

УДК 579.841: 577.15

Т.П. Пирог, Ю.В. Корж

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА НА СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *ACINETOBACTER SP. B-7005* НА СРЕДЕ С ЭТАНОЛОМ

*Показана возможность устранения лимитирования C_7 -метаболизма и увеличения активности ацетил-КоА-синтетазы у *Acinetobacter sp. B-7005* — продуцента экзополисахарида этаполана при внесении ацетата в среду с этанолом. При добавлении на этапе получения инокулята и биосинтезе экзополисахарида 0,1 % ацетата калия в среду без катионов натрия, содержащую 1 % этанола и 0,0009 % пантотената кальция, возможна без снижения показателей синтеза и реологических свойств реализация процесса получения этаполана на незабуференной среде, в которой общее содержание солей снижено в 4 раза.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: экзополисахариды, метаболизм этанола, ацетил-КоА-синтетаза, экзогенный ацетат, реологические свойства.

**Acinetobacter sp. B-7005* является продуцентом этаполана — комплексного экзополисахарида (ЭПС), который используется как эмульгирующий, суспендирующий, стабилизирующий и изменяющий реологические характеристики водных систем агент в нефтедобывающей, парфюмерно-косметической и пищевой промышленности [1]. Этаполан состоит из нейтрального и двух кислых компонентов (ацилированного и неацилированного). Нейтральный ЭПС, в состав которого входят *D*-глюкоза, *D*-манноза, *D*-галактоза (3 : 2 : 1), является минорным компонентом — содержание его в этаполане не превышает 5–6 %. Ацилированный и неацилированный ЭПС идентичны по молярному соотношению *D*-глюкозы, *D*-маннозы, *D*-галактозы, *L*-рамнозы, *D*-глюкуроновой, пировиноградной кислот (3 : 2 : 1 : 1 : 1 : 1) и структуре повторяющейся единицы углеводной цепи. Различие между этими ЭПС состоит в том, что ацилированный полисахарид содержит жирные кислоты ($C_{12} - C_{18}$) [5]. Реологические свойства растворов этаполана, определяющие его практическую значимость (способность к эмульгированию, повышению вязкости при наличии одно- и двухвалентных катионов, снижении pH, в системе Cu^{2+} -глицин), зависят от соотношения в его составе ацилированных и неацилированных компонентов, а также от содержания жирных кислот в ацилированном ЭПС [5].*

© Т.П. Пирог, Ю.В. Корж, 2006

Нами создана технология получения этаполана на этаноле, разработаны подходы к интенсификации синтеза, управлению составом и физико-химическими свойствами ЭПС [1, 5]. Недостатком этой технологии является необходимость поддержания нейтрального значения pH в процессе культивирования продуцента, что достигалось введением в среду высокой концентрации солей (11–15 г/л) для создания емкого фосфатного буфера, молярность которого равнялась 0,05 М. Основная задача проведенных позднее энзимологических исследований [6, 8, 10] состояла в поиске и устранении возможных “узких мест” C₂-метаболизма, разработке подходов к усовершенствованию технологии получения этаполана, в частности реализация процесса синтеза ЭПС на незабуференной среде с низким содержанием солей.

Изучение регуляции метаболизма этанола у *Acinetobacter* sp. В-7005 [6, 8, 10] позволило частично устранить “узкое место” и увеличить скорость реакции, катализируемой ацетил-КоА-синтетазой, посредством исключения из состава среды культивирования катионов натрия и повышения концентрации пантотената кальция, а также K⁺ и Mg²⁺ (ингибитора и активаторов данного фермента соответственно). В результате проведенных исследований нам удалось существенно снизить молярность буфера, но не содержание солей в среде культивирования продуцента этаполана.

Цель работы — снятие лимитирования метаболизма ацетата у *Acinetobacter* sp. В-7005 и повышение эффективности процесса биосинтеза этаполана на незабуференной среде минимального состава.

