становить 4 моль. Припускаємо, що дану кількість енергії можна отримати з жирних кислот олії. Враховуючи, що під час синтезу полісахариду з ацетату витрачається 0,92 моль АТФ/ моль використаного ацетату, за рахунок олії необхідно сумарно отримати:

$$4 + 0,92 = 4,92 \text{ моль АТФ}$$

З рівняння 3.13 видно, що для покриття даної енергетичної потреби необхідно 0,13 моль жирних кислот олії.

Отже, теоретично розраховане оптимальне молярне співвідношення ацетату та рафінованої соняшникової олії при рості *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на їх суміші має становити 1:0,13.

Наприклад, за концентрації ацетату натрію 1 % (масова частка, 10 г/л, або 0,12 моль) концентрація соняшникової олії повинна бути 0,016 моль, або 4,5 г/л, або 0,5 % (об'ємна частка). Таким чином, співвідношення ацетату натрію (масова частка) та рафінованої соняшникової олії (об'ємна частка) в середовищі культивування штаму IMB B-7005 має становити 1,0:0,5, або 1,0:0,4 за використання ацетату калію.

**Експериментальна перевірка розрахованого оптимального молярного співвідношення концентрацій олії та ацетату у суміші.** Зважаючи на те, що теоретичні розрахунки неодмінно повинні супроводжуватись проведенням відповідних експериментальних досліджень, на наступному етапі роботи вивчали синтез етаполану за різних молярних співвідношень концентрацій соняшникової олії та ацетату у суміші. У даних експериментах інокулянт вирощували на моно- (олія, ацетат) та змішаному субстраті.

Оскільки раніше [203] при вирощуванні *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на суміші глюкози та ацетату було продемонстровано позитивний вплив катіонів  $\text{Na}^+$

на синтез етаполану, у даних дослідженнях у суміші з олією використовували ацетат натрію. Припускається, що катіони  $\text{Na}^+$  можуть використовуватися для генерації протонрушійної сили, яка є необхідною для активного транспорту даного субстрату у клітини продуцента [203].

Експерименти показали, що незалежно від природи джерела вуглецевого живлення у середовищі для одержання посівного матеріалу, максимальна концентрація цільового продукту (4,3-4,5 г/л) досягалася за теоретично розрахованого співвідношення моносубстратів у суміші (1:0,13) (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Синтез етаполану за різного молярного співвідношення концентрацій ацетату натрію та рафінованої соняшникової олії у суміші

Субстрат для одержання інокуляту, %	Концентрація субстратів у середовищі для біосинтезу, %		Молярне співвідношення ацетату та олії	$\text{pH}_{\text{кін}}$	Концентрація ЕПС, г/л
	ацетат натрію	олія			
Ацетат, 0,5	1,0	0,3	1:0,08	9,4	2,91±1,15
	1,0	0,5	1:0,13*	9,5	4,30±0,21
	1,0	0,7	1:0,18	9,5	4,00±0,20
Олія, 0,5	1,0	0,3	1:0,08	9,4	2,96±0,20
	1,0	0,5	1:0,13*	9,4	4,43±0,22
	1,0	0,7	1:0,18	9,4	3,69±0,18
Ацетат, 0,25, та олія, 0,25	1,0	0,3	1:0,08	9,5	2,34±0,12
	1,0	0,5	1:0,13*	9,5	4,49±0,22
	1,0	0,7	1:0,18	9,6	2,85±0,14
Ацетат, 0,5	2,2**	н/п	н/п	9,6	1,23±0,06
Олія, 0,5	н/п	0,9	н/п	7,4	1,10±0,06

**Примітки.** Вирощування інокуляту та біосинтез полісахариду здійснювали на середовищі 1. \* – теоретично розраховане оптимальне молярне співвідношення концентрації моносубстратів у суміші – 1:0,13; \*\* – концентрація моносубстратів

еквімолярна за вуглецем до суміші олії та ацетату при оптимальному молярному співвідношенні їх концентрації у суміші. н/п – не передбачено.

### **3.2. Оптимізація умов культивування продуцента для максимального синтезу етаполану на суміші ацетату та олії**

Дані, наведені у *табл. 3.2* свідчать про те, що незалежно від концентрації субстратів у суміші до кінця культивування рН культуральної рідини підвищується до 9,0-9,3, що є неоптимальним для синтезу етаполану (оптимум рН 7,0-8,0 [203]).

Варто зазначити, що надмірне залужнення середовища може призводити не лише до зниження показників синтезу ЕПС, але й погіршення його практично цінних властивостей. Так, у попередніх дослідженнях [203] продемонстровано, що одним з факторів впливу на реологічні властивості розчинів етаполану є значення рН. Зокрема при рН 9,0-9,5 спостерігалось різке зниження кінематичної в'язкості розчинів ЕПС, зумовлене дезацилюванням структурних ланок полісахариду.

Підвищення рН культуральної рідини при вирощуванні штаму ІМВ В-7005 на суміші олії та ацетату може бути зумовлено декількома причинами, зокрема, наявністю у суміші достатньо високої концентрації ацетату натрію (1,0 %), транспорт якого у клітини продуцента симпортом з протоном супроводжується підвищенням рН культуральної рідини [203].

Одним з підходів до запобігання надлишкового залужнення культуральної рідини являється використання джерела азоту, асиміляція якого відбувається антипортом з протоном та супроводжується підкисленням культуральної рідини. Для перевірки даного припущення здійснювали заміну  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,6 г/л) у середовищі культивування на еквімолярну за азотом концентрацію  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,8 г/л).

Результати показали, що незважаючи на незначне зниження рН культуральної рідини (на 0,2-0,3 одиниці) заміна джерела азотного живлення

супроводжувалася істотним зниження показників синтезу ЕПС у варіантах, де використовувався інокулят, вирощений на ацетаті натрію або суміші ацетату та олії (табл. 3.3). У той же час при використанні посівного матеріалу, вирощеного на олії, незалежно від використаного джерела азоту (табл. 3.2 та табл. 3.3) концентрація синтезованого етаполану була максимальною (4,2-4,4 г/л). Зважаючи на це у подальших експериментах посівний матеріал вирощували на рафінованій олії.

Незначний ефект від заміни джерела азотного живлення може зумовлюватися достатньо високою концентрацією у суміші ацетату натрію (1,0 %), споживання якого супроводжується істотним підвищенням рН культуральної рідини, яке не може бути компенсоване асиміляцією наявної у середовищі кількості  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . У той же час подальше підвищення концентрації джерела азотного живлення є недоцільним, оскільки при цьому буде зменшуватись співвідношення C/N, що зазвичай має негативний вплив на показники синтезу мікробних полісахаридів [16, 50].

Таблиця 3.3 – Синтез етаполану на середовищі з хлоридом амонію

Субстрат для одержання інокуляту, %	Концентрація субстратів у середовищі для біосинтезу, %		рН <sub>кін</sub>	Концентрація ЕПС, г/л
	ацетат натрію	олія		
Ацетат, 0,5	1,0	0,3	9,2	2,51±0,13
	1,0	0,5*	9,2	3,42±0,17
	1,0	0,7	9,3	2,98±0,15
Олія, 0,5	1,0	0,3	9,0	3,24±0,16
	1,0	0,5*	9,1	4,17±0,21
	1,0	0,7	9,2	3,66±0,18
Ацетат, 0,25, та олія, 0,25	1,0	0,3	9,2	1,71±0,09
	1,0	0,5*	9,2	2,35±0,12
	1,0	0,7	9,3	2,03±0,10

**Примітки.** Вирощування інокуляту та біосинтез полісахариду здійснювали на середовищі 4. \* – теоретично розраховане оптимальне молярне співвідношення концентрації моносубстратів у суміші – 1:0,13.

Зважаючи на зазначене для додаткового зниження рН культуральної рідини проводили пропорційне зменшення концентрації ацетату натрію та олії в середовищі культивування. З цією метою у подальших дослідженнях знижували вдвічі кількість моносубстратів у суміші, зберігаючи при цьому їх відповідні молярні співвідношення.

Встановлено, що за концентрації ацетату натрію у суміші 0,5 % рН культуральної рідини знижувалося і перебувало в межах 7,7-7,8 (табл. 3.4). Проте за даних умов культивування також спостерігалось неминуче зниження кількості синтезованого етаполану, яке хоча й було максимально можливим для даних концентрацій моносубстратів, але перебувало на дуже низькому рівні (2-2,7 г/л).

Таблиця 3.4 – Вплив концентрації олії та ацетату натрію у суміші на синтез етаполану

Концентрація субстратів у середовищі для біосинтезу, %		Молярне співвідношення ацетату та олії	рН <sub>кін</sub>	Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/ г біомаси
ацетат натрію	олія				
0,5	0,15	1:0,08	7,8	2,19±0,11	1,97±0,10
0,5	0,25	1:0,13*	7,7	2,30±0,17	2,69±0,13
0,5	0,35	1:0,18	7,7	2,23±0,11	1,68±0,09
0,5	0,45	1:0,23	7,8	2,27±0,11	1,31±0,07
0,5	0,55	1:0,28	7,8	2,70±0,14	1,22±0,06

**Примітки.** Вирощування інокуляту та біосинтез полісахариду здійснювали на середовищі 4. Інокулят вирощували на рафінованій соняшниковій олії. \* – теоретично розраховане оптимальне молярне співвідношення концентрації моносубстратів у суміші – 1:0,13.

Оскільки конкурентоспроможність технологій одержання практично цінних продуктів мікробного синтезу значною мірою залежить від концентрації цільового продукту, на наступному етапі досліджень штам ІМВ В-7005 вирощували на підвищеній концентрації олії і ацетату натрію (0,5 та 1,0 % відповідно) на модифікованих середовищах 5-8 зі зниженим вмістом лужної складової (див. *Розділ 2*).

Встановлено, що виключення з базового поживного середовища КОН та зменшення вдвічі (до 3,4 г/л) концентрації  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , супроводжувалось зниженням рН культуральної рідини до оптимального для синтезу ЕПС рівня (7,8-7,9). При цьому показники синтезу етаполану (концентрація ЕПС становила 4,7 г/л, ЕПС-синтезувальна здатність досягала 2 г ЕПС/ г біомаси) були максимально можливими для даної концентрації моносубстратів, проте все одно залишалися нижчими порівняно з показниками на інших змішаних субстратах, зокрема суміші глюкози (меяси) та ацетату [203].

Таблиця 3.4 – Показники синтезу ЕПС на суміші олії (0,5 %) та ацетату натрію (1,0 %) на середовищах з різним вмістом лужної складової

Середовище культивування	$\text{pH}_{\text{кін}}$	Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г біомаси
4 (контроль)	9,1	4,17±0,21	1,70±0,09
5	8,9	4,28±0,21	1,75±0,09
6	8,2	4,51±0,23	1,88±0,09
7	7,8	4,70±0,24	2,00±0,10
8	6,9	3,01±0,15	0,89±0,04

**Примітки.** Інокулят вирощували на рафінованій соняшниковій олії.

Очевидно, що для подальшої інтенсифікації синтезу етаполану необхідно збільшувати вміст моносубстратів у суміші з одночасною підтримкою рН на оптимальному для утворення ЕПС рівні. Для цього можна використати підходи, які були успішно реалізовані у попередніх дослідженнях з синтезу етаполану на

суміші меляси та ацетату натрію [203]. Так, продемонстровано, що дробне внесення субстратів супроводжувалось підвищенням ЕПС-синтезувальної здатності на 15-45 %, а підтримання значень культуральної рідини на рівні 7,0 призводило до зростання концентрації синтезованого полісахариду на 16-25 %. У той же час було встановлено, що використання HCl для підтримання рН культуральної рідини супроводжувалось накопиченням значної кількості NaCl та, як наслідок, зниженням в'язкості розчинів етаполану [200]. Дану проблему було усунуто завдяки заміні HCl на водорозчинні органічні кислоти, які є інтермедіатами циклу Кребса (лимонна, бурштинова та щавлева).

Варто зазначити, що окрім регуляції рН даний підхід може бути використаний для інтенсифікації синтезу етаполану за рахунок залучення цих кислот до циклу Кребса-Корнберга та глюконеогенезу. Так, використання органічних кислот для нейтралізації рН при рості штаму ІМВ В-7005 на середовищі з мелясою та ацетатом натрію дозволило підвищити показники синтезу ЕПС на 20-26 % у порівнянні з вирощуванням продуцента на середовищі без регуляції рН [200].

Оскільки транспортні системи штаму ІМВ В-7005 є пристосованими до асиміляції ацетату, для регуляції рН також можна використовувати оцтову кислоту. Показано, що незалежно від концентрації меляси та ацетату натрію у суміші підкислення середовища оцтовою кислотою супроводжувалось підвищенням концентрації етаполану у 1,5 рази [200].

Зважаючи на зазначене, у наступних експериментах досліджували особливості синтезу етаполану на суміші ацетату натрію та рафінованої соняшникової олії при дробному внесенні субстратів.

Експерименти показали, що зниження початкової концентрації моносубстратів у суміші до 1/3 від їхнього загального вмісту з наступним дробним внесенням 3-х порцій субстратів у процесі вирощування продуцента до кінцевої концентрації олії 0,75-1,5 % та ацетату натрію 1,5-3,0 % дало змогу підтримати рН культуральної рідини впродовж культивування на рівні 6,4-7,8 і

підвищити показники синтезу ЕПС порівняно з одноразовим внесенням відповідної концентрації субстратів (див. *табл. 3.5*).

Зазначимо, що після внесення другої порції 1,0 % ацетату натрію та 0,5 % рафінованої олії рН культуральної рідини підвищувалось до 8,0-8,2. Зважаючи на це у третій порції субстратів ацетат натрію замінювали на еквімолярну за вуглецем кількість оцтової кислоти. Такий підхід дав змогу не лише стабілізувати рН культуральної рідини на оптимальному для синтезу етаполану рівні, а й супроводжувався додатковим підвищенням концентрації синтезованого полісахариду у 1,25 рази (до 17,27 г/л, див. *табл. 3.5*).

Таблиця 3.5 – Вплив дробного внесення субстратів на біосинтез етаполану на суміші олії та ацетату натрію

Концентрація моносубстратів у суміші, %	Режим дробного внесення субстратів, %	pH <sub>кін</sub>	Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/ г біомаси
Ацетат, 1,5 та рафінована олія, 0,75	Без дробного внесення (контроль)	8,7	4,02±0,20	1,07±0,05
	Тричі порціями по 0,5 % ацетату і 0,25 % олії	6,4	5,67±0,28	2,00±0,10
Ацетат, 3,0 та рафінована олія, 1,5	Без дробного внесення (контроль)	9,5	2,84±0,14	0,68±0,03
	Тричі порціями по 1,0 % ацетату і 0,5 % олії	7,8	13,82±0,69	4,53±0,23
	Двічі порціями по 1,0 % ацетату і 0,5 % олії, третя порція: 0,35 % оцтової кислоти і 0,5 % олії	7,9	17,27±0,86	6,47±0,32

**Примітки:** Вирощування інокуляту та біосинтез полісахариду здійснювали на середовищі 7. Інокулят вирощували на рафінованій соняшниковій олії. Дробне внесення субстратів здійснювали через кожні 24 год.

### **Висновки до Розділу 3**

Найвищі показники синтезу етаполану спостерігались за молярного співвідношення концентрацій ацетату та олії у суміші 1,0:0,13, що співпадає з теоретично розрахованим.

Встановлено, що при рості *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на середовищі з олії та ацетатом натрію, внаслідок транспортування останнього симпортом з протоном, спостерігалось підвищення рН культуральної рідини до рівня, неоптимального для синтезу ЕПС (до 9,5).

Для запобігання надмірному підлужненню культуральної рідини та забезпечення максимального ступеню трансформації вуглецю обох субстратів в етаполан модифікували склад поживного середовища (заміняли  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,6 г/л) на  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,8 г/л), зменшували до 3,4 г/л вміст  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  та виключали зі складу  $\text{KOH}$ ) та здійснювали дробне внесення змішаного субстрату трьома порціями впродовж культивування.

За таких умов культивування концентрація етаполану та ЕПС-синтезувальна здатність при рості бактерій на суміші рафінованої олії (1,5 %) та ацетату натрію (3,0 %) становила 17,27 г/л та 6,47 г ЕПС/ г біомаси відповідно.

## РОЗДІЛ 4. БІОСИНТЕЗ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ ЕНЕРГЕТИЧНО НАДЛИШКОВИХ СУБСТРАТІВ

Варто зазначити, що згідно класичної концепції допоміжного субстрату Бабеля використання суміші двох енергетично надлишкових субстратів не передбачається [14]. У той же час наявні відомості, в яких продемонстровано можливість одночасного використання обох таких субстратів суміші в енергетичному та конструктивному метаболізмі [39, 203].

Зважаючи на це, ми припустили про можливість використання суміші двох енергетично надлишкових субстратів для інтенсифікації синтезу екзополісахариду (ЕПС) етаполану. Як субстрати для проведення досліджень було обрано соняшникову олію та етанол, при рості на якому раніше спостерігали високі показники синтезу етаполану штамом *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 [203].

### 4.1. Розрахунок оптимального молярного співвідношення рафінованої соняшnikової олії та етанолу у суміші

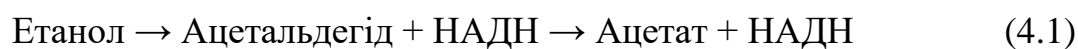
Оскільки під час метаболізму енергетично надлишкових субстратів до фосфогліцерату утворюється достатня для синтезу клітинних компонентів кількість АТФ і відновлювальних еквівалентів методологія проведення розрахунків при культивуванні на даній суміші дещо відрізняється від описаної для суміші енергетично нерівноцінних (див. *Підрозділ 2.2.* та *Розділ 3*) або дефіцитних субстратів [203].

Основні відмінності полягають у необхідності розрахунку генерації енергії при синтезі ЕПС з кожного субстрату та подальшого визначення її розподілу, який має місце після синтезу біомаси.

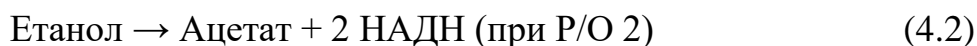
Згідно даного підходу передбачається, що жирні кислоти соняшnikової олії та етанол будуть використовуватися не тільки для забезпечення енергетичних потреб, але й залучатимуться до конструктивного метаболізму. Зважаючи на це під час проведення розрахунків додатково припускали, що частина ліноленової та олеїнової жирних кислот може без значних перетворень використовуватися для етерифікації вуглеводного ланцюга ЕПС. Таким чином, при проведенні вихідних

розрахунків приймали, що після синтезу біомасу з етанолу буде генеруватися 75 %, а з жирних кислот олії – 25 % від загальної кількості енергії. Інші припущення були ідентичними до зазначених у *Підрозділі 2.2*.

**Генерація енергії при синтезі полісахариду з етанолу та жирних кислот олії.** Починаючи з залучення ацетату до циклу трикарбонових кислот схема синтезу повторюваної ланки ЕПС з етанолу є аналогічною до наведеної на *рис. 3.1*. Перетворення етанолу на ацетат, яке відбувається в результаті двох послідовних реакцій окиснення, в кожній з яких генерується по 1 моль НАДН, можна представити наступними рівняннями:



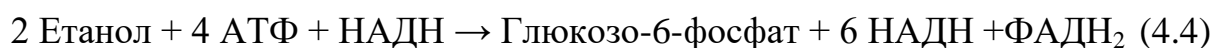
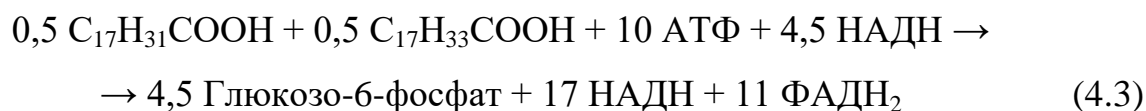
або



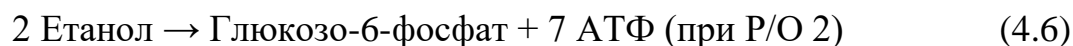
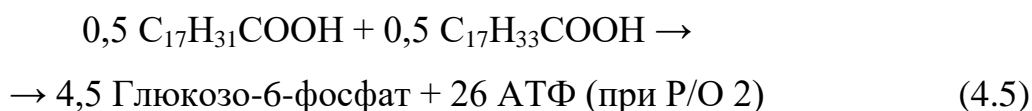
Таким чином, під час отримання 2 моль ацетату з 2 моль етанолу додатково утворюється 4 моль НАДН, що еквівалентно 8 моль АТФ (при Р/О 2).

Зважаючи на зазначене та схеми, наведені на *рис. 4.1*, *рис. 4.2* та *рис. 3.1*, можна розрахувати кількість енергії, що генерується при синтезі повторюваної ланки ЕПС з жирних кислот олії та етанолу.

