

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОДУЦЕНТІВ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ НА ЇХ СИНТЕЗ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

(Огляд літератури)

Пирог Т.П., Кузьмінська Ю.В.

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

В огляді наведені літературні та власні експериментальні дані про вплив умов культивування продуцентів на синтез екзополісахаридів (ЕПС) і їх фізико-хімічні властивості.

Утворення мікробних ЕПС (кількість синтезованих полісахаридів, швидкість їх синтезу та вихід від субстрату) залежать від складу поживного середовища (природа джерела вуглецю, азоту, фосфору, їх концентрація, співвідношення вуглець/азот, іони металів), способу подачі субстрату, фізико-хімічних факторів (температура, рН, рівень аерації), тривалості процесу періодичного культивування, швидкості розбавлення середовища при безперервному культивуванні. В різних умовах вирощування продуцента може змінюватись хімічний склад ЕПС, їх молекулярна маса, а також співвідношення декількох полісахаридів, що впливає на реологічні властивості розчинів ЕПС, які визначають практичну значимість цих полімерів.

Обговорюється питання про необхідність використання даних про вплив умов культивування на синтез та фізико-хімічні властивості ЕПС в біотехнології мікробних полісахаридів при розробці технологій одержання ЕПС зі стабільними заданими властивостями.

Ключові слова: мікробні екзополісахариди, біосинтез, культивування, фізико-хімічні властивості екзополісахаридів.

Протягом останніх 20-30 років мікробні екзополісахариди (ЕПС) – високомолекулярні екзогенні продукти метаболізму мікроорганізмів - є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень. Здатність розчинів мікробних ЕПС до гелеутворення, емульгування, суспендування, змінення реологічних характеристик водних систем обумовили широке використання цих біополімерів в нафто- і гірничовидобувній, текстильній, харчовій, фармацевтичній, хімічній промисловості, сільському господарстві і медицині. Мікробні ЕПС мають ряд переваг перед полісахаридами рослинного походження. Так, ці біополімери можна отримувати в потрібних об'ємах незалежно від пори року і

кліматичних умов. Економічна доцільність використання мікробних ЕПС обумовлена їх позаклітинною природою і високою продуктивністю синтезу на дешевих субстратах. На відміну від хімічних полімерів (поліакриламід) мікробні ЕПС стійкі до температурної, окисної, механічної деструкції, але піддаються біологічній деградації і є нетоксичними, що робить екологічно безпечним їх застосування, наприклад, в нафтодобуванні.

Попит на мікробні ЕПС на світовому ринку є високим, про що свідчить як збільшення з року в рік обсягів виробництва першого мікробного ЕПС ксантану (продуцент *Xanthomonas campestris*), так і поява нових мікробних ЕПС, наприклад, біозану (продуцент *Alcaligenes sp.*), склерглюкану (продуценти *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium sp.*), гелану (продуцент *Pseudomonas elodea*), емульсану (продуцент *Acinetobacter calcoaceticus*).

Згідно класифікації Sutherland [1] мікробні ЕПС відносяться до п'яти груп. **Перша група** включає декстриани і споріднені полісахариди (левани, мутани). Вони складаються з моносахаридів одного типу, тобто є гомополісахаридами. Синтез цих ЕПС здійснюється на середовищах, які вміщують сахарозу як специфічний субстрат. При відсутності такого специфічного субстрату (крім сахарози, це можуть бути інші споріднені вуглеводи) утворення ЕПС не відзначається. Продуцентами ЕПС першої групи є представники родів *Streptococcus* і *Leuconostoc*.

Для утворення ЕПС **другої групи** також необхідна наявність специфічного вуглецевого субстрату, однак синтезовані ЕПС є гетерополісахаридами. На сьогоднішній день встановлено утворення такого ЕПС жовтозобарвленою псевдомонадою.

До **третьої групи** відносяться гомополісахариди, які синтезуються на різних вуглецевих субстратах. Деякі з цих гомополісахаридів складаються винятково з вуглеводів, наприклад бактеріальна целюлоза, пулулан (продуцент *Aureobasidium pullulans*), курдлан (продуценти *Alcaligenes faecalis* і *Agrobacterium radiobacter*), склероглюкан (продуценти *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotium glucanicum*, *Sclerotium sp.*), інші містять ацетильні групи (наприклад, ЕПС, синтезовані певними видами *Agrobacterium*).