Материалы и методы. Штаммы и их культивирование. В работе использовали ЭПС-синтезирующий штамм *Acinetobacter* sp. 12S, депонированный в Украинской коллекции микроорганизмов под номером В-7005, и мутант *Acinetobacter* sp. 1НГ, не образующий ЭПС [1, 5]. Бактерии выращивали на жидких минеральных средах следующего состава, г/л. Стандартная среда: КН₂Р₀₄ — 6,8; КОН — 1,8; КСl — 1,4; NH₄NO₃ — 0,6; MgSO₄ · 7H₂O — 0,4; СаСl₂ · 2H₂O — 0,1; FeSO₄ × 7H₂O — 0,001; емкость буфера — 0,05 М. Среда 1: КН₂Р₀₄ — 3,4; КОН — 0,9; NH₄NO₃ — 0,3; MgSO₄ · 7H₂O — 0,4; СаСl₂ · 2H₂O — 0,1; FeSO₄ · 7H₂O — 0,001; емкость буфера — 0,025 М. Среда 2: КН₂Р₀₄ — 1,7; КОН — 0,45; NH₄NO₃ — 0,3; MgSO₄ · 7H₂O — 0,4; СаСl₂ · 2H₂O — 0,1; FeSO₄ · 7H₂O — 0,001; буферная емкость — 0,0125 М.

Среды 1 и 2 отличаются от стандартной не только молярностью буфера, а и существенным уменьшением в их составе общего количества солей (2,95–5,1 и 11 г/л соответственно).

Дополнительно в среды вносили дрожжевой автолизат и пантотенат кальция объемными долями 0,5 и 0,0009 % соответственно. В качестве посевного материала использовали культуру из экспоненциальной фазы (16–18 ч роста), выращенную на минеральной среде 1 или 2. Концентрация инокулята составляла 5 % объема среды культивирования. Источниками углерода и энергии при получении посевного материала и биосинтезе ЭПС служили: объемная доля этанола 1 % в отсутствии или при наличии ацетата калия.

В среду в виде 20%-го раствора вносили ацетат калия до конечной массовой доли 0,01 и 0,1 %. В одном из вариантов опыта инокулят выращивали на среде 1 или 2, содержащей массовую долю ацетата калия 1,6 %.

Acinetobacter sp. В-7005 и 1НГ выращивали в колбах на качалке (220 об/мин) при 30 °С, рН 6,8–7,0 в течение 16–120 ч.

Концентрацию биомассы определяли по оптической плотности клеточной суспензии, которую пересчитывали на массу сухих клеток по калибровочному графику.

Количество синтезированных ЭПС измеряли гравиметрическим (весовым) методом после отделения клеток [15]. ЭПС-синтезирующую способность выражали в граммах ЭПС на грамм биомассы. Концентрацию ацетата в культуральной жидкости определяли с использованием ацетаткиназы [3], скорость окисления субстратов клетками *Acinetobacter* sp. В-7005 и мутант 1НГ – как описано в работах [6, 8, 10].

Определение активности ферментов. Культуральную жидкость с клетками (экспоненциальная фаза роста *Acinetobacter* sp. В-7005) обрабатывали ультразвуком (УЗ) (22 кГц) в течение 60 с, после чего центрифугировали (5000 g, 10 мин, 4 °С). Осадок клеток трижды отмывали от остатков среды и ЭПС 0,05 М *трис*-НСl буфером (рН 7,0). Такая УЗ-обработка культуры расщепляла высокомолекулярные ЭПС на низкомолекулярные фрагменты. При этом существенно уменьшалась вязкость культуральной жидкости, что позволило отделить клетки от фрагментов ЭПС при центрифугировании. Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05 М *трис*-НСl буфере (рН 7,0) и разрушали УЗ (22 кГц) 4 раза по 50 с при 4 °С на аппарате УЗДН-1 (Россия). Гомогенат центрифугировали (12 000 g, 30 мин, 4 °С), осадок отбрасывали, а супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Активность алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1), ацетальдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.3 и 1.2.1.4), ацетил-КоА-синтетазы (КФ 6.2.1.1) определяли как описано в работах [6, 8, 10] при температуре 28–30 °С и выражали в наномолях соответствующего продукта, который образуется за 1 мин из 1 мг белка (далее по тексту – нмоль/(мин · мг белка)). Определяемыми продуктами алкоголь- и ацетальдегиддегидрогеназных реакций были НАДН и НАДФН, ацетил-КоА-синтетазной реакции – ацетилгидроксамат. Содержание белка в бесклеточных экстрактах определяли по М. Bradford [11].