**Синтез моносахаридів.** Рівняння перетворення енергетично надлишкових субстратів суміші на фосфорильовані вуглеводи (глюкозо-6-фосфату та фруктозо-6-фосфату) можна виразити наступним чином:



або відповідно



Зважаючи на додаткову генерацію енергії при синтезі глюкуронової кислоти та її витрати під час перетворення фосфорильованих похідних на

нуклеозиддифосфатсахариди та полімеризацію повторюваної ланки етаполану під час синтезу моносахаридів з жирних кислот олії ( $1,78 \times 26 + 4 - 8 - 1$ ) та етанолу ( $7 \times 8 + 4 - 8 - 1$ ) утворюється 41,28 та 51 моль АТФ відповідно.

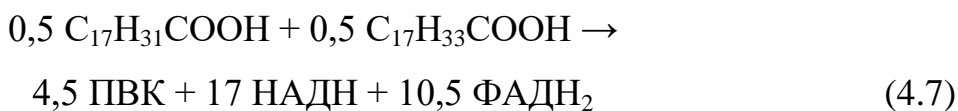
**Синтез жирних кислот.** На відміну від ацетату синтез ацетил-КоА з етанолу супроводжується генерацією 3 моль АТФ. Таким чином, у процесі циклічного нарощування вуглецевого ланцюга, необхідного для утворення пальмітинової та лауринової жирних кислот при рості на етанолі, генерується:

$$(7 + 5) - (8 \times 3 + 6 \times 3) = 29 \text{ моль АТФ}$$

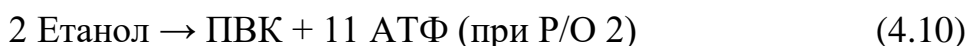
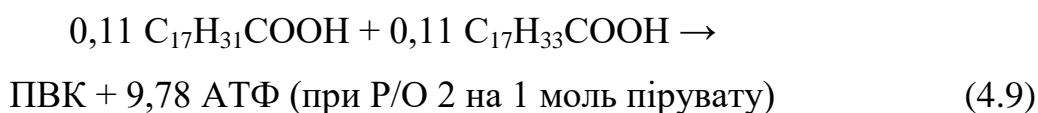
Зважаючи на те, що вуглецевий скелет лінолевої та олеїнової жирних кислот, що входять до складу соняшникової олії, містить на 1 та 5 атомів вуглецю менше ніж пальмітинова та лауринова кислоти відповідно, якими ацильований полісахарид етаполан, синтез останніх відбувається у процесі  $\beta$ -окиснення енергетично надлишкового субстрату. Даний процес супроводжується генерацією наступної кількості енергії:

$$(2 + 1) + 3 \times (2 + 1) = 12 \text{ моль АТФ.}$$

**Синтез пірувату.** Сумарні реакції перетворення жирних кислот олії та етанолу на пірвіноградну кислоти можна представити у вигляді наступних рівнянь:



або відповідно



Узагальнені дані щодо синтезу повторюваної ланки етаполану з жирних кислот олії та етанолу наведено в *табл. 4.1* та *табл. 4.2*.

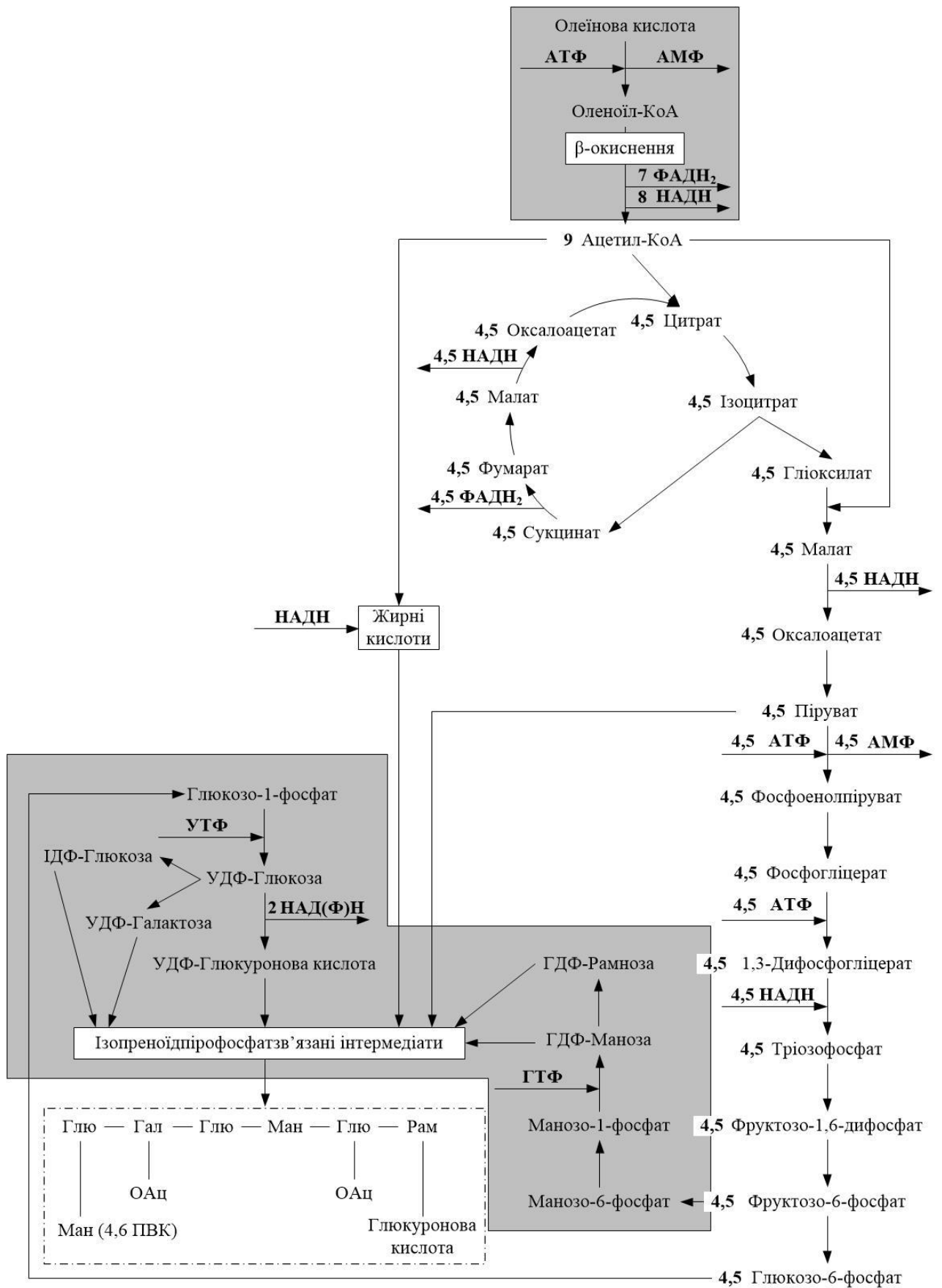


Рисунок 4.1 – Схема синтезу повторювальної ланки етаполану з олеїнової кислоти (сірим кольором виділено літературні дані)

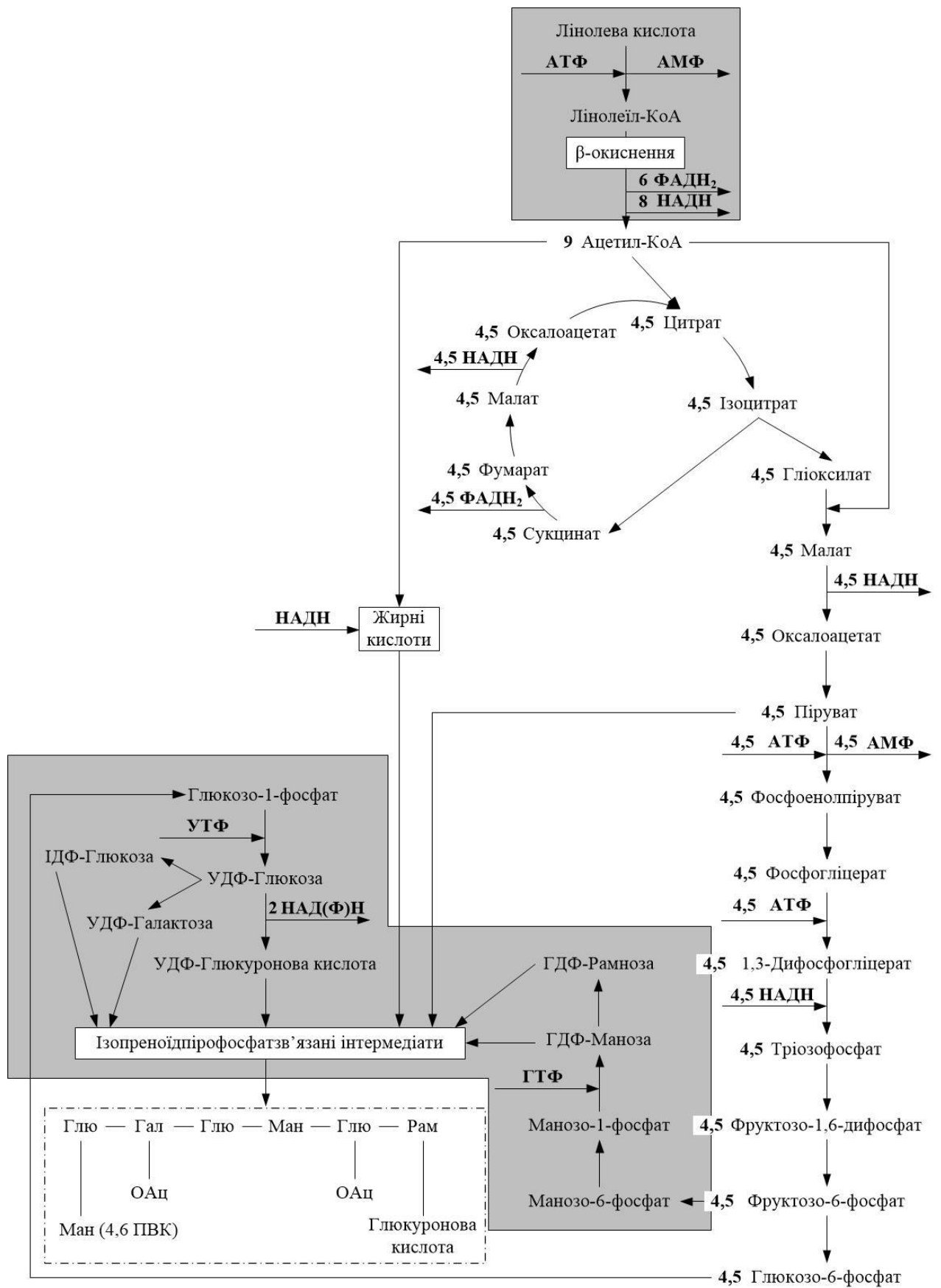


Рисунок 4.2 – Схема синтезу повторювальної ланки етаполану з лінолевої кислоти (сірим кольором виділено літературні дані)

Таблиця 4.1 – Генерація енергії при синтезі складових частин ЕПС з соняшникової олії та етанолу

Субстрат для синтезу ЕПС	Етап	Витрата субстрату на синтез ланки ЕПС, моль	Генерація АТФ, моль
Соняшникова олія	Синтез моносахаридів	1,78	41,28
	Синтез жирних кислот	2,00	12,00
	Синтез пірувату	0,22	9,78
Етанол	Синтез моносахаридів	16,00	51,00
	Синтез жирних кислот	14,00	29,00
	Синтез пірувату	2,00	11,00

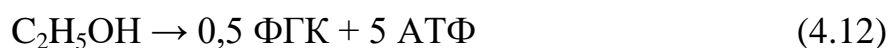
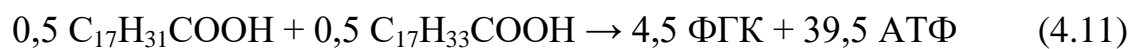
Таблиця 4.2 – Генерація енергії при утворені повторюваної ланки неацильованого (НАП) та ацильованого полісахариду (АП) з соняшникової олії та етанолу

Субстрат для синтезу ЕПС	ЕПС	Витрата субстрату на синтез ланки ЕПС, моль	Генерація енергії, моль АТФ	
			На синтез ланки ЕПС	На моль використаного субстрату
Соняшникова олія	НАП	2	51,06	25,53
	АП	4	63,06	15,77
	АП+НАП	6	114,12	19,02
Етанол	НАП	18	62	3,40
	АП	32	91	2,84
	АП+НАП	50	152	3,04

Таким чином, загальна генерація енергії під час синтезу повторюваної ланки НАП і АП (НАП + АП) з соняшникової олії та етанолу становить:

$$3,04 + 19,02 = 22,06 \text{ моль АТФ/ моль субстрату}$$

**Розподіл енергії після синтезу біомаси.** Згідно з розрахунками, викладеними у роботі [203] та *Розділі 3*, генерація енергії при перетворенні жирних кислот олії та етанолу до фосфогліцеринової кислоти становить 39,5 та 5,0 моль АТФ / моль використаного субстрату відповідно:



Виходячи з рівняння синтезу біомаси з центрального вуглецевого попередника (*рівняння 3.1*) та рівнянь катаболізму жирних кислот олії та етанолу до фосфогліцерату (*рівняння 4.11 та 4.12*), а також відомостей, наведених у *табл. 4.2*, можна розрахувати, що у процесі росту на даних змішаних субстратах після синтезу біомаси та ЕПС (у розрахунку на моль субстрату) залишається 13,52 та 3,04 моль АТФ відповідно, або 16,56 моль АТФ сумарно.

Зважаючи на припущення, що з етанолу та олії генерується 75 % та 25 % надлишкової енергії, відповідно, для генерації 16,56 моль АТФ необхідно 4,09 моль етанолу та 0,31 моль соняшникової олії, що відповідає молярному співвідношенню 1:0,076.

Наприклад, за концентрації етанолу 1 % (об'ємна частка 10 мл/л або 8 г/л, 0,174 моль) концентрація олії має становити 0,013 моль, або 3,66 г, або 3,98 мл, або 0,4 %.

#### **4.2. Дослідження можливості синтезу етаполану на суміші енергетично надлишкових субстратів**

На наступному етапі роботи досліджували принципову можливість використання суміші рафінованої соняшникової олії та етанолу для отримання полісахариду етаполану при теоретично розрахованому молярному співвідношенні їх концентрацій.

Встановлено, що незалежно від способу підготовки посівного матеріалу показники синтезу ЕПС були у 1,3-2,1 рази вищими за результати, отримані на відповідних моносубстратах (*табл. 4.3*). У подальших дослідженнях інокулят

вирощували на етанолі, оскільки при його використанні концентрація цільового продукту була максимальною (3,18 г/л).

Таблиця 4.3 – Синтез етаполану залежно від способу підготовки інокуляту

Концентрація субстратів у середовищі для біосинтезу ЕПС, %		Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г біомаси
одержання інокуляту, %			
Олія, 0,4 та етанол, 1,0*	Етанол, 0,5	3,18±0,16	1,85±0,09
	Олія, 0,5	2,14±0,11	1,39±0,07
	Олія 0,25 та етанол, 0,25	2,00±0,10	0,84±0,04
Олія, 1,0**	Олія, 0,5	1,63±0,08	1,10±0,06
Етанол, 1,7**	Етанол, 0,5	1,49±0,07	0,93±0,05

**Примітка.** Вирощування посівного матеріалу та біосинтез етаполану здійснювали на середовищі 1. \* – теоретично розраховане оптимальне молярне співвідношення концентрації моносубстратів у суміші – 1:0,076; \*\* – концентрація моносубстратів еквімолярна за вуглецем до суміші олії та етанолу при оптимальному молярному співвідношенні їх концентрації у суміші.

Експерименти показали, що найвищі показники синтезу етаполану (кількість синтезованого етаполану становила 4,2 г/л, ЕПС-синтезувальна здатність досягала 2,0 г ЕПС/ г біомаси) спостерігалися за молярного співвідношення моносубстратів у суміші 1:0,056, максимально наближеного до теоретично розрахованого (1:0,076) (див. *табл. 4.4*). На нашу думку, дане відхилення від теоретичного співвідношення зумовлене нерівномірним використанням кожного субстрату до біосинтетичних процесів та енергетичного метаболізму, зокрема залученням меншої частини жирних кислот олії до безпосередньої етерифікації полісахариду.

Таблиця 4.4 – Вплив молярного співвідношення рафінованої олії та етанолу у суміші на показники синтезу етаполану

Концентрація субстратів у середовищі для біосинтезу, %		Молярне співвідношення етанолу та олії	Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г біомаси
етанол	олія			
1,0	0,2	1:0,036	2,10±0,11	0,49±0,02
1,0	0,3	1:0,056	4,23±0,21	2,00±0,10
1,0	0,4	1:0,076*	3,18±0,16	1,85±0,09
1,0	0,5	1:0,096	2,94±0,15	1,20±0,06
1,0	0,6	1:0,116	2,67±0,13	0,79±0,04

**Примітка.** Вирощування посівного матеріалу та біосинтез етаполану здійснювали на середовищі 1. Інокулят вирощували на етанолі. \* – теоретично розраховане оптимальне молярне співвідношення концентрації моносубстратів у суміші – 1:0,076.

#### 4.3. Інтенсифікація синтезу полісахариду на суміші рафінованої соняшникової олії та етанолу

Одним з важливих показників ефективності технологій отримання практично цінних мікробних метаболітів, який безпосередньо впливає на можливість їх промислового впровадження, є концентрація цільового продукту [137].

Варто зазначити, що показники синтезу ЕПС на змішаних субстратах залежать не тільки від дотримання оптимального молярного співвідношення їх концентрації у суміші, але й від загальної концентрації моносубстратів у суміші.

Зважаючи на це на наступному етапі досліджували біосинтез етаполану при підвищених концентраціях енергетично надлишкових субстратів у суміші.

Експерименти показали, що збільшення концентрацій етанолу та олії у суміші вдвічі до 2,0 % та 0,6 %, відповідно, призводило до підвищення кількості

синтезованого полісахариду у 1,2 рази, проте супроводжувалося зниженням рН культуральної рідини з 7,2 до 5,5, при оптимумі для накопичення етаполану 7,0-8,0 [203]. Подальше підвищення концентрації етанолу (3,0-4,0 %) та олії (0,9-1,2 %) в середовищі культивування призводило до різкого зниження показників синтезу цільового продукту (кількість синтезованого етаполану становила 1,9-2,4 г/л, ЕПС-синтезувальна здатність досягала 1,0 г ЕПС/ г біомаси) та рН культуральної рідини до 4,5-4,8.

Дане зниження рН може бути зумовлено декількома причинами, зокрема особливостями асиміляції ацетату та лімітуванням його метаболізму внаслідок низької активності ацетил-КоА-синтетази, яка каталізує асиміляцію ацетату у *Acinetobacter* IMB В-7005 [203]. Для вирішення даної проблеми замінювали джерело азотного живлення (0,6 г/л  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) у середовищі культивування бактерій на еквімолярну за нітрогеном концентрацію  $\text{KNO}_3$  (1,5 г/л), асиміляція якого відбувається симпортом з протоном і супроводжується підвищенням рН культуральної рідини, а також здійснювали дробне внесення субстратів.

Встановлено, що при заміні джерела азоту на  $\text{KNO}_3$  незалежно від режиму дробного внесення субстратів рН культуральної рідини впродовж культивування підтримувалося на допустимому для отримання полісахариду рівні (табл. 4.5). При цьому найвищі показники синтезу етаполану (концентрація ЕПС становила 13,5 г/л, а ЕПС-синтезувальна здатність досягала 3,5 г ЕПС/ г біомаси) спостерігалися при зниженні початкової концентрації моносубстратів у суміші до 1/5 від їхнього загального вмісту з наступним дробним внесенням у процесі вирощування продуцента до кінцевої концентрації олії 1,2 % та етанолу 4,0 %.

Таблиця 4.5 – Вплив заміни джерела азоту та дробного внесення субстратів на біосинтез етаполану на суміші рафінованої олії та етанолу

Джерело азоту	Концентрація моно-субстратів у суміші, %	Режим дробного внесення субстратів*	pH <sub>кін</sub>	Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г біомаси
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (середовище 1)	Олія, 0,6, та етанол, 2,0	Без дробного внесення (контроль)	5,5	5,01±0,25	1,95±0,10
		Дві порції по 0,3 % олії та 1,0 % етанолу	5,6	8,02±0,40	1,81±0,09
		Три порції по 0,2 % олії та 0,66 % етанолу	5,4	9,45±0,47	2,65±0,13
	Олія, 1,2, та етанол, 4,0	Дві порції по 0,6 % олії та 2,0 % етанолу	5,1	6,82±0,34	1,40±0,07
		Три порції по 0,4 % олії та 1,33 % етанолу	5,2	8,07±0,40	1,25±0,06
		Без дробного внесення (контроль)	7,0	5,16±0,26	1,52±0,08
KNO <sub>3</sub> (середовище 10)	Олія, 0,6, та етанол, 2,0	Дві порції по 0,3 % олії та 1,0 % етанолу	6,4	9,27±0,46	2,10±0,11
		Три порції по 0,2 % олії та 0,66 % етанолу	6,6	8,36±0,42	2,17±0,11
		Без дробного внесення (контроль)	7,0	5,16±0,26	1,52±0,08
	Олія, 1,2, та етанол, 4,0	Дві порції по 0,6 % олії та 2,0 % етанолу	5,7	7,45±0,37	1,18±0,06
		Три порції по 0,4 % олії та 1,33 % етанолу	5,9	11,38±0,57	1,59±0,08
		Чотири порції по	5,9	11,88±0,59	3,08±0,15

Джерело азоту	Концентрація моно-субстратів у суміші, %	Режим дробного внесення субстратів*	$pH_{кін}$	Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/ г біомаси
		0,3 % олії та 1,0 % етанолу			
		П'ять порцій по 0,24 % олії та 0,8 % етанолу	6,0	13,51±0,68	3,65±0,18

**Примітка.** Посівний матеріал вирощували на етанолі. Дробне внесення субстратів здійснювали порціями через кожні 24 год.