Четверта група мікробних ЕПС є найбільш численною. Її представники є гетерополісахаридами, які складаються із структур з повторюваними блоками. До цієї групи відноситься найбільш досліджений мікробний ЕПС – ксантан (продуцент *Xanthomonas campestris*), а також промислово цінні ЕПС – гелан (продуцент *Pseudomonas elodea*) і емульсан (продуцент *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1).

До **п'ятої групи** мікробних ЕПС відноситься бактеріальний альгінат. Цей гетерополісахарид складається з мономерів двох типів: D-мануронової і L-гулууронової кислоти. На відміну від ЕПС четвертої групи в альгінаті немає повторюваних одиниць. Продуцентами альгінату є *Pseudomonas aeruginosa* і *Azotobacter vinelandii*. Бактеріальний альгінат відрізняється від альгінату з морських водоростей наявністю O-ацетильних

груп, приєданих до D-мануронової кислоти. Мікробні альгірати використовуються в харчовій промисловості як замітники водоростевих альгіратів.

Здатність до синтезу ЕПС виявлена у багатьох мікроорганізмів, однак рівень синтезу цих полімерів коливається в широких межах як для різних продуцентів ЕПС, так і для одного продуцента в різних умовах його культивування.

Дослідження динаміки росту мікробних клітин і утворення ЕПС в періодичному процесі показує, що максимальна питома швидкість їх синтезу здебільшого не співпадає у часі з максимальною швидкістю росту продуцентів і досягається в стаціонарній фазі [2 - 8], що характерно для біосинтезу вторинних метаболітів.

Рівень біосинтезу вторинних метаболітів, в тому числі і ЕПС, в значній мірі залежить від зовнішніх факторів. У зв'язку з цим при розробці технології одержання мікробних ЕПС важливим і необхідним етапом є підбір оптимальних комбінацій різних параметрів культивування продуцентів.

Вплив умов культивування на синтез екзополісахаридів

Природа джерела вуглецевого живлення. В огляді Linton [9] здійснено аналіз зв'язку стехіометричних та кінетичних показників росту мікроорганізмів та утворення ЕПС, наведено розрахунки витрат АТФ на синтез біомаси та полісахаридів. Автор відзначає, що пошук найбільш продуктивних біосинтетиків ЕПС слід здійснювати серед мікроорганізмів з низькою ефективністю росту, а оптимізація технології одержання мікробних ЕПС повинна бути пов'язана з правильним вибором субстрату (суміші субстратів) та умов культивування.

Більшість мікробних синтетиків ЕПС використовують вуглеводи як джерело вуглецю та енергії. При промисловому виробництві ЕПС як субстрати звичайно використовують продукти, отримані з цукрових буряків: мелясу, цукровий сироп, сахарозу, або з кукурудзи: крохмаль, гідролізований крохмаль, глюкозний сироп, глюкозу [10, 11].

Утворення ксантану культурою *Xanthomonas campestris* спостерігається не лише на цих субстратах, але також при вирощуванні продуцента на середовищі з мальтозою, фруктозою, лактозою [12]. Збільшення виходу ксантану було досягнуто при добавленні в середовище, яке вміщує глюкозу або сахарозу, пірувату (0,3%), сукцинату (0,6%) або α -кетоглутарату (0,4%) [13]. Більш високі концентрації органічних кислот пригнічували синтез ксантану.

Agrobacterium radiobacter NCIB 11883 синтезує ЕПС на середовищі, яке вміщує як джерело вуглецю глюкозу, сукцинат, глюконат, ксилозу, сорбіт, гліцерин, етанол [14],

однак найбільш високий вихід ЕПС спостерігається при вирощуванні бактерій на глюкозі.