Выделение и исследование реологических свойств этаполана. Культуральную жидкость, содержащую этаполан, диализовали против дистиллированной воды в течение 5 сут, далее разбавляли дистиллированной водой в 3–5 раз, центрифугировали для отделения клеток продуцента (12 000 g, 40 мин). Супернатант концентрировали в вакууме (50 °С) до первоначального объема, после чего осаждали этаполан добавлением 1,5 объемов изопропанола. Осадок ЭПС промывали изопропанолом и высушивали при комнатной температуре.

Свойства 0,03%-х растворов этаполана определяли по изменению их вязкости при наличии 0,1 М КСl и в системе Cu^{2+} – глицин как описано в работе [9].

При сравнении вязкости растворов этаполана, синтезированного в различных условиях культивирования, как критерий оценки использовали относительную вязкость его растворов, которую определяли как описано в работе [7]. Вязкость растворов этаполана измеряли на стеклянном капиллярном вискозиметре Оствальда при 20 °С.



Результаты и их обсуждение. Штаммы *Acinetobacter* sp. В-7005 и мутант 1НГ являются ауксотрофами по пантотеновой кислоте (витамину В₅) [1, 5]. При культивировании бактерий на среде с этанолом без пантотената кальция наблюдали снижение рН до 4,55–4,85, обусловленное накоплением ацетата (59–65 мМ) (табл. 1). В таких условиях отмечали уменьшение в 3 раза уровня биомассы у обоих штаммов и в 10–15 раз количества синтезированных ЭПС у штамма В-7005. Скорость дыхания клеток штаммов В-7005 и 1НГ, выращенных на среде с этанолом без пантотената кальция, была в 10 раз ниже при наличии ацетата, чем у клеток, растущих с витамином В₅.

Интересно отметить, что при культивировании *Acinetobacter* sp. В-7005 и 1НГ на среде без пантотената кальция активность ацетил-КоА-синтетазы была в 3 раза выше, чем при наличии пантотената (400–415 и 133–137 нмоль/(мин · мг белка) соответственно) (табл. 1). Эти результаты можно объяснить тем, что ацетил-КоА-синтетаза — индуцибельный фермент, индуктором синтеза которого является ацетат, содержащийся в культуральной жидкости. Так, известно, что *Escherichia coli* при росте на глюкозе в экспоненциальной фазе образует ацетат в фосфотрансацетилазной и ацетаткиназной реакциях [14]. Образовавшийся ацетат индуцирует синтез ацетил-КоА-синтетазы (активность фермента регистрируется только в стационарной фазе роста бактерий), при участии которой образуется ацетил-КоА, вовлекаемый в цикл трикарбоновых кислот и глиоксилатный шунт [14]. Аналогичное явление описано для *Bacillus subtilis* [13]. Галофильные археи способны метаболизировать образовавшийся из глюкозы ацетат при условии выращивания посевного материала на среде с ацетатом [12].

Другим возможным механизмом, объясняющим увеличение активности ацетил-КоА-синтетазы при выращивании продуцента этаполана на среде без пантотената кальция (в условиях накопления ацетата в культуральной жидкости), может быть влияние ацетата на активность этого фермента.

Мы предположили, что лимитирование С₂-метаболизма у *Acinetobacter* sp. В-7005 можно снять внесением экзогенного ацетата в среду с этанолом, а также при использовании инокулята, выращенного на ацетате.