#### Висновки до розділу 4

В результаті проведення теоретичних розрахунків та відповідних експериментальних досліджень встановлено, що найвищі показники синтезу етаполану спостерігались за молярного співвідношення концентрацій етанолу та рафінованої соняшникової олії у суміші 1:0,056, максимально наближеного до теоретично розрахованого (1:0,076).

Для уникнення закислення культуральної рідини, яке спостерігається при рості штаму ІМВ В-7005 на середовищі з підвищеною концентрацією олії (1,2 %) та етанолу (4 %), проводили заміну джерела мінерального азотного живлення (0,6 г/л  $NH_4NO_3$ ) на  $KNO_3$  (0,8 г/л) та здійснювали дробне внесення субстратів п'ятьма рівними порціями впродовж культивування.

При цьому концентрація етаполану досягала 13,5 г/л, а ЕПС-синтезувальна здатність становила 3,7 г ЕПС/ г біомаси.

## РОЗДІЛ 5. УТВОРЕННЯ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ ВІДПРАЦЬОВАНОЇ СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ ТА C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-СУБСТРАТИВ

Потенціал промислового впровадження нових та вже відомих екзополісахаридів (ЕПС) значною мірою залежить від їхньої собівартості – вона повинна бути мінімальною [52].

Основними шляхами вирішення даних проблем є:

1) забезпечення максимального підвищення ефективності конверсії субстрату у цільовий продукт завдяки проведенню загальної оптимізації умов (процесу) культивування (див. *Підрозділ 1.1*), використанню змішаних субстратів (див. *Розділ 3* та *Розділ 4*) та покращенню штамів-продуцентів методами метаболічної та генетичної інженерії (див. *Підрозділ 1.2*);

2) використання альтернативних дешевих субстратів замість класичної дорогої вуглеводної сировини (див. *Підрозділ 1.3*). Варто зазначити, що у біотехнологічних процесах майже половина кінцевої вартості цільового продукту може залежати від витрат на джерело вуглецю [32, 86, 113].

Одним з перспективних альтернативних субстратів для одержання продуктів мікробного синтезу, зокрема полісахаридів, є відпрацьована рослинна олія (соняшникова, оливкова, кукурудзяна тощо), яка внаслідок своєї токсичності (містить у своєму складі канцерогенні речовини, токсичні хімічні сполуки тощо [67, 84]) не може повторно використовуватися в харчовій промисловості (приготування продуктів харчування, виробництво харчових добавок) та сільському господарстві (відгодівля худоби, виробництво кормових добавок) [128].

Значні світові обсяги генерації даного відходу (15-16,5 млн т на рік) та наявність жорсткої регуляції його викидів лише у розвинутих країнах (Сполучені Штати Америки, Японія, країни Європейського Союзу та ін.) робить пошук шляхів ефективної утилізації та переробки пересмаженої рослинної олії однією з нагальних проблем сьогодення [91, 97, 98].

Незважаючи на те, що частина відпрацьованої олії збирається та переробляється на біодизель [55, 111] переважна кількість все ще неконтрольовано зливається в каналізацію, що призводить до ряду економічних (значною мірою підвищує витрати на очищення води, забрудненої олією; призводить до блокування зливів та швидкого зношування трубопроводів) та екологічних (1 л відпрацьованої олії може забруднити до 500 тис. л води) проблем [91, 128].

У той же час пересмажена олія може використовуватися для отримання пластифікаторів, біогазу, мила, зв'язувальних речовин, лубрикантів, піролітичної олії та генерації електроенергії тощо [97, 99, 100, 123, 128]. Основним недоліком даних підходів є необхідність проведення стадій попередньої очистки та обробки відпрацьованої олії, що значною мірою знижує загальну рентабельність процесу. Ще одним перспективним способом переробки даного відходу є його використання в біотехнології як субстрату для одержання практично цінних продуктів мікробного синтезу (поверхнево-активних речовин, біоемульгаторів, полігідроксиалканоатів, ліпаз та інших ферментів, органічних кислот, вітамінів тощо) [79, 92, 128].

Варто зазначити, що на сьогоднішній день інформація про використання олієвмісних субстратів для отримання мікробних ЕПС є досить обмеженою, а в наявних даних концентрація цільового продукту не перевищує декількох грам на літр [2, 31, 76, 124, 156, 161].

У той же час завдяки значним емульгувальним властивостям та структурним особливостям етаполану (містить залишки пальмітинової, олеїнової, пальмітолеїнової, лауринової та стеаринової кислот [203]) вдалося розширити сировинну базу для його виробництва за рахунок використання олієвмісної сировини (рафінована та різні типи відпрацьованої соняшникової, кукурудзяної, оливкової, ріпакової олії, та їх суміші). При цьому концентрація цільового продукту досягала до 14 г/л [71].

## 5.1. Вплив типу відпрацьованої олії у суміші з мелясою на синтез полісахариду

Одним з перспективних субстратів для синтезу етаполану є суміш меляси (побічний продукт цукрового виробництва) та рафінованої соняшникової олії. Так, у попередніх дослідженнях [131] продемонстровано можливість синтезу 10 г/л полісахариду при рості *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші олії (об'ємна частка 1,5 %) та меляси (масова частка 1,5 % за вуглеводами). При цьому молярне співвідношення моносубстратів у суміші становило 1,1:1, що було максимально наближеним до теоретично розрахованого (1:0,9). Методологія проведення розрахунку була аналогічною до наведеної в *Розділі 3* для суміші енергетично нерівноцінних субстратів.

Для додаткового зниження собівартості джерела вуглецю та енергії досліджували можливість заміни рафінованої олії у змішаному субстраті з мелясою на різні типи відпрацьованої (після смаження картоплі, м'яса, овочів та змішану після смаження різних продуктів). У даних дослідженнях посівний матеріал вирощували на відповідній відпрацьованій олії, оскільки вона не потребує стерилізації та має нижчу вартість ніж меляса.

Експерименти показали, що після заміни олії спостерігалось незначене підвищення концентрації синтезованого етаполану (10-14 г/л) у порівнянні з результатами, отриманими при використанні рафінованого субстрату (10 г/л) (*табл. 5.1*). Варто зазначити, що з практичної та економічної точки зору для вирощування інокуляту та біосинтезу полісахариду найбільш доцільним є використання змішаної відпрацьованої олії після смаження різних продуктів, оскільки перед відправкою на утилізацію різні типи олії зазвичай змішують.

Оскільки у *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 ферментні системи, задіяні у розкладанні сахарози, функціонують з низькою активністю перед використанням меляси проводили її попередній гідроліз [203]. Під час даного процесу рН субстрату знижувалось до 4,0-4,5, що призводило до зниження початкового

значення рН середовища культивування до 5,8-6,0, що є неоптимальним для росту продуцента та біосинтезу полісахариду.

Таблиця 5.1 – Вплив типу відпрацьованої олії (1,5 %) у суміші з мелясою (1,5 %) на синтез етаполану

Олія у суміші з мелясою	Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/ г біомаси
Рафінована (контроль)	10,09±0,50	3,60±0,18
Відпрацьована після смаження картоплі «фрі»	11,06±0,55	2,61±0,13
Відпрацьована після смаження картоплі по-селянськи	11,66±0,58	2,69±0,13
Відпрацьована після смаження м'яса	12,41±0,62	3,42±0,17
Відпрацьована після смаження овочів	9,94±0,50	2,95±0,15
Змішана відпрацьована після смаження різних продуктів	13,92±0,70	3,49±0,17

**Примітка.** Вирощування посівного матеріалу здійснювали на середовищі 2, біосинтез етаполану – на середовищі 3. Інокулят вирощували на відповідній відпрацьованій олії.

Раніше встановлено, що використання нейтралізованої після гідролізу меляси у суміші з ацетатом або етанолом призводило не лише до уникнення надмірного зниження початкового рН культуральної рідини, але й супроводжувалося додатковим підвищенням показників синтезу етаполану [203].

Зважаючи на це додатково досліджували вплив способу підготовки меляси на синтез етаполану про рості штаму ІМВ В-7005 на відповідній суміші з відпрацьованою олією.

Експерименти показали, що незалежно від вмісту рафінованої олії та нейтралізованої меляси у суміші (1,5-3,0 %) кількість синтезованого полісахариду була на 20-30 % вищою, ніж за використання звичайної гідролізованої меляси (табл. 5.2).

Варто зазначити, що отримані показники синтезу етаполану при використанні різних партії змішаної відпрацьованої олії після смаження різних продуктів не змінювалися для однакової концентрації монособстратів у суміші. Незначне зниження кількості синтезованого етаполану та ЕПС-синтезувальної здатності порівняно з використанням рафінованого субстрату може бути пов'язано з наявністю у відпрацьованій олії різноманітних токсичних з'єднань (альдегідів, вільних радикалів тощо), які утворюються під час смаження [67, 84].

Загалом найвищі показники синтезу етаполану (концентрація полісахариду становила 15,3-16,3 г/л, а ЕПС-синтезувальна здатність досягала 1,5-2,0 г ЕПС/ г біомаси) спостерігалися за використання нейтралізованої меляси (3,0 % за вуглеводами) у суміші з рафінованою або змішаною відпрацьованою олією після смаження різних продуктів (3,0 %).

Таблиця 5.2 – Показники синтезу етаполану на суміші олії та меляси залежно від способу її підготовки

Спосіб підготовки меляси	Концентрація монособстратів у суміші, %		pH <sub>кін</sub>	Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/ г біомаси
	меляса	олія			
Гідролізована без нейтралізації (контроль)	1,5	рафінована, 1,5	6,9	10,09±0,50	3,60±0,18
Нейтралізована після гідролізу	1,5	рафінована, 1,5	7,0	12,15±0,61	2,25±0,11
	1,5	змішана відпрацьована (1)*, 1,5	7,0	11,28±0,56	1,43±0,07

Спосіб підготовки меляси	Концентрація моносубстратів у суміші, %		рН <sub>кін</sub>	Концен- трація ЕПС, г/л	ЕПС- синтезувальна здатність, г ЕПС/ г біомаси
	меляса	олія			
	1,5	змішана відпрацьована (2)*, 1,5			
1,5	змішана відпрацьована (3)*, 1,5	7,2	10,28±0,51	1,17±0,06	
Гідролізована без нейтралізації (контроль)	2,0	рафінована, 2,0	6,9	11,54±0,58	3,02±0,15
Нейтралізована після гідролізу	2,0	рафінована, 2,0	7,0	14,45±0,72	2,59±0,13
	2,0	змішана відпрацьована (1)*, 2,0	7,1	12,23±0,61	1,29±0,06
	2,0	змішана відпрацьована (2)*, 2,0	7,2	12,93±0,65	1,78±0,09
	2,0	змішана відпрацьована (3)*, 2,0	7,3	13,51±0,68	1,39±0,07
Гідролізована без нейтралізації (контроль)	3,0	рафінована, 3,0	6,8	13,09±0,65	3,11±0,16
Нейтралізована після гідролізу	3,0	рафінована, 3,0	7,3	16,25±0,81	1,95±0,10
	3,0	змішана відпрацьована	7,4	16,02±0,80	1,96±0,10

Спосіб підготовки меляси	Концентрація моносубстратів у суміші, %		рН <sub>кін</sub>	Концен- трація ЕПС, г/л	ЕПС- синтезувальна здатність, г ЕПС/ г біомаси			
	меляса	олія						
		(1)*, 3,0						
	3,0	змішана відпрацьована (2)*, 3,0				7,6	15,28±0,76	1,47±0,07
3,0	змішана відпрацьована (3)*, 3,0	7,4	15,28±0,76	1,50±0,08				

**Примітка.** Вирощування посівного матеріалу здійснювали на середовищі 2, біосинтез етаполану – на середовищі 3. Інокулят вирощували на відповідній відпрацьованій олії. \* – у дужках наведено номер партії змішаної відпрацьованої олії після смаження різних продуктів (Rocker pub Tarantino'S, м. Київ).

Варто зазначити, що різноманітні способи обробки меляси широко використовуються для підвищення показників синтезу мікробних полісахаридів при рості даному субстраті [5, 56].

Відомо, що до складу меляси окрім сахарози та інших редукуючих вуглеводів (40-60 % масова частка за вуглеводами) входять амінокислоти, вітаміни та різноманітні мінеральні солі (карбонати, фосфати, хлориди та інші), а також меланоїди та меланіни, які зумовлюють темно коричневий колір даного субстрату [126, 197]. Вміст даних сполук не є постійним і може значною мірою варіюватися від вихідної сировини для отримання меляси.

Незважаючи на те, що більшість компонентів меляси сприяють покращенню росту мікроорганізмів та підвищенню синтезу цільового продукту, наявність у середовищі культивування катіонів важких металів навпаки може призводити до певних проблем під час біосинтезу. Зокрема, вони здатні впливати на рН

субстрату, знижувати активність ферментів, які беруть участь у синтезі цільового продукту, та загалом інгібувати ріст продуцента [5]. З іншого боку, істотно знизити вміст або навіть повністю вилучити дані інгібітори зі складу меляси можливо в результаті проведення її попередньої обробки з використанням сульфатної або фосфорної кислот, різних фосфатів, активованого вугілля або поліакриламід у тощо [5, 56, 77, 83].

## **5.2. Заміна рафінованої олії на змішану відпрацьовану після смаження різних продуктів у суміші з C<sub>2</sub>-субстратами**

Варто зазначити, що при рості *Acinetobacter* IMB B-7005 на суміші соняшникової олії та меляси, спостерігалось зниження ЕПС-синтезувальної здатності майже в 2 рази, порівняно з показниками, отриманими на середовищі з монособстратом олією. Ми припустили, що це може бути пов'язано з неоптимальним співвідношенням C/N внаслідок наявності в мелясі додаткового азоту [126].

Зважаючи на зазначене на наступному етапі роботі досліджували можливість заміни рафінованої олії у сумішах з субстратами, які не містять у своєму складі азоту – етанолом або ацетатом. Зважаючи на особливості зміни рН культуральної рідини впродовж культивування штаму IMB B-7005 на суміші рафінованої соняшникової олії та C<sub>2</sub>-субстратів (див. Розділ 3 та Розділ 4) у даних експериментах відразу проводили дробне внесення субстратів.

Під час заміни рафінованої олії на змішану відпрацьовану після смаження різних продуктів здійснювали додаткове підвищення в середовищі культивування концентрації катіонів Mg<sup>2+</sup>. Дані катіони є одними із активаторів ацетил-КоА-синтетази – ключового ферменту C<sub>2</sub>-метаболізму у *Acinetobacter* sp. IMB B-7005, низька активність якої є однією з причин лімітування метаболізму ацетату у продуцента етаполану.

Встановлено, що при підвищенні вмісту Mg<sup>2+</sup> до 5 мМ показники синтезу полісахариду (концентрація ЕПС становила 15,6-15,9 г/л, ЕПС-синтезувальна здатність досягала 3,1-3,3 г ЕПС/ г біомаси) на суміші змішаної відпрацьованої

олії після смаження різних продуктів та етанолу не залежали від режиму дробного внесення субстратів (4 або 5 порцій) і були вищими за результати, отримані на суміші рафінованої олії та етанолу (10-13,5 г/л) (табл. 5.3).

Таблиця 5.3 – Вплив концентрації катіонів магнію на синтез етаполану на суміші соняшникової олії (1,2 %) різної якості та етанолу (4,0 %)

Вміст $Mg^{2+}$ в середовищі, мМ	Тип олії у суміші з етанолом	Режим дробного внесення субстратів*	$pH_{кін}$	Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г біомаси
1,6 (середовище 10)	Рафінована (контроль)	Чотири порції*	5,9	11,88±0,59	3,08±0,15
		П'ять порцій**	6,1	13,51±0,68	3,65±0,18
	Змішана відпрацьована після смаження різних продуктів	Чотири порції*	6,2	12,02±0,60	3,24±0,16
		П'ять порцій**	6,1	10,10±0,51	2,73±0,14
5,0 (середовище 11)	Рафінована (контроль)	Чотири порції*	6,1	10,37±0,52	2,58±0,13
		П'ять порцій**	6,2	9,86±0,49	2,19±0,11
	Змішана відпрацьована після смаження різних продуктів	Чотири порції*	6,0	15,63±0,78	3,33±0,17
		П'ять порцій**	5,9	15,95±0,80	3,11±0,16

**Примітка.** Посівний матеріал вирощували на етанолі. Дробне внесення субстратів здійснювали 4-5 разів через кожні 24 год: \* – 4 порції 1,0 % етанолу та 0,3 % олії; \*\* – 5 порцій 0,8 % етанолу та 0,24 % олії.

При цьому додаткове внесення  $Mg^{2+}$  у середовище з рафінованою олією і етанолом призводило до незначного зниження синтезу ЕПС. Можливо, це

пов'язано з різним впливом даних катіонів на ферментативні системи, які відповідають за катаболізм жирних кислот та інших супутніх компонентів, що входять до складу соняшникової олії. Так, Лі зі співавт. [80] встановили, що у молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* концентрація  $Mg^{2+}$ , за якої забезпечується максимальна ферментативна активність, відрізняється для різних ферментів  $\beta$ -окиснювальної системи.

Подальші дослідження (табл. 5.4) показали, що після заміни рафінованої олії у суміші з ацетатом на змішану відпрацьовану після смаження різних продуктів кількість синтезованого етаполану досягала 16,36 г/л, що було лише незначною мірою нижче за концентрацію цільового продукту, отриману при використанні рафінованого субстрату (17,27 г/л). У той же час ЕПС-синтезувальна здатність підвищувалась до 7,34 г ЕПС/г біомаси, що було у 3,7 та 2,2 рази вищим за показники, отримані на суміші змішаної відпрацьованої олії після смаження різних продуктів з мелясою або етанолом, відповідно.

Збільшення вмісту катіонів  $Mg^{2+}$  у середовищі культивування сприяло додатковому підвищенню на 7,5 % концентрації етаполану, синтезованого на суміші змішаної відпрацьованої олії після смаження різних продуктів та ацетату натрію. Загалом даний ефект був аналогічним до отриманого під час культивування штаму ІМВ В-7005 на суміші олії та етанолу.

Таблиця 5.4 – Біосинтез етаполану на суміші соняшникової олії (1,5 %) різної якості та ацетату натрію (3,0 %)

Вміст $Mg^{2+}$ в середовищі, мМ	Тип олії у суміші з ацетатом натрію	$pH_{кін}$	Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/ г біомаси
1,6 (середовище 7)	Рафінована (контроль)	7,9	17,27±0,86	6,47±0,32
	Змішана відпрацьована після смаження різних продуктів	7,7	16,36±0,82	7,34±0,37

Вміст $Mg^{2+}$ в середовищі, мМ	Тип олії у суміші з ацетатом натрію	$pH_{кін}$	Концентрація ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/ г біомаси
5,0 (середовище 9)	Рафінована (контроль)	7,8	16,95±0,85	6,21±0,31
	Змішана відпрацьована після смаження різних продуктів	7,7	18,21±0,91	7,82±0,39

**Примітки:** Посівний матеріал вирощували на відповідній соняшниковій олії. Дробне внесення субстратів здійснювали тричі через кожні 24 год: 2 порції 1,0 % ацетату та 0,5 % олії, та 1 порція 0,35 % оцтової кислоти та 0,5 % олії.

Практична цінність мікробних ЕПС визначається в першу чергу їхньою здатністю в малих концентраціях значною мірою змінювати реологічні властивості водних систем [95, 173]. Зважаючи це, на наступному етапі роботи досліджували вплив типу змішаного субстрату (суміш олії різної якості та етанолу або ацетату) на якість розчинів мікробного полісахариду етаполану (табл. 5.5).