Бактерії *Azotobacter vinelandii* характеризуються високим рівнем біомаси при вирощуванні на середовищі з фруктозою, однак вихід альгінату при цьому є невисоким [15]. При використанні глюкози, маніту та мальтози кількість синтезованого альгінату підвищується. Найбільш високі показники за рівнем біомаси та ЕПС були одержані при вирощуванні *Azotobacter vinelandii* на середовищі з сахарозою. Ноган з співавт. [16] також відзначають, що вихід альгінату залежить від природи джерела вуглецевого живлення. Так, в фосфат-лімітованому середовищі синтез альгінату спостерігається при використанні як джерела вуглецю сахарози, але не сорбіту. Авторами встановлено, що при вирощуванні продуцента на середовищі з сорбітом відсутні деякі ферменти синтезу альгінату. У роботі Clementi з співавт. [17] показано, що максимальна продукція альгінату відзначається на середовищі з глюкозою. Вихід альгінату знижується при добавленні в середовище ацетату натрію.

Для синтезу альгінату псевдомонадами найбільш сприятливим субстратом є фруктоза [18]. Так, з досліджених 115 штамів 24 утворювали 10-17 г/л альгінату при вирощуванні на середовищі з фруктозою, і тільки 7 штамів синтезували близько 10 г/л ЕПС при використанні як ростового субстрату глюкози.

У літературі приводяться відомості про синтез ЕПС галофільними бактеріями *Halobacterium mediterranei*, *Halobacterium volcanii* і *Halomonas eurihalina* [19, 20]. Глюкоза в концентрації 0.1-0.5% стимулювала ріст *Halobacterium volcanii* і утворення ЕПС. З інших досліджених цукрів подібний ефект спостерігався при використанні сахарози та галактози [19]. *Halomonas eurihalina* синтезує ЕПС не тільки на середовищі з глюкозою, але й вуглеводнями, причому максимальний рівень ЕПС спостерігається при вирощуванні бактерій на глюкозі і гексадекані [20].

Декстран виявився більш сприятливим, ніж сахароза, субстратом для синтезу ЕПС бактеріями, ізольованими з цукрових буряків [21].

Синтез ЕПС бактеріями *Enterobacter sakazakii* залежить від природи джерела вуглецю в середовищі [22]. Найбільший вихід ЕПС досягається при використанні як ростового субстрату гліцерину або амінокислот. *Aureobasidium pullulans* синтезує ЕПС на середовищі з вуглеводами, у тому й числі з глюкозаміном [23].

У 1970-1977 рр. з'явилися роботи по утворенню ЕПС на етиленгліколі та етанолі [24 - 28]. Так, штам *Arthrobacter simplex var. viscosus* при високій аерації за 72 год. культивування трансформував 1.5 г етиленгліколю в 0.2 г полісахариду [24]. Tanaka з співавт. [25] виділили з різних ґрунтів азотфіксуючі псевдомонади, які утилізують етанол, етиленгліколь, н-пропанол та утворюють високов'язкі полісахариди. *Alcaligenes*

faecalis на мінеральних середовищах з етиленгліколем синтезував 6.2 г/л ЕПС, що складало 28% від заданого субстрату, а на н-парафінах вихід ЕПС становив 34-38% [26-28]. Кількість ЕПС, синтезованих *Mycobacterium lacticum* і *Mycobacterium cyaneum* на н-алканах варіює у різних штамів та складає від 0.1 до 4.5 г/л [29, 30].

У кінці 70-х, на початку 80-х років з'явилися перші повідомлення про емульсан - мікробний полісахарид, синтезований бактеріями *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 на основі етанолу [31 - 34]. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 синтезує емульсан на середовищі, яке вміщує як джерело вуглецю етанол, вуглеводні, жирні кислоти чи ацетат [33, 35], причому найбільш високий вихід ЕПС (4-5 г/л) відзначається на середовищі з етанолом. Етанол може бути частково замінений оцтовою кислотою. Продуктом емульсану є також штам *A.calcoaceticus* BD4, який росте на етанолі [36, 37]. Трохи пізніше були виділені два штами *A.calcoaceticus* A2 і HE5, які на середовищі з етанолом утворюють ЕПС, названий біодисперсаном [38, 39].