Т а б л и ц а 1

Влияние пантотената кальция на показатели процесса культивирования *Acinetobacter* sp. на среде с этанолом

Штамм <i>Acinetobacter</i> sp. В-7005	Концентрация пантотената кальция, %	рН _{кон}	Биомасса, г/л	ЭПС, г/л	Ацетат, мМ	Скорость дыхания интактных клеток при наличии ацетата, нмоль О ₂ /(мин · мг клеток)	Активность ацетил-КоА-синтетазы, нмоль/(мин · мг белка)
12S (ЭПС ⁺)	0	4,5	0,4	0,3	65,0	Н.о	415,3 ± 27,6
	0,0009	6,55	1,2	4,2	0	Н.о	136,9 ± 6,5
1НГ (ЭПС ⁻)	0	4,85	0,4	0	59,4	18,0 ± 0,9	397,6 ± 20,7
	0,0009	6,65	1,4	0	0	127,9 ± 6,5	132,5 ± 6,7

П р и м е ч а н и е. Культивирование осуществляли на среде 1; Н.о. — не определяли; посевной материал получен на МПА.

На первом этапе исследовали влияние способа приготовления посевного материала на синтез этаполана при культивировании продуцента на средах с различной концентрацией солей. Результаты показали, что применение инокулята, выращенного на мясопептонном агаре (МПА), сопровождалось снижением рН и ослаблением синтеза этаполана на средах 1 и 2 по сравнению с использованием посевного материала, полученного на этаноле или ацетате (табл. 2). В случае применения инокулята, выращенного на ацетате, уровень синтеза ЭПС на среде 1 не отличался, а на среде 2 был несколько выше, чем при использовании посевного материала, выращенного на этаноле.

На следующем этапе определяли оптимальную концентрацию экзогенного ацетата в среде с этанолом, обеспечивающую максимальный синтез этаполана на незабуференной среде минимального состава. Эти эксперименты осуществляли, используя инокулят, выращенный на этаноле или этаноле при наличии ацетата (табл. 3). Установлено, что применяя посевной материал, полученный на этаноле, и внося 0,01–0,1 % ацетата калия в среду 2 с этанолом при биосинтезе этаполана, количество ЭПС составило 3,6–3,7 г/л, что ниже, чем в аналогичных условиях на среде 1 (4,2–4,6 г/л). Увеличение рН при культивировании штамма В-7005 на среде 2 с этанолом при наличии 0,1 % ацетата калия может быть объяснено потреблением ацетата, который транспортируется в клетки бактерий путем симпорта с протоном [2].

Т а б л и ц а 2

Влияние способа приготовления посевного материала на синтез этаполана при культивировании *Acinetobacter* sp. В-7005 на средах с 1 % этанола

Источник углерода при получении инокулята	Среда культивирования	Показатель процесса		
		рН _{кон}	ЭПС, г/л	Синтез ЭПС, г ЭПС/г биомассы
МПА	1	6,2	3,41 ± 0,01	2,01 ± 0,01
	2	5,8	2,93 ± 0,01	1,93 ± 0,01
Этанол, 1 %	1	6,55	4,25 ± 0,02	3,56 ± 0,02
	2	6,15	3,59 ± 0,01	2,94 ± 0,01
Ацетат, 1,6 %	1	6,9	4,33 ± 0,03	3,65 ± 0,02
	2	6,6	3,94 ± 0,02	3,51 ± 0,01

Т а б л и ц а 3

Синтез этаполана при выращивании *Acinetobacter* sp. В-7005 на среде 2 с 1 % этанола при наличии разного количества ацетата

Концентрация ацетата калия (%) при		рН _{кон}	ЭПС, г/л	Синтез ЭПС, г ЭПС/г биомассы
получении инокулята	биосинтезе ЭПС			
0	0,01	6,25	3,61 ± 0,01	3,02 ± 0,01
0	0,1	7,15	3,73 ± 0,01	3,23 ± 0,01
0,01	0,01	6,25	3,92 ± 0,02	3,38 ± 0,02
0,1	0,1	7,2	4,24 ± 0,02	3,56 ± 0,01

П р и м е ч а н и е. Концентрация биомассы во всех вариантах опыта составляла 1,1–1,2 г/л.