Таблиця 5.5 – Реологічні властивості препаратів етаполану, отриманих при культивуванні на олієвмісних субстратах

Субстрат для біосинтезу ЕПС	Відносне збільшення кінематичної в'язкості, % від контролю			
	0,05 % розчин культуральної рідини		0,05 % розчин етаполану	
	за присутності КСІ	у системі $Cu^{2+}$ -гліцин	за присутності КСІ	у системі $Cu^{2+}$ -гліцин
Рафінована соняшникова олія (5,0 %)*	100±5,00	100±5,00	100±5,00	100±5,00
Відпрацьована	102±5,10	106±5,30	99±4,95	110±5,50

Субстрат для біосинтезу ЕПС	Відносне збільшення кінематичної в'язкості, % від контролю			
	0,05 % розчин культуральної рідини		0,05 % розчин етаполану	
	за присутності КСІ	у системі $\text{Cu}^{2+}$ -гліцин	за присутності КСІ	у системі $\text{Cu}^{2+}$ -гліцин
соняшникова олія після смаження м'яса (5,0 %)**				
Відпрацьована соняшникова олія після смаження картоплі (5,0 %)	86±4,30	113±5,65	92±4,60	105±5,25
Змішана відпрацьована після смаження різних продуктів (5,0 %)	105±5,25	120±6,00	98±4,90	112±5,60
Змішана відпрацьована після смаження різних продуктів (1,5 %) та м'яса (1,5 %)**	107±5,35	119±5,95	98±4,90	115±5,75
Змішана відпрацьована після смаження різних продуктів (1,2 %) та етанол (4,0 %)	115±5,75	125±6,25	99±4,95	105±5,25
Змішана відпрацьована після смаження різних продуктів (1,5 %) та ацетат (3,0 %)***	110±5,50	122±6,10	103±5,15	107±5,35

**Примітки:** Інокулят вирощували на відповідній олії. \* – контроль; \*\* – інокулят вирощували на рафінованій олії; \*\*\* – культивування з підживленням.

Дослідження реологічних властивості препаратів етаполану, отриманих при культивуванні штаму ІМВ В-7005 на відпрацьованих олієвмісних моносубстратах та їх сумішах, показало, що підвищення в'язкості останніх за присутності 0,1 М КСІ та у системі  $\text{Cu}^{2+}$ -гліцин не перевищувало 15-25 % порівняно з використанням ЕПС, отриманого на рафінованих субстратах.

### **Висновки до розділу 5**

Встановлено можливість заміни рафінованої олії на різні типи відпрацьованої у суміші з  $\text{C}_2\text{-C}_6$ -субстратами та визначено умови культивування, при яких забезпечуються максимальні показники синтезу етаполану (15-18 г/л) при рості *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на даних змішаних субстратах.

Продемонстровано, що незалежно від типу відпрацьованої олії (після смаження картоплі, м'яса, овочів або змішану після смаження різних продуктів) у суміші показники синтезу ЕПС та реологічні властивості його розчинів практично не відрізняються від отриманих при рості на рафінованому субстраті.

## РОЗДІЛ 6. ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

З початку промислового виробництва мікробних екзополісахаридів (ЕПС) пройшло вже понад 50 років. За цей час завдяки своїм практично цінним властивостям вони були успішно інтегровані в різноманітні галузі промисловості, а річні обсяги їхнього виробництва зросли до сотень тисяч тон [16, 37, 50, 137].

Нажаль, попри такий великий попит та потенціал даних мікробних біополімерів, на сьогоднішній день в Україні все ще відсутнє будь-яке їхнє промислове виробництво. У той же час наявні перспективні вітчизняні розробки, які можуть стати фундаментальною основою для вирішення даної проблеми.

Так, наприкінці 80-х років ХХ століття зі зразків активного мулу станції біологічної очистки стічних вод ПАТ «Нафтохімік Прикарпаття» (минула назва – Надворнянський нафтопереробний завод), в рамках реалізації проекту з пошуку перспективних продуцентів, здатних утилізувати неуглеводні джерела вуглецю та енергії, було виділено ЕПС-синтезувальний штам *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 (депонований в Інституті мікробіології і вірусології НАН України) [203].

Було встановлено, що дані бактерії при рості на етанолі здатні синтезувати ЕПС етаполан, у якого на відміну від переважної більшості відомих полісахаридів нейтральні вуглеводи повторюваної ланки полімеру ацильовані залишками жирних кислот (лауриноюю, пальмітиновою, пальмітолеїноюю, стеариноюю та олеїноюю) [203]. Завдяки цьому розчинам етаполану притаманна унікальна комбінація функціональних характеристик, а саме: здатність до підвищення в'язкості в присутності одно- та двовалентних катіонів, у системі  $\text{Cu}^{2+}$ -гліцин, за низьких швидкостей зсуву ( $0,1-1,0 \text{ c}^{-1}$ ) та зниженні рН [203]. У поєднанні з високими емульгувальними властивостями наявність такої сукупності властивостей забезпечує істотну конкурентну перевагу етаполану над традиційними мікробними полісахаридами (ксантан, склероглюкан, велан та інші) в перспективних галузях промисловості, зокрема нафтовидобувній [199].

Впродовж тривалого часу основним субстратом для отримання етаполану був етанол [199]. З часом його вартість почала істотно підвищуватися, що стало

поштовхом для пошуку більш дешевої альтернативної сировини для біосинтезу даного полісахариду. Так, в подальшому було продемонстровано можливість отримання етаполану на середовищах з органічними кислотами, крохмалем, моно- і дисахаридами, а також мелясі (побічний продукт цукрового виробництва) [203].

Виявилось несподіваним, але нещодавно додатково встановлено можливість синтезу ЕПС при рості штаму ІМВ В-7005 на різноманітних рафінованих та відпрацьованих рослинних оліях (соняшниковій, оливковій, кукурудзяній, рапсовій та їх сумішах) [71]. Очевидно, що можливість використання олієвмісних субстратів безпосередньо пов'язана з високими емульгувальними властивостями етаполану та його структурними особливостями, а саме наявністю ацильованих вуглеводів.

Варто зазначити, що використання олієвмісних субстратів не є характерним для біосинтезу полісахаридів, основною структурною одиницею яких являються різноманітні вуглеводи [37, 137, 158]. Натомість дані субстрати зазвичай використовуються для біосинтезу поверхнево-активних речовин, які містять у своєму складі ліпідну частину [85]. Загалом інформація про використання олієвмісної сировини для одержання мікробних ЕПС є досить обмеженою. Так, з моменту публікації наших останніх оглядів [130, 202], в яких було узагальнено інформацію про синтез полісахаридів на нетрадиційних субстратах, з'явилося лише декілька нових повідомлень [2, 31, 76, 124, 156, 161].

Зокрема повідомляється про здатність штаму *Ochrobactrum pseudintermedium* С1 синтезувати 1-2 г/л ЕПС на різних типах відпрацьованих мінеральних (змащувально-охолоджувальна, гідравлічна та компресорна) та харчових (гірчична та пальмова) оліях, а також мелясі [156]. Інші автори [76] під час дослідження синтезу ЕПС штамом *Pseudozyma* sp. SY16 на різних рослинних оліях, зокрема оливковій, соєвій та пальмовій встановили, що оптимальним для накопичення полісахариду (0,82 г/л) являється використання 50 % (об'ємна частка) оливкової олії. Варто зазначити, що в результаті подальшого визначення

оптимальних умов культивування (рН, температури та швидкості перемішування) концентрацію цільового продукту було підвищено у 7 разів (до 5,8 г/л).

У роботі [2] проведено виділення з олієвмісних відходів штамів *Acinetobacter* sp. Ab33-ES та Ab9-ES, здатних синтезувати біоемульгатор, вміст вуглеводів в якому складає 65,5-67,8 % від загальної маси полімеру. За оптимальних умов культивування при рості на середовищі з 2 % (об'ємна частка) оливкової олії штами Ab33-ES та Ab9-ES накопичували 4,3 та 4,5 г/л цільового продукту відповідно. Нещодавно також з'явилася робота [124] про синтез високомолекулярного біоемульгатору при рості штаму *Acinetobacter bouvetii* UAM25 на етанолі, відпрацьованій рослинній олії, а також суміші гліцерину та гексадекану. Продемонстровано залежність емульгувальних властивостей від типу використовуваного субстрату. Нажаль, інформація про показники синтезу цільового продукту в даній роботі не зазначена.

Окрім рослинних олій для синтезу ЕПС також може бути використана технічна олія [31, 161]. Так, Darwish зі співавт. [31] встановили можливість синтезу 0,5 г/л полісахариду при рості бактерій *Pseudomonas aeruginosa* на 10 % (об'ємна частка) важкої нафти. Підвищення концентрації субстрату призводила до різкого зниження показників синтезу ЕПС та практично лінійного зменшення рівня біомаси. Аналогічну концентрацію мікробного полісахариду (0,5 г/л) було отримано при культивуванні *Bacillus cereus* spp. на середовищі, яке містило 2 % (об'ємна частка) моторної оливи [161].

Загалом при біосинтезі мікробних ЕПС на рафінованій та відпрацьованій олієвмісній сировині концентрація цільового продукту є невисокою і не перевищує 5-6 г/л, що значною мірою обмежує перспективи використання даних субстратів, у порівнянні з класичними вуглеводними джерелами вуглецю та енергії.

Очевидно, що для вирішення даної проблеми необхідно проводити комплексну оптимізацію умов культивування продуцентів при рості на

олієвмісних субстратах (див. *Підрозділ 1.1*), а також здійснювати загальну інтенсифікацію процесу біосинтезу ЕПС.

При цьому одним з перспективних підходів для підвищення показників синтезу мікробних метаболітів являється культивування на змішаних ростових субстратах [201, 203].

Теоретичною основою для реалізації такого підходу являється енергетична класифікація субстратів, розроблена Бабелем у 80-х роках ХХ століття в рамках роботи над концепцією допоміжного субстрату [14]. Відповідно до даної класифікації всі субстрати можна умовно поділити на дві групи – енергетично надлишкові та дефіцитні. При цьому ключовим являється кількість енергії, яка витрачається при катаболізмі субстратів до фосфогліцерату та залишається після нього. Межею для енергетичного поділу субстратів обрано дану сполуку, оскільки вона являється центральним вуглецевим попередником. Так, кількість енергії, необхідна для синтезу клітинних компонентів з фосфогліцеринової кислоти для більшості мікроорганізмів являється однаковою і становить приблизно 10,5 г біомаси/ моль АТФ [203].

Згідно класифікації Бабеля [14] до енергетично надлишкових субстратів можна віднести сполуки, у яких після катаболізму до фосфогліцерату залишається достатньо енергії для синтезу біомаси. У випадку енергетично дефіцитних субстратів даної кількості енергії недостатньо для повноцінного синтезу біомасу. При цьому потреби конструктивного метаболізму забезпечуються завдяки додатковому окисненню частини субстрату до  $\text{CO}_2$ .

Мінімізація таких непродуктивних втрат під час «холостого» окиснення субстратів і є основною перевагою змішаних субстратів. Загалом більш ефективний розподіл вуглецю та енергії субстратів на метаболічні потреби досягається завдяки їх одночасному залученню до процесів конструктивного та енергетичного метаболізму або навпаки роздільному використанню одного з субстратів виключно як джерела вуглецю чи енергії, а також розширенню

«вузьких місць» метаболізму моносубстрату за рахунок введення «допоміжного субстрату» [14, 203].

При цьому підвищується ефективність та загальний ступінь утилізації субстратів, а також забезпечується додаткове зростання рівня біомаси та показників синтезу первинних та вторинних метаболітів [14, 203].

Незважаючи на зазначені переваги на сьогоднішній день використання суміші субстратів насамперед пов'язано з отриманням біоетанолу другого покоління та деяких інших мікробних метаболітів (метан, ліпіди тощо) з лігноцелюлозної біомаси (деревина, солома, жом тощо) [102, 143, 151]. У той же час відомості про використання лігноцелюлози [23, 54, 87, 188] та загалом суміші ростових субстратів [203] для отримання мікробних ЕПС є досить обмеженими.

Так, у ряді робіт [54, 118, 119] хоча й повідомляється про використання змішаних субстратів, проте об'єктивно оцінити рівень впливу даного підходу на біосинтез ЕПС являється досить проблематичним, оскільки концентрація цільового продукту навіть за оптимальних умов культивування є незначною та не перевищує 1 г/л. В інших дослідженнях [8, 56, 93, 133] продемонстровано можливість накопичення на порядок вищих концентрацій полісахаридів (10-53 г/л) при культивуванні продуцентів на продуктах агропромислового сектору (крохмаль, меляса, фруктові кісточки), до яких додатково вносять вуглеводні субстрати (глюкозу, фруктозу, сахарозу, манозу). На нашу думку, в даних випадках підвищення показників синтезу цільового продукту може бути в основному пов'язано з використанням рафінованого ростового субстрату в якості індуктору відповідних індукцибельних ферментів або явищем кометаболізму, тобто проведенням трансформації допоміжного субстрату, спряженим з використанням ростового.

На жаль, характерною особливістю переважної більшості робіт, присвячених дослідженню біосинтезу полісахаридів на змішаних субстратах являється проведення емпіричного підбору співвідношення концентрацій джерел вуглецю та енергії у суміші, що потребує значних трудовитрат та не завжди

супроводжується встановленням дійсно оптимальних умов культивування продуцента.

Одним зі шляхів вирішення даної проблеми є проведення попередніх теоретичних розрахунків оптимального молярного співвідношення субстратів у суміші, при якому витрати субстратів на холосте окиснення являються мінімальними. Доцільність використання такого підходу було успішно продемонстровано у попередніх дослідженнях [203] з біосинтезу етаполану при рості штаму *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші енергетично нерівноцінних (глюкоза та етанол) та енергетично дефіцитних (глюкоза та ацетат, глюкоза та фумарат) субстратах.

Зважаючи на зазначене основною метою даної роботи було об'єднати можливість синтезу етаполану штамом *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на дешевій відпрацьованій соняшниковій олії з потенціалом інтенсифікації біосинтезу мікробних метаболітів при культивуванні на змішаних ростових субстратах.

Першочерговим при розробці технологій одержання продуктів мікробного синтезу з використанням альтернативної дешевої сировини, яка зазвичай не має чітко визначеного сталого складу, являється встановлення оптимальних умов культивування та особливостей синтезу цільового продукту на подібному або аналогічному рафінованому субстраті.

Варто зазначити, що нещодавно вже було продемонстровано можливість отримання етаполану при рості штаму ІМВ В-7005 на суміші рафінованої соняшникової олії та меляси [131]. Нажаль, при використанні даного змішаного субстрату спостерігалось зниження ЕПС-синтезувальної здатності у 2 рази порівняно з використанням моносубстрату олії. Ми припустили, що вирішити дану проблему можна завдяки використанню у суміші з олією енергетично дефіцитного ацетату, який на відміну від меляси не містить у своєму складі азоту. Так, раніше продемонстровано, що при культивуванні бактерій на суміші ацетату та глюкози ЕПС-синтезувальна здатність становила майже 20 г ЕПС/ г біомаси [203].

Разом з цим ми вирішили перевірити можливість синтезу етаполану на суміші двох енергетично надлишкових субстратів – олії та етанолу. Вибір етанолу в якості одного з компонентів змішаного субстрату було зумовлено декількома причинами. По-перше, основна технологія отримання етаполану базувалася на використанні етанолу в якості джерела вуглецю та енергії [199]. По-друге, стрімкий розвиток технологій отримання біоетанолу сприяє подальшому зниженню його собівартості, що повторно робить використання даного C<sub>2</sub>-субстрату економічно доцільним [27].

Окрім цього використання суміші двох енергетично надлишкових субстратів являється перспективним фундаментальним дослідженням, адже згідно концепції Бабеля не передбачено такого комбінування субстратів [14]. У той же час наявні літературні дані, які свідчать про теоретичну можливість реалізації такого підходу [39, 203].

Для оптимізації обсягу експериментальних робіт першочергово проводили теоретичний розрахунок оптимального молярного співвідношення олії та C<sub>2</sub>-субстратів у суміші.

За основу для проведення розрахунків двох енергетично нерівноцінних субстратів використовували підходи, розроблені в наших попередніх роботах [203]. У той час як для суміші енергетично надлишкових субстратів класичний підхід до розрахунку було модифіковано. Ми припустили, що обидва субстрати (етанол та олія) одночасно залучаються до процесів конструктивного та енергетичного метаболізму. При цьому внесок кожного субстрату в розподіл енергії, утвореної під час їхнього метаболізму є різним, оскільки жирні кислоти олії можуть з мінімальними перетвореннями ацилювати вуглеводні залишки полісахариду.

Завдяки проведенню попередніх теоретичних розрахунків відразу вдалося точно встановити оптимальне співвідношення олії та ацетату у суміші (1:0,13). У той же час під час росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші енергетично надлишкових субстратів (етанол та олія) теоретично розраховане молярне

співвідношення субстратів (1:0,076) лише незначною мірою відрізнялося від визначеного експериментально (1:0,056).

Найбільш ймовірно, що дане відхилення пов'язано з нашим припущенням, що після синтезу біомасу з етанолу генерується 75 %, а з жирних кислот олії – 25 % від загальної кількості енергії (див. *Підрозділ 2.2*). Відповідно до експериментально встановленого співвідношення з жирних кислот олії повинно генеруватися приблизно 20 % від загальної кількості енергії, що свідчить про більший рівень залучення жирних кислот олії до ацилювання полісахариду ніж очікувалося.

Узагальнені дані, щодо кореляції розрахованого молярного співвідношення до підтвердженого експериментально при синтезі етаполану на різних змішаних субстратах представлено в *табл. 6.1*.

Таблиця 6.1 – Кореляція теоретично розрахованого та експериментально підтвердженого співвідношення субстратів у суміші для біосинтезу етаполану

Суміш субстратів для біосинтезу етаполану	Молярне співвідношення моносубстратів у суміші		Література
	Розраховане теоретично	Підтверджено експериментально	
Етанол та глюкоза*	1:1	1:1	[203]
Фумарат натрію та глюкоза*	4:1	4:1	
Соняшникова олія та меляса*	0,9:1	1,1:1	[131]
Соняшникова олія та ацетат натрію*	0,13:1	0,13:1	Дана робота
Соняшникова олія та етанол**	0,076:1	0,056:1	

**Примітки:** \* – суміш енергетично нерівноцінних субстратів; \*\* – суміш енергетично надлишкових субстратів.

У процесі експериментальної апробації розрахованих молярних співвідношень встановлено, що незалежно від типу C<sub>2</sub>-субстрату у суміші з олією

спостерігалось відхилення рН культуральної рідини від оптимального для синтезу етаполану рівня (7,0-8,0).

Виявилось цікавим, що хоча ацетат та етанол у штаму ІМВ В-7005 асимілюються за одним метаболічним шляхом [203], причини відхилення від оптимального рН були різними. Так, при рості на суміші олії та ацетату спостерігалось різке підвищення рН культуральної рідини, спричинене особливостями споживання ацетату, яке у штаму ІМВ В-7005 відбувається симпортом з протоном [203]. У той же час під час культивування бактерій на суміші олії та етанолу, навпаки, відмічалась тенденція до закислення середовища. Найбільш ймовірно, вона була спричинена накопиченням ацетату, оскільки ацетил-КоА-синтетаза (ключовий фермент  $C_2$ -метаболізму), у продуцента етаполану функціонує з низькою активністю [203].

На сьогоднішній день дану проблему можна легко вирішити завдяки оснащенню ферментаційного обладнання автоматичною системою регулювання рН з використанням розчинів лугів або кислот. У той же час таке титрування призводить до накопичення в середовищі культивування різноманітних солей, які можуть негативно впливати на практично цінні характеристики цільового продукту. Зокрема, при регуляції рН розчином  $HCl$  спостерігається зниження в'язкості розчинів етаполану внаслідок надмірного накопичення  $NaCl$  [200].

У зв'язку з цим проблему надмірного підвищення або зниження рН культуральної рідини при рості *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші олії з  $C_2$ -субстратами намагалися вирішити за рахунок модифікації складу поживного середовища.

На першому етапі здійснювали заміну  $NH_4NO_3$  (мінеральне джерело азотного живлення), споживання якого практично не впливає на рН культуральної рідини, на еквімолярну за азотом концентрацію  $NH_4Cl$  або  $KNO_3$ . Ми припускали, що хлорид амонію завдяки асиміляції, що відбувається антипортом з протоном [203], сприятиме підкисленню культуральної рідини при рості бактерій на суміші ацетату та олії. Нітрат калію, який, навпаки, транспортується у клітини

симпортом з протоном [203], мав би забезпечувати додаткову стабілізацію рН при культивуванні на суміші етанолу та олії. На жаль, експерименти показали, що незалежно від  $C_2$ -субстрату у суміші з олією заміни лише джерела азотного живлення у складі середовища виявилось недостатньо для належної стабілізації рН культуральної рідини.

Додаткове підвищення концентрації азоту в середовищі могло би сприяти підтримці рН на оптимальному для синтезу етаполану рівні, проте даний підхід неодмінно би призводив до зниження співвідношення C/N, яке негативно впливає на синтез етаполану та інших ЕПС [16, 50].

Зважаючи на зазначене припустили, що надмірного залужнення культуральної рідини під час культивування продуцента на суміші олії та ацетату вдасться уникнути завдяки зниженню у середовищі вмісту лужної складової ( $KH_2PO_4$  та КОН). Встановлено, що вилучення з середовища КОН і зменшення удвічі концентрації  $KH_2PO_4$  дало змогу стабілізувати рН на рівні 7,8-7,9 зі збереженням сталих показників синтезу ЕПС. Зазначимо, що при цьому концентрація ацетату або етанолу у суміші з олією була невисокою (1 %), а отже, не забезпечувала високих показників синтезу цільового продукту.

У зв'язку з цим припустили, що можна досягти оптимального рівня рН під час культивування продуцента етаполану на суміші вищих концентрацій  $C_2$ -субстратів та олії в результаті дробного внесення джерел вуглецю невеликими порціями в процесі біосинтезу.

Дійсно, застосування такого підходу виявилось досить ефективним і дало змогу підвищити концентрацію синтезованого етаполану до 17,3 та 13,5 г/л на суміші соняшникової олії з ацетатом або етанолом відповідно. При цьому незалежно від  $C_2$ -субстрату у суміші з олією рН культуральної рідини стабілізувалось на рівні, допустимому для синтезу ЕПС.

Зазначимо, що залежно від використовуваного змішаного субстрату режим дробного внесення моносубстратів є різним. Так, при культивуванні на суміші

олії з ацетатом оптимальним було триразове внесення субстратів, а на суміші з етанолом – чотирьох- або п'ятиразове.

Загалом проведення культивування з підживленням широко використовується для інтенсифікації технологій мікробного синтезу первинних та вторинних метаболітів [94, 193], зокрема й ЕПС [17, 60, 110, 127, 129, 167].

Так, Рап зі співавт. [127] встановили, що одноразове додаткове внесення 36 г/л сахарози (до загальної концентрації в середовищі 103 г/л) на 12 годині культивування штаму *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 сприяє зростанню кількості синтезованого декстрану на 35,24 % (до 40,1 г/л). При дослідженні біосинтезу ЕПС арктичним ізолятом штамом *Polaribacter* sp. SM1127 встановлено, що додаткове внесення сахарози впродовж росту бактерій супроводжується підвищенням показників синтезу цільового продукту у 3,1 рази (до 19,25 г/л) [167]. Підживлення здійснювали концентрованим розчином сахарози (62,5 %), який для відновлення початкової концентрації джерела вуглецю (36,47 г/л) вносили по 200, 200 та 100 мл на 72, 96 та 120 год культивування відповідно.

У іншій роботі [60] максимальні показники синтезу полісахариду (13,1 г/л) штамом *Sporidiobolus pararoseus* JD-2 спостерігалися при дробному внесенні концентрованого 80 %-го розчину глюкози 5-ма порціями, що забезпечувало постійну підтримку її концентрації в середовищі культивування на рівні 20-30 г/л (вихідна концентрація глюкози 80 г/л). Отримані показники були у 1,7-2 рази вищими порівняно з разовим внесенням джерела вуглецю на початку вирощування продуцента. Аналогічний підхід було використано у роботі [17]. Так, для уникнення споживання декстрану бактеріями *Weissella cibaria* RBA12 при рості на середовищі з 2 % сахарози, після зниження концентрації джерела вуглецю нижче 5 г/л здійснювали постійну подачу 50 %-го розчину сахарози (швидкість підживлення 20 мл/год). При цьому концентрація цільового продукту досягала 35,8 г/л після 32 год культивування. У той же час кількість синтезованого полісахариду при одноразовому внесенні субстрату не

перевищувала 9,5 г/л на 14 год вирощування, а потім впродовж 8 год послідовно знижувалася до 2 г/л.

Наступним етапом було дослідження можливості заміни рафінованої соняшникової олії у змішаних субстратах на відпрацьовану.

Оскільки склад пересмаженої олії може значною мірою варіюватися в залежності від режиму та кратності смаження, а також типу приготованих страв [67, 84, 128], у першу чергу досліджували вплив різних типів відпрацьованої олії на показники синтезу етаполану.

Виявилось несподіваним, але заміна рафінованої олії у суміші з мелясою на аналогічну концентрацію змішаної відпрацьованої призвела до збільшення синтезу полісахариду на 40 %. У той же час при використанні інших типів відпрацьованої олії (після смаження певних продуктів – картоплі, м'яса або овочів) показники синтезу були на одному рівні з рафінованим субстратом або лише незначною мірою перевищували його.

На нашу думку, позитивний ефект від використання пересмаженої олії може бути пов'язаний з підвищенням її енергетичної цінності в результаті переходу вуглеводів та амінокислот з продуктів харчування під час смаження. На користь даного припущення свідчать результати попередніх досліджень, у яких відмічалось різке зниження показників синтезу етаполану при рості штаму ІМВ В-7005 на середовищі, що містило як єдине джерело вуглецю та енергії соняшкову олію після холостого смаження [71].

Важливим також виявилось експериментальне підтвердження сталості показників синтезу етаполану у разі використання різних партій змішаної відпрацьованої олії. Загалом у даній роботі продемонстровано, що при концентрації змішаної відпрацьованої олії та меляси у суміші по 3,0 % штаму ІМВ В-7005 здатен накопичувати до 15-16 г/л полісахариду, що являється вищим за показники, отримані при рості даного продуцента на інших змішаних субстратах з мелясою (10-14 г/л) [203].

У наступних експериментах досліджували вплив концентрації катіонів  $Mg^{2+}$  у середовищі культивування продуцента на синтез етаполану. Так, раніше продемонстровано, що підвищення вмісту даного активатора ацетил-КоА-синтетази (ключовий фермент  $C_2$ -метаболізму у *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005) у середовищі з етанолом супроводжувалося збільшенням ферментативної активності в 2 рази [203].

Разом з тим, під час культивування штаму ІМВ В-7005 на суміші олії та  $C_2$ -субстратів позитивний вплив від підвищення вмісту катіонів магнію спостерігався лише за наявності у змішаному субстраті відпрацьованої змішаної олії. Цілком ймовірно, що такі неочікувані результати зумовлені різним впливом катіонів  $Mg^{2+}$  на активність ферментів, які беруть участь у  $\beta$ -окисненні жирних кислот та інших компонентів, утворених в процесі деградації олії під час смаження.

Загалом, реалізація використаних під час виконання роботи підходів дала змогу підвищити концентрацію етаполану на суміші олії та  $C_2$ -субстратів до 16-18 г/л.

Такі результати значно перевищують відомі з літератури показники синтезу полісахаридів на олієвмісних субстратах (максимум до 6 г/л) [2, 31, 76, 124, 156, 161], а також концентрації ЕПС, синтезованих представниками роду *Acinetobacter* на  $C_2$ -субстратах [112, 146]. Так, у роботі [112] повідомляється про синтез 2,2 г/л аласану при рості штаму *Acinetobacter radioresistens* КА53 на середовищі з 0,5 % (об'ємна частка) етанолу. Інші дослідники [146] встановили здатність *Acinetobacter calcoaceticus* А2 при рості на етанолі (1,6 %) накопичувати 4 г/л біодисперсану.

Зазначимо, що під час розробки технологій біосинтезу практично важливих вторинних метаболітів важливо не тільки досягти максимальної концентрації цільового продукту, а й забезпечити його функціональні властивості, необхідні для практичного використання.

У даній роботі встановлено, що заміна рафінованої олії у змішаних субстратах на різні типи відпрацьованої не приводила до зниження реологічних

показників препаратів етаполану. Навпаки, розчини етаполану, синтезованого на суміші C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів та відпрацьованої олії, характеризувалися вищою на 25 % в'язкістю за наявності 0,1 М КСl та у системі Cu<sup>2+</sup>-гліцин порівняно з показниками, встановленими для ЕПС, отриманого на рафінованій олії.

Таким чином, одержані результати засвідчують можливість розробки універсальної технології одержання етаполану на суміші відпрацьованої олії та C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів, незалежної від типу та постачальника пересмаженої олії.

## ВИСНОВКИ

1. На основі енергетичних потреб синтезу ЕПС і біомаси теоретично розраховано та експериментально підтверджено, що оптимальне молярне співвідношення концентрацій енергетично дефіцитного (ацетат) та надлишкового (рафінована соняшникова олія) субстратів у суміші становить 1:0,13.

2. Максимальна концентрація етаполану (17,3 г/л) на суміші рафінованої олії (1,5 %) та ацетату (3,0 %) досягалася при дробному внесенні субстратів трьома порціями під час культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на модифікованому середовищі, в якому (порівняно з базовим)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  замінено на еквімолярну за нітрогеном концентрацію  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,8 г/л), вдвічі зменшено вміст  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (до 3,4 г/л) та вилучено  $\text{KOH}$ .

3. Експериментально встановлене оптимальне молярне співвідношення енергетично надлишкових (етанол та рафінована соняшникова олія) субстратів становить 1:0,056, що максимально наближене до теоретично розрахованого (1:0,076).

4. Дробне внесення рафінованої олії та етанолу п'ятьма порціями до кінцевої концентрації субстратів 1,2 та 4,0 % відповідно і використання нітратного джерела азоту ( $\text{KNO}_3$ ) дало змогу збільшити кількість синтезованого полісахариду до 13,5 г/л завдяки підвищенню концентрації моносубстратів у суміші.

5. Встановлено, що заміна рафінованої соняшникової олії на різні типи відпрацьованої (після смаження картоплі, м'яса, овочів або змішану після смаження різних продуктів) у суміші з  $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$ -субстратами (мелясою, етанолом або ацетатом) не супроводжувалася зниженням показників синтезу етаполану.

6. Культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші відпрацьованої після смаження різних продуктів олії (3 %) та нейтралізованої після гідролізу меляси (3,0 %) супроводжувалося синтезом 15,3-16,0 г/л етаполану. Збільшення концентрації ЕПС до 16-18 г/л на суміші відпрацьованої олії та  $\text{C}_2$ -субстратів

спостерігали при підвищенні з 1,5 до 5 мМ в середовищі вмісту  $Mg^{2+}$  (активатор ключових ферментів  $C_2$ -метаболізму у продуцента етаполану).

7. В'язкість за наявності 0,1 М КСІ та у системі  $Cu^{2+}$ -гліцин розчинів етаполану, синтезованого на суміші  $C_2$ - $C_6$ -субстратів з відпрацьованою соняшниковою олією, була на 15-25 % вищою порівняно з показниками, встановленими для ЕПС, отриманого на моносубстраті рафінованій олії.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Acosta, S.B.P.; Marchioro, M.L.K.; Santos, V.A.Q.; Calegari, G.C.; Lafay, C.B.B.; Barbosa-Dekker, A.M.; et al. Valorization of soybean molasses as fermentation substrate for the production of microbial exocellular  $\beta$ -glucan. *J Polym Environ.* **2020**, 28, pp. 2149-2160. doi: 10.1007/s10924-020-01758-z.
2. Adetunji, A.I.; Olaniran, A.O. Production and characterization of bioemulsifiers from *Acinetobacter* strains isolated from lipid-rich wastewater. *3 Biotech.* **2019**, 9:151. doi: 10.1007/s13205-019-1683-y.
3. Adlin, W.N.A.B.W.; Mian, V.J.Y; Huap, A.C.; Lee, W.C. Characterization of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* using fresh and waste cooking oil enriched medium. *J Asian Sci Res.* **2020**, 10(3), pp 156-164. doi: 10.18488/journal.2.2020.103.156.164.
4. Ahmad Raus, R.; Wan Nawawi, W.M.F.; Nasaruddin, R.R. Alginate and alginate composites for biomedical applications. *Asian J Pharm Sci.* **2021**, 16(3), pp 280-306. doi: 10.1016/j.ajps.2020.10.001.
5. Ai, H.; Liu, M.; Yu, P.; Zhang, S.; Suo, Y.; Luo P.; et al. Improved welan gum production by *Alcaligenes* sp. ATCC31555 from pretreated cane molasses. *Carbohydr Polym.* **2015**, 129, pp 35-43. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.033.
6. Altan Kamer, D.D.; Gumus, T.; Palabiyik, I.; Demirci, A.S.; Oksuz, O. Grape pomace as a promising source for gellan gum production. *Food Hydrocoll.* 2021, 114:106584. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.106584.
7. Amiri, S.; Rezaei Mokarram, R.; Sowti Khiabani, M.; Rezazadeh Bari, M.; Alizadeh Khaledabad, M. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12: optimization of fermentation variables and characterization of structure and bioactivities. *Int J Biol Macromol.* **2019**, 123, pp 752-765. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.084.
8. An, C.; Ma, S.; Chang, F.; Xue, W. Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose. *Braz J Microbiol.* **2017**, 48(1), pp 180-185. doi: 10.1016/j.bjm.2016.11.001.

9. Anderson, L.A.; Islam, M.A.; Prather, K.L.J. Synthetic biology strategies for improving microbial synthesis of "green" biopolymers. *J Biol Chem.* **2018**, 293(14), pp 5053-5061. doi: 10.1074/jbc.TM117.000368.
10. Arslan, N.P.; Aydogan, M.N. Evaluation of sheep wool protein hydrolysate and molasses as low-cost fermentation substrates for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 35246. *Waste Biomass Valor.* **2021**, 12, pp 925-935. doi: 10.1007/s12649-020-01062-w.
11. Asgher, M.; Rani, A.; Khalid, N.; Qamar, S.A.; Bilal M. Bioconversion of sugarcane molasses waste to high-value exopolysaccharides by engineered *Bacillus licheniformis*. *Case Studies Chem Environ Eng.* 2021, 3:100084. doi: 10.1016/j.cscee.2021.100084.
12. Asgher, M.; Urooj, Y.; Qamar, S.A.; Khalid, N. Improved exopolysaccharide production from *Bacillus licheniformis* MS3: Optimization and structural/functional characterization. *Int J Biol Macromol.* **2020**, 151, pp 984-992. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.094.
13. Ates, O. Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Front Bioeng Biotechnol.* **2015**, 3:200. doi: 10.3389/fbioe.2015.00200.
14. Babel, W.; Müller, R.H. Mixed substrates utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics. *J Gen Microbiol.* **1985**, 131(1), 39-45.
15. Badri, A.; Williams, A.; Awofiranye, A.; Datta, P.; Xia, K.; He, W.; et al. Complete biosynthesis of a sulfated chondroitin in *Escherichia coli*. *Nat Commun.* **2021**, 12:1389. doi: 10.1038/s41467-021-21692-5.
16. Barcelos, M.C.S.; Vespermann, K.A.C.; Pelissari, F.M.; Molina, G. Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2020**, 60(9), pp 1475-1495. doi: 10.1080/10408398.2019.1575791.
17. Baruah, R.; Deka, B.; Kashyap, N.; Goyal, A. Dextran utilization during its synthesis by *Weissella cibaria* RBA12 can be overcome by fed-batch fermentation in a

bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol.* **2018**, 184, pp 1-11. doi: 10.1007/s12010-017-2522-4.

18. Baş, D.; Boyaci, I.H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Eng.* **2007**, 78(3), pp 836-845. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024.

19. Becker, A. Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. *Front Microbiol.* **2015**, 6:687. doi: 10.3389/fmicb.2015.00687.

20. Bhat, B.; Vaid, S.; Habib, B.; Bajaj, B.K. Design of experiments for enhanced production of bioactive exopolysaccharides from indigenous probiotic lactic acid bacteria. *Indian J Biochem Biophys.* **2020**, 57(5), pp 539-551.

21. Bhati, A.; Baghel, A.K.; Singhal, B. Optimization of culture conditions for eps production in *Lactobacillus rhamnosus* MTCC 5462 through Taguchi design methodology. In: *Proceedings of International Conference on Scientific and Natural Computing.* **2021**, pp 253-260. doi: 10.1007/978-981-16-1528-3\_22.

22. Chaisuwan, W.; Jantanasakulwong, K.; Wangtueai, S.; Phimolsiripol, Y.; Chaiyaso, T.; Techapun, C.; et al. Microbial exopolysaccharides for immune enhancement: fermentation, modifications and bioactivities. *Food Biosci.* **2020**, 35:100564.

23. Chambi, D.; Romero-Soto, L.; Villca, R.; Orozco-Gutiérrez, F.; Vega-Baudrit, J.; Quillaguamán, J.; et al. Exopolysaccharides Production by cultivating a bacterial isolate from the hypersaline environment of Salar de Uyuni (Bolivia) in pretreatment liquids of steam-exploded quinoa stalks and enzymatic hydrolysates of Curupaú sawdust. *Fermentation.* **2021**, 7(1):33. doi: 10.3390/fermentation7010033.

24. Chen, X.; Wang, Y.; He, C.Y.; Wang, G.L.; Zhang, G.C.; Wang, C.L.; et al. Improved production of  $\beta$ -glucan by a T-DNA-based mutant of *Aureobasidium pullulans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2021**, 105(18), pp 6887-6898. doi: 10.1007/s00253-021-11538-x.

25. Cheng, F.; Yu, H.; Stephanopoulos, G. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for high-titer biosynthesis of hyaluronic acid. *Metab Eng.* **2019**, 55, pp 276-289. doi: 10.1016/j.ymben.2019.07.003.
26. Cheng, K.C.; Demirci, A.; Catchmark, J.M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2011**, 92, 29-44. doi: 10.1007/s00253-011-3477-y.
27. Chong, T.Y.; Cheah, S.A.; Ong, C.T.; Wong, L.Y.; Goh, C.R.; Tan, I.S.; et al. Techno-economic evaluation of third-generation bioethanol production utilizing the macroalgae waste: A case study in Malaysia. *Energy.* **2020**, 210:118491. doi: 10.1016/j.energy.2020.118491.
28. Crosse, A.J.; Brady, D.; Zhou, N.; Rumbold, K. Biodiesel's trash is a biorefineries' treasure: the use of "dirty" glycerol as an industrial fermentation substrate. *World J Microbiol Biotechnol.* **2019**, 36:2, pp 1-5. doi: 10.1007/s11274-019-2776-9.
29. Cruz, M.V.; Gouveia, A.R.; Dionisio, M.; Freitas, F.; Reis, M.A.M. A process engineering approach to improve production of P(3HB) by *Cupriavidus necator* from used cooking oil. *Int J Polym Sci.* **2019**, 2191650. doi: 10.1155/2019/2191650.
30. da Silva, A.S.; dos Santos, F.P.; de Souza Abud, A.K. Xanthan gum production by semisolid and submerged processes using potato peel as substrate. *Braz J Development.* **2020**, 6(5), pp 25202-25207. doi: 10.34117/bjdv6n5-102.
31. Darwish, A.A.; Al-Bar, O.A.M.; Yousef, R.H.; Moselhy, S.S.; Ahmed, Y.M.; Hakeem, K.R. Production of antioxidant exopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* utilizing heavy oil as a solo carbon source. *Pharmacogn Res.* **2019**, 11(4), pp 378-383. doi: 10.4103/pr.pr\_40\_19.
32. Dave, S.R.; Upadhyay, K.H.; Vaishnav, A.M.; Tipre, D.R. Exopolysaccharides from marine bacteria: production, recovery and applications. *Environ Sustain.* **2020**, 3. pp 139-154. doi: 10.1007/s42398-020-00101-5.
33. Dhagat, S.; Jujjavarapu, S.E. Simulated annealing and artificial neural network as optimization tools to enhance yields of bioemulsifier and exopolysaccharides by thermophilic *Brevibacillus borstelensis*. *J Environ Chem Eng.*

2021, 9(4):105499. doi: 10.1016/j.jece.2021.105499.

34. Diamantopoulou, P.; Filippousi, R.; Antoniou, D.; Varfi, E.; Xenopoulos, E.; Sarris, D.; et al. Production of added-value microbial metabolites during growth of yeast strains on media composed of biodiesel-derived crude glycerol and glycerol/xylose blends. *FEMS Microbiol Lett.* **2020**, 367(10):fnaa063. doi: 10.1093/femsle/fnaa063.

35. Díaz-Barrera, A.; Soto, E.; Altamirano, C. Alginate production and *alg8* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures, *J Ind Microbiol Biotechnol.* **2021**, 39(4), pp 613-621. doi: 10.1007/s10295-011-1055-z.

36. Díaz-Montes, E. Dextran: sources, structures, and properties. *Polysaccharides.* **2021**; 2(3), pp 554-565. doi: 10.3390/polysaccharides2030033.

37. Donot, F.; Fontana, A.; Baccou, J.C.; Schorr-Galindo, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr Polym.* **2012**, 87(2), pp 951-962. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.08.083.

38. Drakou, E.M.; Amorim, C.L.; Castro, P.M.L.; Panagiotou, F.; Vyrides, I. Wastewater valorization by pure bacterial cultures to extracellular polymeric substances (EPS) with high emulsifying potential and flocculation activities. *Waste Biomass Valor.* **2018**, 9 (12), pp 2557-2564. doi: 10.1007/s12649-017-0016-9.

39. Eggeling, L.; Sahm, H. Enhanced utilization-rate of methanol during growth on a mixed substrate: a continuous culture study with *Hansenula polymorpha*. *Arch Microbiol.* 1981, 130, pp 362-365. doi: 10.1007/BF00414601.

40. El-Ghonemy, D.H. Antioxidant and antimicrobial activities of exopolysaccharides produced by a novel *Aspergillus* sp. DHE6 under optimized submerged fermentation conditions. *Biocatal Agric Biotechnol.* **2021**, 36:102150. doi: 10.1016/j.bcab.2021.102150.