В дальнейших исследованиях ацетат вносили в среду с этанолом как при получении инокулята, так и биосинтезе ЭПС (табл. 3). В таких условиях в случае концентрации ацетата калия, равной 0,1 %, количество ЭПС и ЭПС-синтезирующая способность на среде 2 увеличивались до 4,2 г/л и 3,5 г ЭПС/г биомассы соответственно, т. е. до уровня, получаемого на среде 1. При внесении в среду с этанолом 0,01 % ацетата показатели синтеза ЭПС были ниже.

Данные ростовых экспериментов (табл. 3) были подтверждены результатами полярографических и энзимологических исследований (табл. 4). При культивировании продуцента этаполана на незабуференной среде 2 с этанолом в отсутствие ацетата активность ацетил-КоА-синтетазы была в 2 раза, а скорость окисления ацетата клетками бактерий в 4 раза ниже, чем при выращивании на среде 1. Эти результаты свидетельствуют о лимитировании C_2 -метаболизма в условиях культивирования *Acinetobacter* sp. В-7005 на среде 2. Внесение в среду 2 с этанолом 0,1 % ацетата при получении инокулята и биосинтезе ЭПС сопровождалось повышением активности ацетил-КоА-синтетазы в 2,4 раза (до 260 нмоль/(мин · мг белка)) и скорости дыхания клеток при наличии ацетата в 3 раза (до 90 нмоль O_2 /(мин · мг клеток)), т. е. до уровня, получаемого на среде 1.

Обращает на себя внимание, что при культивировании продуцента этаполана на этаноле без пантотената кальция (табл. 1) и на среде с этанолом при наличии ацетата и пантотената кальция (табл. 4) отмечалось существенное различие в активности ацетил-КоА-синтетазы — 415,3 и 260,1 нмоль/(мин · мг белка) соответственно. Для объяснения этого явления необходимо проведение исследований по изучению механизма влияния экзогенного ацетата на активность данного фермента, что будет предметом нашей дальнейшей работы.

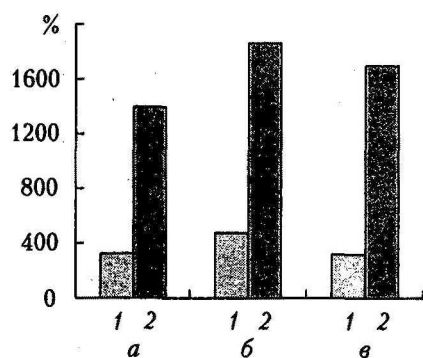
На последнем этапе определяли вязкость растворов этаполана, синтезированного на исходной среде, а также средах 1 и 2. Ранее нами было показано [4, 5], что необходимым условием синтеза ацилированного ЭПС

Т а б л и ц а 4

Влияние экзогенного ацетата на активность ключевых ферментов C_2 -метаболизма и скорость дыхания клеток при росте *Acinetobacter* sp. В-7005 на этаноле