41. Elova, N.; Kutliyeva, G.; Zakiryeva, S.; Bekmukhamedova, N. Optimization of cultivation conditions for increasing the production of exopolysaccharides of the *Lactobacillus plantarum* Eb-2 strain. *Nat Volatiles & Essent. Oils.* **2021**, 8(5), pp 8689-8697.

42. Ergene, E.; Avci, A. Effects of cultural conditions on exopolysaccharide production by *Bacillus* sp. ZBP4. *J Agric Sci.* **2018**, 24, pp 386-393. doi: 10.15832/ankutbd.456666.
43. Ermiş, E.; Poyraz, E.; Dertli, E.; Yılmaz, M.T. Optimization of exopolysaccharide production of *Lactobacillus brevis* E25 using RSM and characterization. *Sakarya University Journal of Science.* **2020**, 24(1), pp 151-160. doi: 10.16984/saufenbilder.545929.
44. Esparza, I.; Jiménez-Moreno, N.; Bimbela, F.; Ancín-Azpilicueta, C.; Gandía, L.M. Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. *J Environ Manage.* **2020**, 265:110510. doi: 10.1016/j.jenvman.2020.110510.
45. Farinazzo, F.S.; Fernandes, M.T.C.; Mauro, C.S.I.; Garcia, S. Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from native Atlantic Forest juçara fruit. *Prep Biochem Biotechnol.* **2021**, pp 1-8. doi: 10.1080/10826068.2021.1931880.
46. Fathiyah, S.M.S.; Shahril, M.; Junaidi, Z. Oil palm frond juice and coconut water as alternative fermentation substrate for bacterial cellulose production. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng.* **2021**, 1092:012055. doi: 10.1088/1757-899X/1092/1/012055.
47. Ferreira, S.L.; Bruns, R.E.; Ferreira, H.S.; Matos, G.D.; David, J.M.; Brandão, G.C.; et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta.* 2007, 597(2), pp 179-186. doi: 10.1016/j.aca.2007.07.011.
48. Fialho, A.M.; Moreira, L.M., Granja, A.T.; Popescu, A.O.; Hoffmann, K.; Sá-Correia, I. Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2008**, 79, pp 889-900. doi: 10.1007/s00253-008-1496-0.
49. Franceschini, G.; Macchietto, S. Model-based design of experiments for parameter precision: state of the art. *Chem Eng Sci.* **2008**, 63(19), pp 4846-4872. doi: 10.1016/j.ces.2007.11.034.

50. Freitas, F.; Alves, V.D.; Reis, M.A. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* **2011**, 29(8), pp 388-98. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.03.008.
51. Freitas, F.; Torres, C.A.V.; Reis, M.A.M. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresour Technol.* **2017**, 245(Pt B), pp 1674-1683. doi: 10.1016/j.biortech.2017.05.092.
52. Fukuda, K.; Kono, H. Cost-benefit analysis and industrial potential of exopolysaccharides. In: *Microbial exopolysaccharides as novel and significant biomaterials*. Springer, **2021**, pp 303-339.
53. Galván, E.M.; Ielmini, M.V.; Patel, Y.N.; Bianco, M.I.; Franceschini, E.A.; Schneider, J.C.; et al. Xanthan chain length is modulated by increasing the availability of the polysaccharide copolymerase protein GumC and the outer membrane polysaccharide export protein GumB, *Glycobiology*. **2013**, 23(2), pp 259-272. doi: 10.1093/glycob/cws146.
54. Gao, H.; Lu, C.; Wang, H.; Wang, L.; Yang, Y.; Jiang, T.; et al. Production exopolysaccharide from *Kosakonia cowanii* LT-1 through solid-state fermentation and its application as a plant growth promoter. *Int J Biol Macromol.* 2020, 150, pp 955-964. doi: 10.1016/j.biortech.2019.02.053.
55. Goh, B.H.H.; Chong, C.T.; Ge, Y.; Ong, H.C.; Ng, J.H.; Tian, B.; et al. Progress in utilisation of waste cooking oil for sustainable biodiesel and biojet fuel production. *Energy Convers Manag.* **2020**, 223:113296. doi: 10.1016/j.enconman.2020.113296.
56. Gojgic-Cvijovic, G.D.; Jakovljevic, D.M.; Loncarevic, B.D.; Todorovic, N.M.; Pergal, M.V.; Ciric J.; et al. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *Int J Biol Macromol.* **2019**, 121, pp 142-151. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.019.
57. Gu, Y.; Zheng, J.; Feng, J.; Cao, M.; Gao, W.; Quan, Y.; et al. Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2017**, 101(10), pp

4163-4174. doi: 10.1007/s00253-017-8171-2.

58. Gupta, J.; Rathour, R.; Dupont, C.L.; Kaul, D.; Thakur, I.S. Genomic insights into waste valorized extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Bacillus* sp. ISTL8. *Environ Res.* **2021**, *192*:110277. doi: 10.1016/j.envres.2020.110277.

59. Han, H.M.; Kim, I.J.; Yun, E.J.; Lee, J.W.; Cho, Y.; Jin, Y.S.; et al. Overproduction of exopolysaccharide colanic acid by *Escherichia coli* by strain engineering and media optimization. *Appl Biochem Biotechnol.* **2021**, *193*(1), pp 111-127. doi: 10.1007/s12010-020-03409-4.

60. Han, M.; Xu, J-Z.; Liu, Z.M.; Qian, H.; Zhang, W.G. Co-production of microbial oil and exopolysaccharide by the oleaginous yeast: *Sporidiobolus pararoseus* grown in fed-batch culture. *RSC Adv.* **2018**, *8*, pp 3348-3356. doi: 10.1039/C7RA12813D.

61. Hao, L.; Liu, W.; Liu, K.; Shan, K.; Wang, C.; Xi, C.; et al. Isolation, optimization of fermentation conditions, and characterization of an exopolysaccharide from *Pseudoalteromonas agarivorans* Hao 2018. *Mar Drugs.* **2019**, *17*(12):703. doi: 10.3390/md17120703.

62. Hassler, R.A.; Doherty, D.H. Genetic engineering of polysaccharide structure: production of variants of xanthan gum in *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol Prog.* **1990**, *6*(3), pp 182-187.

63. He, C.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; Wang, G.; Wang, C.; Wang, D.; et al. Efficient pullulan production by *Aureobasidium pullulans* using cost-effective substrates. *Int J Biol Macromol.* **2021**, *186*, pp 544-553. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.068.

64. He, X.; He, F.; Hang, J.; Li, H.; Chen, Y.; Wei, P.; et al. Enhanced production of exopolysaccharides using industrial grade starch as sole carbon source. *Bioprocess Biosyst Eng.* **2018**, *41*(6), pp 811-817. doi: 10.1007/s00449-018-1915-2.

65. Hereher, F.; El Fallal, A.; Abou-Dobara, M.; Toson, E.; Abdelaziz, M.M. Cultural optimization of a new exopolysaccharide producer “*Micrococcus roseus*”.

*Beni-Seuf Univ J Basic Appl Sci.* **2018**, 7(4), pp 632-639. doi: 10.1016/j.bjbas.2018.07.007.

66. Hilares, R.T.; Resende, J.; Orsi, C.A.; Ahmed, M.A.; Lacerda, T.M.; da Silva, S.S.; et al. Exopolysaccharide (pullulan) production from sugarcane bagasse hydrolysate aiming to favor the development of biorefineries. *Int J Biol Macromol.* **2019**, 127, pp 169-177. doi: 10.1016/j.biteb.2020.100494.

67. Hosseini, H.; Ghorbani, M.; Meshginfar, N.; Mahoonak, A.S. A review on frying: procedure, fat, deterioration progress and health hazards. *J Am Oil Chem Soc.* **2016**, 93, 445-466. doi: 10.1007/s11746-016-2791-z.

68. Huang, H.; Li, X.; Wu, M.; Wang, S.; Li, G.; Ma, T. Cloning, expression and characterization of a phosphoglucomutase/phosphomannomutase from sphinganol-producing *Sphingomonas sanxanigenens*. *Biotechnol Lett.* **2013**, 35, pp 1265-1270. doi: 10.1007/s10529-013-1193-7.

69. Huang, J.; Zhu, S.; Li, C.; Zhang, C.; Ji, Y. Cost-effective optimization of gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* using corn steep liquor. *Prep Biochem Biotechnol.* **2020**, 50(2), pp 191-197. doi: 10.1080/10826068.2019.1692215.

70. Ibrahim, H.M.; Elkhidir, E.E. Response surface method as an efficient tool for medium optimisation. *Trends Appl Sci Res.* **2011**, 6(2), pp 121-129. doi: 10.3923/tasr.2011.121.129.

71. Ivakhniuk, M.; Voronenko, A.; Pirog, T. Peculiarities of microbial exopolysaccharide ethapolan synthesis on mixed waste oils. *Ukr Food J.* **2018**, 7(1), pp 96-104. doi: 10.24263/2304-974X-2018-7-1-9.

72. Jeong, J.P.; Kim, Y.; Hu, Y.; Jung, S. Bacterial succinoglycans: structure, physical properties, and applications. *Polymers (Basel).* **2022**, 14(2):276. doi: 10.3390/polym14020276.

73. Jones, K.M. Increased production of the exopolysaccharide succinoglycan enhances *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiosis with the host plant *Medicago truncatula*. *J Bacteriol.* **2012**, 194(16), pp 4322-4331. doi: 10.1128/JB.00751-12.

74. Karirat, T.; Saengha, W.; Deeseenthum, S.; Luang-In, V. Riceberry broken

rice and soybean meal as substrates for exopolysaccharide production by *Bacillus tequilensis* PS21. *Proceedings of 8th ICoFAB2021*. **2021**, pp 1-8. doi: 10.14457/MSU.res.2021.1.

75. Kazemi, M.; Khodaiyan, F.; Hosseini, S.S.; Najari, Z. An integrated valorization of industrial waste of eggplant: Simultaneous recovery of pectin, phenolics and sequential production of pullulan. *Waste Manag.* **2019**, 100, pp 101-111. doi: 10.1016/j.wasman.2019.09.013.

76. Kim, K.N.; Lee, Y.J.; Cho, D.H.; Ahn, K.H.; Hong, J.E.; Park, Y.I.; et al. A novel galactoglucomannan exopolysaccharide produced by oil fermentation with *Pseudozyma* sp. SY16. *Biotechnol Bioproc E.* **2020**, 25, pp 742-748. doi: 10.1007/s12257-020-0066-x.

77. Küçükaşık, F.; Kazak, H.; Güney, D.; Finore, I.; Poli, A.; Yenigün, O.; et al. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2011**, 89(6), pp 1729-1740. doi: 10.1007/s00253-010-3055-8.

78. Kumar, V.; Bhalla, A.; Rathore, A.S. Design of experiments applications in bioprocessing: concepts and approach. *Biotechnol Prog.* **2014**, 30(1), pp 86-99. doi: 10.1002/btpr.1821.

79. Lad, B.C.; Coleman, S.M.; Alper, H.S. Microbial valorization of underutilized and nonconventional waste streams. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **2021**, 0:kuab056. doi: 10.1093/jimb/kuab056.

80. Li, L.; Ma, Y. Effects of metal ions on growth,  $\beta$ -oxidation system, and thioesterase activity of *Lactococcus lactis*. *J Dairy Sci.* **2014**, 97(10), pp 5975-5982. doi: 10.3168/jds.2014-8047.

81. Li, N.; Huang, Y.; Liu, Z.; You, C.; Guo, B. Regulation of EPS production in *Lactobacillus casei* LC2W through metabolic engineering. *Lett Appl Microbiol.* **2015**, 61(6), pp 555-61. doi: 10.1111/lam.12492.

82. Li, N.; Wang, Y.; Zhu, P.; Liu, Z.; Guo, B.; Ren, J. Improvement of exopolysaccharide production in *Lactobacillus casei* LC2W by overexpression of NADH oxidase gene. *Microbiol Res.* **2015**, 171, pp 73-77. doi:

10.1016/j.micres.2014.12.006.

83. Li, Q.; Zhou, Y.; Ke, C.; Bai, Y.; Liu, X.; Li, S. Production of welan gum from cane molasses by *Sphingomonas* sp. FM01. *Carbohydr Polym.* 2020, 244:116485. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116485.

84. Li, X.; Wu, G.; Yang, F.; Meng, L.; Huang, J.; Zhang, H.; et al. Influence of fried food and oil type on the distribution of polar compounds in discarded oil during restaurant deep frying. *Food Chem.* 2019, 272, pp 12-17. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.08.023.

85. Liepins, J.; Balina, K.; Soloha, R.; Berzina, I.; Lukasa, L.K.; Dace, E. Glycolipid biosurfactant production from waste cooking oils by yeast: review of substrates, producers and products. *Fermentation.* 2021, 7(3):136. doi: 10.3390/fermentation7030136

86. Liu, C.; Sun, D.; Liu, J.; Zhu, J.; Liu, W. Recent advances and perspectives in efforts to reduce the production and application cost of microbial flocculants. *Bioresour Bioprocess.* 2021, 8:51. doi: 10.1186/s40643-021-00405-2.

87. Liu, G.; Zhao, X.; Chen, C.; Chi, Z.; Zhang, Y.; Cui, Q.; et al., Robust production of pigment-free pullulan from lignocellulosic hydrolysate by a new fungus co-utilizing glucose and xylose. *Carbohydr Polym.* 2020, 241:116400. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116400.

88. Liu, N.; Santala, S.; Stephanopoulos, G. Mixed carbon substrates: a necessary nuisance or a missed opportunity? *Curr Opin Biotechnol.* 2020, 62, pp 15-21. doi: 10.1016/j.copbio.2019.07.003.

89. Liu, P.; Chen, Z.; Yang, L.; Li, Q.; He, N. Increasing the bioflocculant production and identifying the effect of overexpressing *epsB* on the synthesis of polysaccharide and  $\gamma$ -PGA in *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact.* 2017, 16:163. doi: 10.1186/s12934-017-0775-9.

90. Liu, X.; Zhu, P.; Jiang, R.; Wu, L.; Feng, X.; Li, S.; et al. Enhancement of welan gum production in *Sphingomonas* sp. HT-1 via heterologous expression of *Vitreoscilla* hemoglobin gene. *Carbohydr Polym.* 2016, 156, pp 135-142. doi:

10.1016/j.carbpol.2016.08.081.

91. Loizides, M.I.; Loizidou, X.I.; Orthodoxou, D.L.; Petsa, D. Circular bioeconomy in action: collection and recycling of domestic used cooking oil through a social, reverse logistics system. *Recycling*. **2019**, 4(2):16. doi: 10.3390/recycling4020016.

92. Lopes, M.; Miranda, S.M.; Belo, I. Microbial valorization of waste cooking oils for valuable compounds production – a review. *Crit Rev Environ Sci Technol*. **2020**, 50(24), pp 2583-26161. doi: 10.1080/10643389.2019.1704602.

93. Maalej, H.; Hmidet, N.; Boisset, C.; Buon, L.; Heyraud, A.; Nasri, M. Optimization of exopolysaccharide production from *Pseudomonas stutzeri* AS22 and examination of its metal-binding abilities. *J Appl Microbiol*. **2015**, 118(2), pp 356-67. doi: 10.1111/jam.12688.

94. Mahmoodi, M.; Nassireslami, E. Control algorithms and strategies of feeding for fed-batch fermentation of *Escherichia coli*: a review of 40 years of experience. *Prep Biochem Biotechnol*. **2021**, 1-12. doi: 10.1080/10826068.2021.1998112.

95. Majee, S.B.; Avlani, D.; Biswas, G.R. Rheological behavior and pharmaceutical applications of bacterial exopolysaccharides. *J Appl Pharm Sci*. **2017**, 7(9), pp 224-232. doi: 10.7324/JAPS.2017.70931.

96. Mandenius, C.F.; Brundin, A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnol Prog*. **2008**, 24(6), pp 1191-203. doi: 10.1002/btpr.67. PMID: 19194932.

97. Mannu, A.; Ferro, M.; Pietro, M.E.D.; Mele, A. Innovative applications of waste cooking oil as raw material. *Sci Prog*. **2019**, 102(2), pp 153-160. doi: 10.1177/0036850419854252.

98. Mannu, A.; Garroni, S.; Ibanez Porras, J.; Mele, A. Available technologies and materials for waste cooking oil recycling. *Processes*. **2020**, 8(3):366. doi: 10.3390/pr8030366.

99. Maotsela, T.; Danha, G.; Muzenda, E. Utilization of waste cooking oil and

tallow for production of toilet “bath” soap. *Procedia Manuf.* **2019**, 35, pp 541-545. doi: 10.1016/j.promfg.2019.07.008.

100. Marchetti, R.; Vasmara, C.; Bertin, L.; Fiume, F. Conversion of waste cooking oil into biogas: perspectives and limits. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2020**, 104, pp 2833-2856. doi: 10.1007/s00253-020-10431-3.

101. Martinez-Burgos, W.J.; Bittencourt Sydney, E.; Bianchi Pedroni Medeiros, A.; Magalhães, A.I.; de Carvalho, J.C.; Karp, S.G.; et al. Agro-industrial wastewater in a circular economy: Characteristics, impacts and applications for bioenergy and biochemicals. *Bioresour Technol.* 2021, 341:125795. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125795.

102. Martínez-Gutiérrez, E. Biogas production from different lignocellulosic biomass sources: advances and perspectives. *3 Biotech.* **2018**, 8:233. doi: 10.1007/s13205-018-1257-4.

103. Martins, A.; Vieira, H.; Gaspar, H.; Santos, S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Mar Drugs.* **2014**, 12(2), pp 1066-1101. doi: 10.3390/md12021066.

104. Moghannem, S.A.M.; Farag, M.M.S.; Shehab, A.M.; Azab, M.S. Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Braz J Microbiol.* **2018**, 49(3), pp 452-462. doi: 10.1016/j.bjm.2017.05.012.

105. Mohammed, J.N.; Wan Dagang, W.R.Z. Implications for industrial application of bioflocculant demand alternatives to conventional media: waste as a substitute. *Water Sci Technol.* **2019**, 80(10), pp 1807-1822. doi: 10.2166/wst.2020.025.

106. Mohd Nadzir, M.; Nurhayati, R.W.; Idris, F.N.; Nguyen, M.H. Biomedical applications of bacterial exopolysaccharides: a review. *Polymers (Basel).* **2021**, 13(4):530. doi: 10.3390/polym13040530.

107. Monjazebe Marvdashti, L.; Abdolshahi, A.; Hedayati, S.; Sharifi-Rad, M.; Iriti, M.; Salehi, B.; et al. Pullulan gum production from low-quality fig syrup using *Aureobasidium pullulans*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* **2018**, 64(8), pp 22-26. doi:

10.14715/cmb/2018.64.8.4.

108. Moscovici, M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Front Microbiol.* **2015**, 6:1012. doi: 10.3389/fmicb.2015.01012.

109. Mummaleti, G.; Sarma, C.; Kalakandan, S.; Sivanandham, V.; Rawson, A.; Anandharaj, A. Optimization and extraction of edible microbial polysaccharide from fresh coconut inflorescence sap: An alternative substrate. *LWT – Food Sci. Technol.* **2021**, 138:110619. doi: 10.1016/j.lwt.2020.110619.

110. Mummaleti, G.; Sarma, C.; Kalakandan, S.K.; Gazula, H.; Sivanandham, V.; Anandharaj, A. Characterization of levan produced from coconut inflorescence sap using *Bacillus subtilis* and its application as a sweetener. *LWT – Food Sci. Technol.* **2022**, 154:112697. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112697.

111. Nascimento, L.; Ribeiro, A.; Ferreira, A.; Valério, N.; Pinheiro, V.; Araújo, J.; et al. Turning waste cooking oils into biofuels – valorization technologies: a review. *Energies.* **2022**, 15(1):116. doi: 10.3390/en15010116.

112. Navon-Venezia, S.; Zosim, Z.; Gottlieb, A.; Legmann, R. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl Environ Microbiol.* 1995, 61(9), pp 3240-3244.

113. Nicolaus, B.; Kambourova, M.; Oner, E.T. Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environ Technol.* **2010**, 31(10), 1145-1158. doi: 10.1080/09593330903552094.

114. Niu, Y.; Wu, J.; Wang, W.; Chen, Q. Production and characterization of a new glycolipid, mannosylerythritol lipid, from waste cooking oil biotransformation by *Pseudozyma aphidis* ZJUDM34. *Food Sci Nutr.* **2019**, 7(3), pp 937-948. doi: 10.1002/fsn3.880.

115. Nwosu, I.G.; Abu, G.O.; Agwa, K.O. Production of microbial exopolysaccharide by cost-effective medium optimization method. *J Adv Microbiol.* **2019**, 19(2), pp 1-13. doi: 10.9734/jamb/2019/v19i230189.

116. Oesterle, S.; Wuethrich, I.; Panke, S. Toward genome-based metabolic engineering in bacteria. *Adv Appl Microbiol.* **2017**, 101, pp 49-82. doi:

10.1016/bs.aambs.2017.07.001.

117. Okoro, O.V.; Gholipour, A.R.; Sedighi, F.; Shavandi, A.; Hamidi, M. Optimization of exopolysaccharide (EPS) production by *Rhodotorula mucilaginosa* sp. GUMS16. *ChemEngineering*. **2021**, 5(3):39. doi: 10.3390/chemengineering5030039.

118. Oleksy-Sobczak, M.; Klewicka, E. Optimization of media composition to maximize the yield of exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Probiotics & Antimicro Prot.* **2020**, 12, pp 774-783. doi: 10.1007/s12602-019-09581-2.

119. Oleksy-Sobczak, M.; Klewicka, E.; Piekarska-Radzik, L. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains – optimization of synthesis and extraction conditions. *LWT – Food Sci Technol.* **2020**, 122:109055. doi: 10.1016/j.lwt.2020.109055.

120. Oliveira, J.; Michelon, M.; Burkert, C. Biotechnological potential of soybean molasses for the production of extracellular polymers by diazotrophic bacteria. *Biocatal Agric Biotechnol.* **2020**, 25:101609. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101609.

121. Öner, E.T.; Hernández, L.; Combie, J. Review of levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnol Adv.* **2016**, 34(5), pp 827-844. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.05.002.

122. Orak, T.; Caglar, O.; Ortucu, S.; Ozkan, H.; Taskin, M. Chicken feather peptone: A new alternative nitrogen source for pigment production by *Monascus purpureus*. *J Biotechnol.* **2018**, 271, pp 56-62. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.02.010.

123. Orjuela, A.; Clark, J. Green chemicals from used cooking oils: Trends, challenges, and opportunities. *Curr Opin Green Sustain Chem.* **2020**, 26:100369. doi: 10.1016/j.cogsc.2020.100369.

124. Ortega-de la Rosa, N.D.; Vázquez-Vázquez, J.L.; Huerta-Ochoa, S.; Gimeno, M. Stable bioemulsifiers are produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 growing in different carbon sources. *Bioprocess Biosyst Eng.* **2018**, 41, pp 859-869. doi: 10.1007/s00449-018-1920-5.

125. Ozdal, M.; Başaran Kurbanoglu, E. Use of chicken feather peptone and

sugar beet molasses as low cost substrates for xanthan production by *Xanthomonas campestris* MO-03. *Fermentation*. **2019**, 5(1):9. doi: 10.3390/fermentation5010009.

126. Palmonari, A.; Cavallini, D.; Sniffen, C.J.; Fernandes, L.; Holder, P.; Fagioli, L.; et al. Short communication: characterization of molasses chemical composition. *J Dairy Sci*. 2020, 103(7), pp 6244-6249. doi: 10.3168/jds.2019-17644.

127. Pan, L.; Wang, Q.; Qu, L.; Liang, L.; Han Y, Wang X, Zhou Z. Pilot-scale production of exopolysaccharide from *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 and its application in set yogurt. *J Dairy Sci*. **2022**, 105(2), pp 1072-1083. doi: 10.3168/jds.2021-20997.

128. Panadare D.C.; Rathod, V.K. Applications of waste cooking oil other than biodiesel: a review. *Iran J Chem Eng*. **2015**, 12(3), pp 55-76.

129. Petrova, P.; Arsov, A.; Ivanov, I.; Tsigoriyna, L.; Petrov, K. New Exopolysaccharides produced by *Bacillus licheniformis* 24 display substrate-dependent content and antioxidant activity. *Microorganisms*, **2021**, 9(10):2127. doi: 10.3390/microorganisms9102127.

130. Pirog, T.P.; Ivakhniuk, M.O.; Voronenko, A.A. Exopolysaccharides synthesis on industrial waste. *Biotechnol acta*. **2016**, 9(2), pp 7-18. doi: 10.15407/biotech9.02.007.

131. Pirog, T.P.; Voronenko, A.A.; Ivakhniuk, M.O. Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan biosynthesis on mixture of molasses and sunflower oil. *Biotechnol acta*. **2017**, 10(4), pp 25-33. doi: 10.15407/biotech10.04.025.

132. Pirog, T.P.; Voronenko, A.A.; Ivakhniuk, M.O. Non-traditional producers of microbial exopolysaccharides. *Biotechnol acta*. **2018**, 11(4), pp 5-27. doi: 10.15407/biotech11.04.005.

133. Qamar, S.A.; Asgher, M.; Bilal, M. Sustainable production, optimization, and partial characterization of exopolysaccharides by *Macroccoccus brunensis*. *Waste Biomass Valor*. **2021**, 12, pp 6847-6859. doi: 10.1007/s12649-021-01479-x.

134. Ragavan, M.L.; Das, N. Optimization of exopolysaccharide production by probiotic yeast *Lipomyces starkeyi* VIT-MN03 using response surface methodology and

its applications. *Ann Microbiol.* **2019**, 69, pp 515–530. doi: 10.1007/s13213-019-1440-9.

135. Raghunandan, K.; Kumar, A.; Kumar, S.; Permaul, K.; Singh, S. Production of gellan gum, an exopolysaccharide, from biodiesel-derived waste glycerol by *Sphingomonas* spp. *3 Biotech.* **2018**, 8:71. doi: 10.1007/s13205-018-1096-3.

136. Rahman, S.S.A.; Venkatachalam, P.; Karuppiah, S. Cost-effective production of dextran using *Saccharum officinarum* juice (SOJ) as a potential feedstock: downstream processing and characterization. *Biomass Conv Bioref.* **2020**, pp 1-13. doi: 10.1007/s13399-020-00926-4.

137. Rana, S.; Upadhyay, L.S.B. Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *Int J Biol Macromol.* **2020**, 157, pp 577-583. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.084.

138. Rao, R.S.; Kumar, C.G.; Prakasham, R.S.; Hobbs, P.J. The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: a critical appraisal. *Biotechnol J.* **2008**, 3(4), pp 510-23. doi: 10.1002/biot.200700201.

139. Ratledge C. Biodegradation of oils, fats and fatty acids. In: *Biochemistry of microbial degradation*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, **1994**. 590 p.

140. Ray, R.C.; Moorthy, S.N. Exopolysaccharide (pullulan) production from cassava starch residue by *Aureobasidium pullulans* strain MTCC 1991. *J Sci Ind Res.* **2007**, 66(3), pp 252-255.

141. Rehm, B.H. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Microbiol.* **2010**, 8(8), pp 578-592. doi: 10.1038/nrmicro2354.

142. Remminghorst, U.; Rehm, B. In vitro alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* **2006**, 72(1), pp 298-305. doi: 10.1128/AEM.72.1.298-305.2006.

143. Robak, K.; Balcerek, M. Current state-of-the-art in ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Microbiol Res.* **2020**, 240:126534. doi: 10.1016/j.micres.2020.126534.

144. Roca, C.; Alves, V.D.; Freitas, F.; Reis, M.A. Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Front Microbiol.* **2015**, *6*:288. doi: 10.3389/fmicb.2015.00288.
145. Rončević, Z.; Bajić, B.; Vlajkov, V.; Dodić, S.; Grahovac, J.; Jokić, A.; et al. Optimisation of xanthan production on glycerol-based medium using response surface methodology. *Braz J Chem Eng.* **2020**, *37*(4), pp 617-627. doi: 10.1007/s43153-020-00062-6.
146. Rosenberg, E.; Rubinovitz, C.; Gottlieb, A.; Rosenhak, S. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Appl Environ Microbiol.* 1988, *54*(2), 317-322.
147. Rühmann, B.; Schmid, J.; Sieber, V. High throughput exopolysaccharide screening platform: from strain cultivation to monosaccharide composition and carbohydrate fingerprinting in one day. *Carbohydr Polym.* **2015**, *122*, pp 212-220. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.021.
148. Ruiz-Villafán, B.; Cruz-Bautista, R.; Manzo-Ruiz, M.; Passari, A.K.; Villarreal-Gómez, K.; Rodríguez-Sanoja, R.; et al. Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation, an old but not well-established regulatory system. *Microb Biotechnol.* **2021**, *0*, pp 1-15. doi: 10.1111/1751-7915.13791.
149. Saadat, Y.R.; Khosroushahi, A.Y.; Gargari, B.P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydr Polym.* **2019**, *217*, pp 79-89. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.025.
150. Saeed, S.; Tayyab, M.; Mehmood, T.; Awan, A.R.; Firyal, S.; Nadeem, F.; et al. Valorization of potato peel for production of alginate and optimization of the process through response surface methodology (RSM) by using *Azotobacter nigricans*. *Biomass Conv Bioref.* **2021**, pp 1-9. doi: 10.1007/s13399-021-01357-5.
151. Saini, R.; Hegde, K.; Osorio-Gonzalez, C.S.; Brar, S.K.; Vezina, P. Evaluating the potential of *Rhodospiridium toruloides*-1588 for high lipid production

using undetoxified wood hydrolysate as a carbon source. *Energies*. **2020**, 13(22):5960. doi: 10.3390/en13225960.

152. Schilling, C.; Badri, A.; Sieber, V.; Koffas, M.; Schmid, J. Metabolic engineering for production of functional polysaccharides. *Curr Opin Biotechnol*. **2020**, 66, pp 44-51. doi: 10.1016/j.copbio.2020.06.010.

153. Schmid, J. Recent insights in microbial exopolysaccharide biosynthesis and engineering strategies. *Curr Opin Biotechnol*. **2018**, 53, pp 130-136. doi: 10.1016/j.copbio.2018.01.005.

154. Schmid, J.; Heider, D.; Wendel, N.J.; Sperl, N.; Sieber, V. Bacterial glycosyltransferases: challenges and opportunities of a highly diverse enzyme class toward tailoring natural products. *Front Microbiol*. **2016**, 7:182. doi: 10.3389/fmicb.2016.00182.

155. Schmid, J.; Sieber, V.; Rehm, B. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol*. **2015**, 6:496. doi: 10.3389/fmicb.2015.00496.

156. Sengupta, D.; Datta, S.; Biswas, D. Exploring two contrasting surface-active exopolysaccharides from a single strain of *Ochrobactrum* utilizing different hydrocarbon substrates. *J Basic Microbiol*. **2019**, 59(8), pp 820-833. doi: 10.1002/jobm.201900080.

157. Sengupta, D.; Datta, S.; Biswas, D. Towards a better production of bacterial exopolysaccharides by controlling genetic as well as physico-chemical parameters. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2018**, 102(4), pp 1587-1598. doi: 10.1007/s00253-018-8745-7.

158. Shukla, A.; Mehta, K.; Parmar, J.; Pandya, J.; Saraf, M. Depicting the exemplary knowledge of microbial exopolysaccharides in a nutshell. *Eur Polym J*. **2019**, 119, pp 298-310. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.07.044.

159. Singh, R.S.; Kaur, N.; Kennedy, J.F. Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review. *Carbohydr Polym*. **2019**, 217, pp 46-57. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.050.

160. Singh, V.; Haque, S.; Niwas, R.; Srivastava, A.; Pasupuleti, M.; Tripathi, C.K. Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Front Microbiol.* **2017**, 7:2087. doi: 10.3389/fmicb.2016.02087.
161. Sonawdekar, S.; Gupte, A. Production and characterization of exopolysaccharide produced by oil emulsifying bacteria. *Int J Curr Microbiol App Sci.* **2016**, 5(2), pp 254-262. doi: 10.20546/ijcmas.2016.502.028.
162. Soumya, M.P.; Sasikumar, K.; Pandey, A.; Nampoothiri, K.M. Cassava starch hydrolysate as sustainable carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum*. *Bioresour Technol Rep.* **2019**, 6, pp 85-88. doi: 10.1016/j.biteb.2019.02.012.
163. Srikanth, R.; Reddy, C.H.; Siddartha, G.; Ramaiah, M.J.; Uppuluri, K.B. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr Polym.* **2015**, 120, pp 102-114. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.12.003.
164. Srinivas, B.; Naga Padma, P. Statistical optimization of medium components by response surface methodology for dextran production by *Weissella confusa*. *Int J Sci Appl Res.* **2016**, 3(2), pp 47-57.
165. Steinberg, D.M.; Bursztyn, D. Response surface methodology in biotechnology. *Qual Eng.* **2010**, 22, pp 78-87. doi: 10.1080/08982110903510388.
166. Stingele, F.; Vincent, S.J.F.; Faber, E.J.; Newell, J.W.; Kamerling, J.P.; Nesser, J.R. Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into *Lactococcus lactis* MG1363: production and characterization of an altered polysaccharide. *Mol Microbiol.* **1999**, 32(6), pp 1287-1295. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01441.x.
167. Sun, M.L.; Zhao, F.; Zhang, X.K.; Zhang, X.Y.; Zhang, Y.Z.; Song, X.Y.; et al. Improvement of the production of an Arctic bacterial exopolysaccharide with protective effect on human skin cells against UV-induced oxidative stress. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2020**, 104(11), pp 4863-4875. doi: 10.1007/s00253-020-10524-z.
168. Sun, S.; Zhang, Z.; Luo, Y.; Zhong, W.; Xiao, M.; Yi, W.; et al. Exopolysaccharide production by a genetically engineered *Enterobacter cloacae* strain

for microbial enhanced oil recovery. *Bioresour Technol.* **2011**, 102(10), pp 6153-8. doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.005.

169. Sun, X.; Zhang, J. Bacterial exopolysaccharides: chemical structures, gene clusters and genetic engineering. *Int J Biol Macromol.* **2021**, 173, pp 481-490. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.139.

170. Suryawanshi, N.; Naik, S.; Eswari, J.S. Extraction and optimization of exopolysaccharide from *Lactobacillus* sp. using response surface methodology and artificial neural networks. *Prep Biochem Biotechnol.* **2019**, 49(10), pp 987-996. doi: 10.1080/10826068.2019.1645695.

171. Svensson, M.; Waak, E.; Svensson, U.; Rådström, P. Metabolically improved exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* and its influence on the rheological properties of fermented milk. *Appl Environ Microbiol.* **2005**, 71(10), pp 6398-6400. doi: 10.1128/AEM.71.10.6398-6400.2005.

172. Tomulescu, C.; Moscovici, M.; Stoica, R.M.; Albu, G.B.; Sevcenco, C.; Vamanu, A. Investigation of culture conditions by Response Surface Methodology and kinetic modeling for exopolysaccharide production by *Klebsiella oxytoca* ICCF 419 strain, using lactose as substrate. *Rom Biotechnol Lett.* **2020**, 25(6), pp 2033-2044. doi: 10.25083/rbl/25.6/2033.2044.

173. Uzoigwe, C.; Grant Burgess, J.; Ennis, C.J.; Rahman, P.K.S.M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Front Microbiol*, **2015**, 6:245. doi: 10.3389/fmicb.2015.00245.

174. Vaishnav, A.; Upadhyay, K.; Tipre, D.; Dave, S. Utilization of mixed fruit waste for exopolysaccharide production by *Bacillus species* SRA4: medium formulation and its optimization. *3 Biotech*, 2020, 10:550. doi: 10.1007/s13205-020-02545-2.

175. Valdez, A.L.; Babot, J.D.; Schmid, J.; Delgado, O.D.; Fariña, J.I. Scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126 from amylose and sugarcane molasses-based media: promising insights for sustainable and ecofriendly scaling-up. *J Polym Environ.* 2019, 27, pp 2804-2818. doi: 10.1007/s10924-019-01546-4.

176. Veerapandian, B.; Shanmugam, S.R.; Varadhan, S.; Sarwareddy, K.K.; Mani, K.P.; Ponnusami, V. Levan production from sucrose using chicken feather peptone as a low cost supplemental nutrient source. *Carbohydr Polym.* **2020**, *227*:115361. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115361.
177. Velmurugan, R.; Incharoensakdi, A. Overexpression of glucose-6-phosphate isomerase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 with disrupted glycogen synthesis pathway improves exopolysaccharides synthesis. *Algal Research*, **2021**, *57*:102357. doi: 10.1016/j.algal.2021.102357.
178. Vinothini, G.; Latha, S.; Arulmozhi, M.; Dhanasekaran, D. Statistical optimization, physio-chemical and bio-functional attributes of a novel exopolysaccharide from probiotic *Streptomyces griseorubens* GD5. *Int J Biol Macromol.* **2019**, *134*, pp 575-587. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.011.
179. Viveka, R.; Varjani, S.; Ekambaram, N. Valorization of cassava waste for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* MTCC 1991. *Energy Environ.* **2020**, *32*(6), pp 1086-1102. doi: 10.1177/0958305X20908065.
180. Wang, J.; Salem, D.R.; Sani, R.K. Extremophilic exopolysaccharides: a review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydr Polym.* **2019**, *205*, pp 8-26. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.10.011.
181. Wang, L.; Wu, L.; Chen, Q.; Li, S.; Zhu, Y.; Wu, J.; et al. Development of sugarcane resource for efficient fermentation of exopolysaccharide by using a novel strain of *Kosakonia cowanii* LT-1. *Bioresour Technol.* **2019**, *280*, pp 247-254. doi: 10.1016/j.biortech.2019.02.053.
182. Wang, Q.Q.; Lu, Y.; Ren, Z.Y.; Chi, Z.; Liu, G.L.; Chi, Z.M. CreA is directly involved in pullulan biosynthesis and regulation of *Aureobasidium melanogenum* P16. *Curr Genet.* **2017**, *63*(3), pp 471-485. doi: 10.1007/s00294-016-0650-y.
183. Williams, A.; Gedeon, K.S.; Vaidyanathan, D.; Yu, Y.; Collins, C.H.; Dordick, J.S.; et al. Metabolic engineering of *Bacillus megaterium* for heparosan

biosynthesis using *Pasteurella multocida* heparosan synthase, PmHS2. *Microb Cell Factories*. **2019**, 18:132. doi: 10.1186/s12934-019-1187-9.

184. Woo, J.E.; Seong, H.J.; Lee, S.Y.; Jang, Y-S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of hyaluronic acid from glucose and galactose. *Front Bioeng Biotechnol*. **2019**, 7:351. doi: 10.3389/fbioe.2019.00351.

185. Wu, M.; Qu, J.; Tian, X.; Zhao, X.; Shen, Y.; Shi, Z. Tailor-made polysaccharides containing uniformly distributed repeating units based on the xanthan gum skeleton. *Int J Biol Macromol*. **2019**, 131, pp 646-653. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.130.

186. Wu, M.; Qu, J.; Tian, X.; Zhao, X.; Shen, Y.; Shi, Z.; et al. Tailor-made polysaccharides containing uniformly distributed repeating units based on the xanthan gum skeleton. *Int J Biol Macromol*. **2019**, 131, pp 646-653. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.03.130.

187. Wu, M.; Shi, Z.; Tian, X.; Shen, Y.; Qu, J.; Dai, X.; et al. Enhancement of transparent hydrogel sanxan production in *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 via rational and random gene manipulation. *Carbohydr Polym*. **2018**, 189, pp 210-217. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.02.027.

188. Wu, M.; Zhao, X.; Shen, Y.; Shi, Z.; Li, G., Ma, T. Efficient simultaneous utilization of glucose and xylose from corn straw by *Sphingomonas sanxanigenens* NX02 to produce microbial exopolysaccharide. *Bioresour Technol*. 2021, 319:124126. doi: 10.1016/j.biortech.2020.124126.

189. Xiaoyan, L.; Yu, X.; Lv, J.; Xu, J.; Xia, J.; Wu, Z.; et al. A cost-effective process for the coproduction of erythritol and lipase with *Yarrowia lipolytica* M53 from waste cooking oil. *Food Bioprod Process*. **2017**, 103, pp 86-94. doi: 10.1016/j.fbp.2017.03.002.

190. Xiong, Y.W.; Ju, X.Y.; Li, X.W.; Gong, Y.; Xu, M.J.; Zhang, C.M. et al. Fermentation conditions optimization, purification, and antioxidant activity of exopolysaccharides obtained from the plant growth-promoting endophytic actinobacterium *Glutamicibacter halophytocola* KLBMP 5180. *Int J Biol Macromol*.

2020, 153, pp 1176-1185. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.247.

191. Xiong, Z.; Chen, H.; Song, X.; Xia, Y.; Ai, L. Rapid isolation of exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* based on molecular marker screening. *J Sci Food Agric.* **2022**, 102(2), pp 862-867. doi: 10.1002/jsfa.11398.

192. Yildiz, H.; Karatas, N. Microbial exopolysaccharides: resources and bioactive properties. *Process Biochem.* **2018**, 72, pp 41-46. doi: 10.1016/j.procbio.2018.06.009.

193. Yztürk, S.; Yalık, P.; Yzdamar, T.H. Fed-batch biomolecule production by *Bacillus subtilis*: a state of the art review. *Trends Biotechnol.* **2016**, 34(4), pp 329-345. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.12.008.