Источник углерода в среде культивирования	Среда	Активность, нмоль/(мин · мг белка)			Скорость дыхания при наличии ацетата, нмоль O_2 /(мин · мг клеток)
		алкоголь-дегидрогеназа (НАД ⁺)	ацетальдегид-дегидрогеназа (НАД ⁺ + НАДФ ⁺)	ацетил-КоА-синтетаза	
Этанол, 1 %	1	323,5 ± 17,5	283,1 ± 15,3	223,5 ± 13,4	129,7 ± 8,3
	2	321,5 ± 16,9	211,5 ± 9,1	109,3 ± 6,2	31,5 ± 1,7
Этанол, 1 % + ацетат калия, 0,01 %	1	327,1 ± 16,5	206,2 ± 8,5	225,6 ± 12,8	104,6 ± 6,8
	2	367,8 ± 19,3	243,2 ± 10,5	164,1 ± 9,8	59,1 ± 3,5
Этанол, 1 % + ацетат калия, 0,1 %	1	392,3 ± 16,6	224,5 ± 10,1	253,9 ± 17,6	115,8 ± 8,0
	2	384,6 ± 22,9	251,0 ± 8,5	260,1 ± 15,7	91,6 ± 4,7

П р и м е ч а н и е. Ацетат вносили при получении посевного материала и биосинтезе ЭПС.



Относительная вязкость (%) при наличии 0,1 М КСl (1) и в системе Cu^{2+} -глицин (2) 0,03%-х растворов этаполана, синтезированного на средах с различным содержанием катионов калия: а — 100, б — 40, в — 20 мМ K^+ ($P < 0,05$)

является наличие в среде культивирования продуцента этаполана 100 мМ K^+ . Только этаполан с высоким (> 50 %) содержанием ацилированного компонента обладает совокупностью свойств, определяющих практическую значимость этого ЭПС. Содержание K^+ в средах 1 и 2 составило 20 и 40 мМ соответственно, что, согласно нашим предыдущим данным [4, 5], недостаточно для синтеза высокоацилированного ЭПС. В этой работе нами показано, что ЭПС, синтезируемые на исходной стандартной среде, содержащей 100 мМ K^+ , и средах 1 и 2, характеризуются практически одинаковой вязкостью (рисунок). Таким образом, нами впервые показана возможность синтеза этаполана с высокими реологическими характеристиками на среде с низким содержанием одновалентных катионов. Механизмы, лежащие в основе этого явления, неизвестны. Вполне вероятно, что культивирование продуцента этаполана в условиях устранения "узкого места" C_2 -метаболизма, связанного с образованием ацетил-КоА — предшественника жирных кислот, сопровождается синтезом преимущественно ацилированного ЭПС.

Данная работа создает предпосылки для совершенствования технологии получения этаполана на этаноле. Ее ключевыми элементами являются: отсутствие катионов натрия (ингибитора ацетил-КоА-синтетазы) в среде и повышенная концентрация пантотената кальция (0,0009 %), а также использование посевного материала, выращенного на этаноле при наличии 0,1 % ацетата калия и внесение 0,1 % ацетата калия в среду с этанолом при биосинтезе ЭПС.

Реализация этих приемов дает возможность снизить молярность буфера в среде культивирования продуцента этаполана с 0,05 до 0,0125 М, а общее содержание солей — с 11 до 2,95 г/л. При этом не наблюдается ослабления синтеза ЭПС, накопления ацетата в культуральной жидкости и изменения рН в процессе культивирования продуцента. Синтезируемый в таких условиях этаполан характеризуется высокой вязкостью растворов при наличии одновалентных катионов и в системе Cu^{2+} -глицин, т. е. обладает свойствами, необходимыми для практического использования.



Т.П. Пирог, Ю.В. Корж

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

ВПЛИВ АЦЕТАТУ НА СИНТЕЗ ЕКЗОПОЛІЦУКРИДУ ЕТАПОЛАНУ
ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ *ACINETOBACTER SP. B-7005*
НА СЕРЕДОВИЩІ З ЕТАНОЛОМ

Резюме

Показана можливість усунення лімітування C_2 -метаболізму і збільшення активності ацетил-КоА-синтетази у *Acinetobacter sp. B-7005* – продуцента екзополіцукриду етаполану в разі внесення ацетату в середовище з етанолом. При додаванні на етапі одержання інокуляту і під час біосинтезу екзополіцукриду 0,1 % ацетату калію в середовище без катіонів натрію, що містить 1 % етанолу і 0,0009 % пантотенату кальцію, можлива без зниження показників синтезу і реологічних властивостей реалізація процесу одержання етаполану на незабуференому середовищі, в якому загальний вміст солей знижено в 4 рази.

Ключові слова: екзополіцукриди, метаболізм етанолу, ацетил-КоА-синтетаза, екзогенний ацетат, реологічні властивості.

T.P. Pirog, Yu.V. Korzh

Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

ACETATE EFFECT ON SYNTHESIS OF EXOPOLYSACCHARIDE
ETHAPOLAN UNDER *ACINETOBACTER SP. B-7005*
CULTIVATION ON THE MEDIUM WITH ETHANOL

Summary

A possibility of removal of C_2 -metabolism limiting and increasing of activity of acetyl-CoA-synthesis in *Acinetobacter sp. B-7005* – producer of exopolysaccharide (EPS) ethapolan with acetate introduction in the medium with ethanol. When adding potassium acetate 0.1 % of into the medium without sodium cations containing 1 % ethanol and 0.0009 % calcium pantotenate at the stage of obtaining inoculate and at EPS biosynthesis, it is possible to realize the process of ethapolan production on nonbuffered medium in which total content of salts is reduced 4 times without decreasing the synthesis indices and rheological properties.

Key words: exopolysaccharides, ethanol metabolism, acetyl-CoA-synthetase, exogenic acetate, rheological properties.

The author's address: T.P. Pirog, Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C_1 – C_2 -соединениях. – Киев: Наук. думка, 1992. – 212 с.
2. Ивановский Р.Н. Биоэнергетика и транспорт субстратов у бактерий. – М.: МАКСПресс, 2001. – 46 с.
3. Криштаб Т.П., Соколов И.Г. Энзиматический метод количественного определения уксусной кислоты в культуральной жидкости // Микробиол. журн. – 1985. – 47, № 1. – С. 86–88.
4. Пирог Т.П. Влияние одновалентных катионов на образование ацилированных экзополисахаридов *Acinetobacter sp.* // Микробиология. – 1996. – 65, № 5. – С. 639–643.
5. Пирог Т.П. Принципы регуляции состава и физико-химических свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter sp.*: Дис. ... д-ра биол. наук. – Киев, 1999. – 450 с.
6. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Сенченкова С.Н., Малашенко Ю.Р. Химический состав экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter sp.* на средах с различным содержанием K^+ // Микробиология. – 1995. – 65, № 4. – С. 527–532.

7. Пирог Т.П., Малащенко Ю.Р., Воцелко С.К. Двухстадийный способ получения микробного экзополисахарида этаполана с улучшенными реологическими свойствами // Прикл. биохимия и микробиология. — 2001. — 37, № 4. — С. 429–435.
8. Пирог Т.П., Соколов И.Г., Кузьминская Ю.В., Малащенко Ю.Р. Некоторые особенности метаболизма этанола у мутантного штамма *Acinetobacter* sp., не образующего экзополисахариды // Микробиология. — 2002. — 71, № 2. — С. 222–229.
9. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // Там же. — 2003. — 72, № 4. — С. 459–465.
10. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Регуляция метаболизма ацетата у штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // Прикл. биохимия и микробиология. — 2003. — 39, № 2. — С. 180–188.
11. Bradford M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72. — P. 248–254.
12. Brasen C., Schonheit P. Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea // Arch. Microbiol. — 2001. — 175, N 5. — P. 360–368.
13. Grundy F.J., Turinsky A.J., Henkin T.M. Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA // J. Bacteriol. — 1994. — 176, N 15. — P. 4527–4533.
14. Kumari S., Beatty C.M., Browning D.F. et al. Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli* // Ibid. — 2000. — 182, N 15. — P. 4173–4179.
15. Williams A.G., Wimpenny W.T. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NC1B 11264 grown in continuous culture // J. Gen. Microbiol. — 1978. — 104, N 1. — P. 47–57.

Одержано 12.10.2005