194. Zayed, A.; Mansour, M.K.; Sedeek, M.S.; Habib, M.H.; Ulber, R.; Farag, M.A. Rediscovering bacterial exopolysaccharides of terrestrial and marine origins: novel insights on their distribution, biosynthesis, biotechnological production, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol.* **2021**, pp 1-21. doi: 10.1080/07388551.2021.1942779.

195. Zayed, A.; Mansour, M.K.; Sedeek, M.S.; Habib, M.H.; Ulber, R.; Farag, M.A. Rediscovering bacterial exopolysaccharides of terrestrial and marine origins: novel insights on their distribution, biosynthesis, biotechnological production, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol.* **2021**, pp 1-21. doi: 10.1080/07388551.2021.1942779.

196. Zhang, L.; Zhao, B.; Liu, C.J.; Yang, E. Optimization of biosynthesis conditions for the production of exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the exopolysaccharides antioxidant activity test. *Indian J Microbiol.* **2020**, 60(3), pp 334-345. doi: 10.1007/s12088-020-00865-8.

197. Zhang, S.; Wang, J.; Jiang, H. Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a by-product of sugar industry. *Food Chem.* **2021**, 346:128860. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.128860.

198. Zhao, D.; Liu, L.; Jiang, J.; Guo, S.; Ping, W.; Ge, J. The response surface optimization of exopolysaccharide produced by *Weissella confusa* XG-3 and its

rheological property. *Prep Biochem Biotechnol.* **2020**, 50(10), pp 1014-1022. doi: 10.1080/10826068.2020.1780609.

199. Пирог, Т.П.; Корж, Ю.В. Етаполан – мікробний екзополісахарид мультифункціонального призначення. *Біополімери і клітина.* **2006**, 22(3), с 171-185. doi: 10.7124/bs.00072E.

200. Пирог, Т.П.; Савчук, О.М.; Гарбарчук, С.О. Вплив органічних кислот на синтез мікробного полісахариду етаполану на суміші C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> субстратів. *Харчова промисловість.* **2012**, 13, с 61-65.

201. Пирог, Т.П.; Шулякова, М.О.; Шевчук, Т.А. Змішані субстрати у природних умовах і біотехнологічних процесах. *Biotechnol acta.* **2013**, 6(6), с 28-44. doi: 10.15407/biotech6.06.028.

202. Пирог, Т.П.; Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А. Синтез мікробних екзополісахаридів на нетрадиційних субстратах. *Наукові праці Національного університету харчових технологій.* **2021**, 27(1), с 42-52.

203. Підгорський, В.С.; Іутинська, Г.О.; Пирог, Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. Київ: Наукова думка, **2010**. 327 с.

204. Руденко В.М. Математична статистика. Київ: Центр учбової літератури, **2012**. 304 с.

## ДОДАТКИ

### ДОДАТОК А. Акт апробації результатів у навчальний процес

Міністерство освіти і науки України  
Національний університет харчових технологій

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Ректор НУХТ

О.Ю. Шевченко

2022 р.



АКТ

впровадження результатів науково-дослідних, дослідно-конструкторських, дисертаційних робіт у навчальний процес вищих навчальних закладів

Замовник Національний університет харчових технологій  
(найменування організації, установи)

Шевченко О.Ю.  
(П.І.Б. керівника)

Дійсним актом підтверджується, що результати наукової роботи на тему: «Трансформація суміші відпрацьованої олії з C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратами в біополімер мультифункціонального призначення», що виконувалась згідно плану науково-дослідної роботи кафедри біотехнології і мікробіології «Розробка високоефективних ресурсозберігаючих біотехнологій з метою їх впровадження у мікробіологічну, фармацевтичну та харчову промисловість» (2016-2020 рр., № державної реєстрації 0114U003437) та «Біотехнологічний потенціал мікроорганізмів природних та техногенних екосистем (2019-2023 рр., № державної реєстрації 0119U001485).

виконаної на кафедрі біотехнології і мікробіології  
(найменування кафедри)

виконуваної з 2018 по 2022  
(термін виконання)

впроваджені у навчальний процес кафедри біотехнології і мікробіології

**1. Вид впроваджених результатів:** Утилізація токсичних відходів біоконверсією у практично цінні метаболіти широкого спектру застосування.

**2. Форма впровадження:** модулі навчальних дисциплін «Новітні тренди у природоохоронних технологіях», «Інтенсифікація технологій мікробного синтезу» та «Змішані субстрати у природних умовах та біотехнологічних процесах» для підготовки докторів філософії за спеціальністю 162 «Біотехнології і біоінженерія».

**3. Новизна результатів науково-дослідних робіт:** Нині мікробні екзополісахариди завдяки здатності до змінення реологічних характеристик водних систем, емульгування, суспендування, гелеутворення широко використовуються у нафто- і гірничодобувній, харчовій, парфумерній, хімічній та текстильній промисловості, сільському господарстві. Незважаючи на тривалу

історію вивчення мікробних полісахаридів, для їх біосинтезу до теперішнього часу використовують тільки дорогі вуглеводні субстрати. Встановлено можливість заміни рафінованої соняшникової олії у суміші з ацетатом, етанолом або мелясою на різні типи відпрацьованої (після смаження картоплі, м'яса, овочів та змішаної після смаження різних продуктів). Розроблено технології одержання етаполану на суміші відпрацьованої соняшникової олії та C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів (ацетат, етанол, меляса), що включають: 1) вирощування інокуляту на монособстраті відпрацьованій олії; 2) використання як джерела азоту нітрату калію; 3) підвищення вмісту Mg<sup>2+</sup> до 5 мМ у середовищі культивування; 4) дробне внесення субстратів. Реалізація таких підходів дала змогу підвищити синтез етаполану до 16-18 г/л, що вище ніж на відповідних олієвмісних монособстратах (12-14 г/л), або суміші глюкози (меляси) та C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>-субстратів (ацетат, етанол, фумарат) (10-14 г/л).


#### **4. Перелік курсів і дисциплін, у рамках яких викладені результати НДР:**

Результати наукових досліджень увійшли до курсів лекцій з дисциплін «Загальна біотехнологія», «Природоохоронні біотехнології» для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр», «Природознавча мікробіологія» для здобувачів освітнього ступеня «магістр» спеціальності 162 «Біотехнології і біоінженерія», а також використані у курсовому та дипломному проектуванні.

#### **5. Соціальний і науково-технічний ефект:**

Однією із глобальних екологічних проблем сучасності є пошук методів утилізації або повторного використання промислових відходів. Слід зазначити, що небезпечними є не лише відходи, що містять токсичні речовини (наприклад, фенол та його похідні), а й відходи, які потрапляють у навколишнє середовище у неконтрольованій кількості, наприклад, олієвмісні (відходи оліє-жирового виробництва, пересмажена олія після використання у закладах громадського харчування тощо). Нині у світі існує проблема утилізації відпрацьованої олії, оскільки лише в Європі її щоденно утворюється 1,85–2,65 млн л. Крім того даний відхід є надзвичайно канцерогенним (містить акролеїн – токсичний альдегід, акриламід, який здатний руйнувати ДНК, гетероциклічні аміни, що спричиняють серцеві захворювання, а також полімери жирних кислот, вільні радикали). В Україні викиди відпрацьованої олії в середовище не регламентуються. Використання відпрацьованої олії для одержання полісахариду етаполану дає змогу вирішити одночасно кілька важливих проблем сьогодення: утилізувати токсичні відходи і зберегти довкілля, підвищити ефективність технології мікробного синтезу і знизити собівартість цільового продукту широкого спектру застосування (підвищення вторинного нафтовидобутку, хімічна, харчова промисловість, сільське господарство та ін.).

**Керівник НДР**

  
(підпис)

(Пирог Т.П.)  
(ініціали, прізвище)

**ВИКОНАВЕЦЬ**

  
(підпис)

(Вороненко А.А.)  
(ініціали, прізвище)

« 12 » вересня 2022 р.

« 12 » вересня 2022 р.

## ДОДАТОК Б. Патент на винахід





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120560** (13) **C2**  
(51) МПК  
**C12P 19/04** (2006.01)  
**C12P 1/04** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12R 1/01** (2006.01)  
**C07K 14/22** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

- (21) Номер заявки: а 2018 05746  
(22) Дата подання заявки: 23.05.2018  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 26.12.2019  
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.12.2018, Бюл.№ 23  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.12.2019, Бюл.№ 24  
(72) Винахідник(и):  
**Пирог Тетяна Павлівна (UA),  
Вороненко Андрій Анатолійович (UA),  
Ярош Марина Борисівна (UA)**  
(73) Власник(и):  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ  
ТЕХНОЛОГІЙ,**  
вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01033 (UA)

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
SU 595379 A, 28.02.1978  
US 4400467 A, 23.08.1983  
US 4418145 A, 29.11.1983  
UA 97910 C2, 26.03.2012  
UA 110593 C2, 12.01.2016  
UA 108323 C2, 10.04.2014  
UA 11498 C2, 10.05.2016  
UA 39399 U, 23.02.2009  
UA 91231 C2, 12.07.2008  
Ivahniuk, M. Synthesis of exopolysaccharide ethapolan during cultivation of auxotroph *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 in the medium with sunflower oil / M. Ivahniuk, T. Pirog, Yu. Panchuk // *ArXiv*: электронный научный журнал. – 2014. – № 5 Знайдений в <<http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/22054/1/5.pdf>>  
Пирог, Т. П. Особливості синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші фумарату та меляси / Т. П. Пирог, О. М. Савчук // *Цукор України*. – 2011. – № 5 (65). – С. 45–48  
Олефіренко, Ю. Ю. Вплив екзогенних попередників на реологічні властивості мікробного полісахариду етаполану / Ю. Ю. Олефіренко // *Ukrainian food journal*. – 2012. – № 2. – С. 31–34  
Биотрансформация бактериями рода *Acinetobacter* отработанного подсолнечного масла в поверхностно-активные вещества и экзополисахариды / Т. П. Пирог, И. Ю. Павлюковец, Н. А. Ивахнюк, И. В. Савенко // *Известия Национальной академии наук Беларуси*. – 2015. – № 4. – С. 116–121

UA 120560 C2

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ****(57) Реферат:**

Винахід належить до способу одержання мікробних екзополісахариду, що включає культивування *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 на поживному середовищі, що містить суміш ростових субстратів, мінеральні солі і ростові фактори, де як джерело вуглецевого живлення використовують суміш меляси масовою часткою 1,7 % за вуглеводами і змішаної відпрацьованої соняшникової олії об'ємною часткою 1,7 %, а посівний матеріал вирощують на

## ДОДАТОК В. Список публікацій за темою дисертації

### Статті у періодичних виданнях інших держав

1. Voronenko, A.; Ivakhniuk, M.; Pirog, T. Production of exopolysaccharide ethapolan by *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 on fried oil and oil-containing mixed substrates. *Banat's Journal of Biotechnology*. **2020**, 11(22), pp 66-75. doi: 10.7904/2068-4738-XI(22)-66.

[https://www.bjbabe.ro/wp-content/uploads/2020/11/66\\_VORONENKO.doc.pdf](https://www.bjbabe.ro/wp-content/uploads/2020/11/66_VORONENKO.doc.pdf)

### Статті у наукових фахових виданнях України

2. Voronenko, A.; Pirog, T. Ethapolan synthesis by *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 on the mixture of C2-C6-substrates and waste sunflower oil. *Ukrainian Journal of Food Science*. **2021**, 9(2), pp 259-268. doi: 10.24263/2310-1008-2021-9-2-12. <https://nuft.edu.ua/doi/doc/ujfs/2021/2/12>

3. Voronenko, A.; Pirog, T. Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan synthesis on the mixture of energy-excessive substrates. *Ukrainian Food Journal*. **2021**, 10(3), pp 632-645. doi: 10.24263/2304-974X-2021-10-3-15. <https://nuft.edu.ua/doi/doc/ufj/2021/3/15>

4. Пирог, Т.П.; Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А. Синтез мікробних екзополісахаридів на нетрадиційних субстратах. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*. **2021**, 27(1), с 42-52. doi: 10.24263/2225-2924-2021-27-1-6. <https://nuft.edu.ua/doi/doc/swnuft/2021/1/6>

5. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Біоконверсія відпрацьованої олії в мікробний екзополісахарид етаполан для природоохоронних технологій. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*. **2020**, 26(4), с 37-46. doi: 10.24263/2225-2924-2020-26-4-6.

<http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/32053>

6. Pirog, T.P.; Voronenko, A.A.; Yarosh, M.B. Production of exopolysaccharide ethapolan under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on the mixture of acetate and sunflower oil. *Biotechnologia acta*. **2020**, 13(4), pp 71-81. doi: 10.15407/biotech13.04.071. <https://doi.org/10.15407/biotech13.04.071>

7. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Особливості синтезу етаполану на суміші ацетату натрію та рафінованої соняшникової олії. *Харчова промисловість*. **2019**, 25, с 14-21. doi: 10.24263/2225-2916-2019-25-4. <https://nuft.edu.ua/doi/doc/fi/2019/25/4>

8. Вороненко, А.А.; Івахнюк, М.О.; Пирог, Т.П. Синтез екзополісахариду етаполану на суміші меляси та соняшникової олії залежно від способу підготовки меляси. *Наукові праці Національного університету харчових технологій*. **2019**, 25(3), с 42-48. doi: 10.24263/2225-2916-2019-25-4.

<http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/30025>

### **Патенти**

9. Пирог, Т.П.; Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б. Спосіб одержання екзополісахариду. Патент України на винахід 120560, Груд 26, 2019.

### **Тези доповідей у матеріалах конференцій**

10. Voronenko, A.A. Usage of mixed waste oil in the mixture with acetate for microbial exopolysaccharide ethapolan biosynthesis. *Матеріали XVI Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів і молодих вчених «Біотехнологія XXI століття»*, Київ, Україна, Червень 3, 2022; с 20-21.

11. Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Вплив відпрацьованих олієвмісних субстратів на реологічні властивості мікробного полісахариду етаполану. *Матеріали II міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»*, Харків, Україна, Травень 20, 2022; с 75-76.

12. Вороненко, А.; Пирог, Т. Особливості біосинтезу етаполану на суміші ацетату натрію та відпрацьованої соняшникової олії. *Матеріали 88 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»*, Київ, Україна, Квітень-Травень, 2022; с 306.

13. Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Оптимізація біосинтезу екзополісахариду етаполану під час культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші етанолу та соняшникової олії. *Матеріали VI Міжнародної науково-практичної інтернет-*

конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії», Харків, Україна, Листопад 11-12, 2021; с 265-268.

14. Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Мікробний синтез екзополісахариду етаполану на суміші етанолу та відпрацьованої соняшникової олії. *Програма та тези матеріалів X Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 09-10, 2021; с 15-16.

15. Voronenko, A.; Pirog, T. Processing of the mixture of ethanol and refined sunflower oil into the microbial exopolysaccharide ethapolan. *Збірник тез доповідей XVII Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»*, Львів, Україна, Квітень 19-21, 2021; с 124-125.

16. Вороненко, А.; Ярош, М.; Пирог, Т. Використання суміші етанолу та соняшникової олії для біосинтезу мікробного екзополісахариду етаполану. *Матеріали 87 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»*, Київ, Україна, Квітень 15-16, 2021; с 393.

17. Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Біоконверсія суміші відпрацьованої соняшникової олії та етанолу в мікробний екзополісахарид етаполану. *Матеріали I міжнародної науково-практичної Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології»*, Харків, Україна, Березень 25, 2021; с 127-128.

18. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Вплив дробного внесення субстратів на синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші етанолу та олії. *Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2020»*, Северодонецьк, Україна, Грудень 4, 2020; с 36-37.

19. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Біоконверсія суміші обробленого підсолнечного масла і меласи в мікробний екзополісахарид етаполану. *Матеріали VI Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів*

та молодих вчених «Актуальні питання розвитку біології та екології», Вінниця, Україна, Жовтень 21-22, 2020; с 53-54.

20. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Визначення оптимального молярного співвідношення концентрацій ацетату та соняшникової олії у суміші для синтезу етаполану. *Програма та тези матеріалів ІХ Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 10-11, 2020; с 27-28.

21. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Біосинтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші етанолу та соняшникової олії. *Матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії»*, Харків, Україна, Листопад 26, 2020; с 532-533.

22. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Интенсификация микробного экзополисахарида етаполана на смеси этанола и подсолнечного масла. *Сборник тезисов республиканской научной конференции «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии»*, Ташкент, Республика Узбекистан, Август 12, 2020; с 286-288.

23. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Використання суміші енергетично надлишкових субстратів для синтезу етаполану. *Матеріали XIV Всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття»*, Київ, Україна, Травень 20, 2020; с 21.

24. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Биосинтез микробного экзополисахарида етаполана на смеси энергетически избыточных субстратов. *Збірник тез міжнародної науково-практичної конференції «Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія»*. Київ, Україна, Травень 14-15, 2020; с 41.

25. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Вплив дробного внесення субстратів на синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші ацетату й

олії. *Збірник тез доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології»*, Львів, Україна, Квітень 27-29, 2020; с 88-89.

26. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Біохімічні особливості синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші енергетично надлишкових субстратів. *Збірник матеріалів XXII Всеукраїнської наукової конференції молодих учених «Актуальні проблеми природничих і гуманітарних наук у дослідженнях молодих учених «Родзинка – 2020»*, Черкаси, Україна, Квітень 23-24, 2020; с 441-443.

27. Вороненко, А.; Ярош, М.; Пирог, Т. Особливості синтезу етаполану на суміші ацетату та олії при дробному внесенні субстратів. *Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті»*, Київ, Україна, Квітень 2-3, 2020; с 374.

28. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Інтенсифікація синтезу екзополісахариду етаполану на суміші ацетату натрію та соняшникової олії. *Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2019»*, Сєверодонецьк, Україна, Грудень 12, 2019; с 33.

29. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Биосинтез микробного экзополисахарида етаполана на смеси ацетата натрия и рафинированного подсолнечного масла. *Сборник тезисов международной конференции молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии»*, Алматы, Республика Казахстан, Ноябрь 28-29, 2019; с 75.

30. Вороненко, А.А.; Ярош, М.Б.; Пирог, Т.П. Оптимізація синтезу екзополісахариду етаполану на суміші ацетату натрію та рафінованої соняшникової олії. *Збірник тез VIII Міжнародної науково-практичної онлайн*

конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звернення та надії», Київ, Україна, Листопад 15, 2019; с 69-70.

31. Voronenko, A.A.; Yarosh, M.B.; Pirog, T.P. Prospects of microbial exopolysaccharide ethapolan production on the mixture of molasses and mixed waste oil. *Збірник наукових праць VIII Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології»*, Харків, Україна, Листопад 7-8, 2019; с 42-43.

32. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Використання суміші ацетату натрію та рафінованої соняшникової олії для одержання мікробного екзополісахариду етаполану. *Програма та тези матеріалів VIII Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції»*, Київ, Україна, Листопад 5-6, 2019; с 64-66.

33. Ярош, М.Б.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Использование смеси ацетата натрия и рафинированного подсолнечного масла для синтеза микробного полисахарида этаполана. *Збірник статей V Всеукраїнської наукової конференції студентів «Наукова Україна»*, Дніпро, Україна, Травень 27-28, 2019; с 105-110.

34. Вороненко, А.; Івахнюк, М.; Ярош, М. Особливості використання різних типів соняшникової олії у суміші з мелясою для синтезу екзополісахариду етаполану. *Book of Abstracts 85 International scientific conference of young scientists and students «Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution»*, Kyiv, Ukraine, April 11–12, 2019; pp 491.

35. Voronenko, A.; Yarosh, M.; Ivakhniuk, M. Determination of optimal molar ratio of acetate and sunflower oil for cultivation of *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 on their mixture. *Book of abstracts of the 85 International scientific conference of young scientists and students «Youth scientific achievements to the 21st century nutrition problem solution»*, Kyiv, Ukraine, April 11–12, 2019; pp 58.

36. Ярош, М.; Вороненко, А.; Пирог, Т. Влияние способа подготовки мелассы в смеси с подсолнечным маслом на синтез этаполана. *Матеріали II*

*Всеукраїнської науково-практичної конференції «Стратегії інноваційного розвитку природничих дисциплін: досвід, проблеми та перспективи», Кропивницький, Україна, Березень 21, 2019; с 121-122.*

37. Ярош, М.; Вороненко, А.; Івахнюк, М. Синтез мікробного полісахариду етаполану на суміші ацетату натрію та соняшникової олії. *Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Майбутній науковець – 2018 р.»*, Сєвєродонецьк, Україна, Грудень 14, 2018; с 86-88.

38. Voronenko, A.; Yarosh, M.; Ivakhniuk, M. Influence of molasses neutralization on exopolysaccharide synthesis on mixed substrates. *Матеріали II міжнародної науково-практичної інтернет-конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації»*, Київ, Україна, Листопад 15, 2018; с 75.

39. Voronenko, A.A.; Yarosh, M.B.; Ivakhniuk, M.O.; Pirog, T.P. Influence of method of molasses preparation on exopolysaccharide ethapolan synthesis on mixture of substrates. *Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Universum View»*, Краматорськ, Україна, Вересень 28, 2018; с 20-21.