Здатність синтезувати в значних кількостях ЕПС виявлена у метилотрофних мікроорганізмів, причому як у облигатних метилотрофів, зокрема, у представників родів *Methylomonas* [40 - 42], *Methylococcus* [43, 44], *Methylocystis* [45], *Methylophilus* [46], *Methylobacillus* [47, 48], *Hyphomicrobium* [5], так і у факультативних - *Pseudomonas* [49, 50], *Blastobacter* [51], *Methylobacterium* [52].

У деяких випадках саме метанол є найбільш сприятливим субстратом для синтезу ЕПС. Відомі культури, що утилізують різні джерела вуглецю, але здатні синтезувати ЕПС тільки при вирощуванні на метанолі [53, 54].

Найбільш активними продуцентами ЕПС серед облигатних метаноласимільюючих бактерій є *Methylomonas mucosa* [42, 55, 56], *Methylophilus methylotrophus* [46], серед факультативних - *Pseudomonas polysaccharogenes* [50] і *Pseudomonas viscogena* [49, 57]. Ці культури адаптовані до високих концентрацій метанолу, характеризуються високою швидкістю росту, вихід ЕПС від субстрату складає 40-44%.

Наші дослідження показали, що для синтезу етаполану - комплексного полісахаридного препарату (продуцент *Acinetobacter sp.* 12S) може бути використаний широкий набір субстратів (етанол, ацетат, пропанол, піруват, C₄-дикарбонові кислоти, вуглеводи - моно- і дисахариди, крохмаль, меласа та ін. [8, 58]. Ця властивість вигідно відрізняє продуцент етаполану від відомих мікробних синтетиків, які здебільшого синтезують ЕПС тільки при вирощуванні на вуглеводах. Здатність *Acinetobacter sp.* 12S до утворення ЕПС на C₂-C₆-сполуках дозволяє розробити універсальну гнучку технологію одержання полісахаридів на основі широкого набору вуглецевих субстратів, або комплекс різних технологій, кожна з яких може бути реалізована в залежності від економічної доцільності, наявності та доступності того чи іншого субстрату,

необхідності одержання ЕПС з певними фізико-хімічними властивостями.

Показана можливість інтенсифікації синтезу етаполану при вирощуванні продуцента на суміші двох енергетично-нерівноцінних субстратів (етанол + глюкоза) [59]. На основі теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу біомаси та ЕПС на енергетично-дефіцитному субстраті (глюкоза) визначена “доповнююча” концентрація енергетично-надлишкового субстрату (етанол), яка дозволяє поповнити втрати вуглецю глюкози при окисленні її до CO_2 з метою одержання енергії для процесів конструктивного метаболізму, і підвищити ефективність конверсії вуглецю субстратів в ЕПС. Введення етанолу в середовище з глюкозою у молярному співвідношенні 3.1:1 дозволило збільшити кількість синтезованих ЕПС в 1.8-1.9 разів (до 7.5-8.0 г/л), їх вихід по відношенню до біомаси - в 1.4 – 1.7 рази (до 3.8 г ЕПС/г біомаси), вихід ЕПС від субстрату – в 1.5 – 2 рази (до 62-65%) у порівнянні з вирощуванням продуцента на моносубстратах.

Природа джерела азотного живлення. Як джерела азоту при одержанні мікробних полісахаридів звичайно використовують кукурудзяні екстракти, соєву та бавовникову муку, гідролізати дріжджів, а також мінеральні джерела - амонійні солі, нітрати, аміак [10]. При культивуванні продуцента альгінату *Azotobacter vinelandii* як джерело азотного живлення використовують газоподібний азот [60]. Ризобії синтезують ЕПС на середовищі, яке вміщує дріжджовий екстракт в концентрації до 3 г/л [61, 62]. Наявність дріжджового екстракту (0.5%) в оптимізованому середовищі для культивування *Gluconobacter oxydans* Л-1 дозволило забезпечити вихід левану на рівні 95% від теоретично можливого [63]. При вивченні впливу різних факторів на утворення альгінату бактеріями *Azotobacter vinelandii* було встановлено, що вихід ЕПС залежить від концентрації і типу органічного джерела азотного живлення, зокрема, від типу пептону [64]. Оптимізоване середовище, на якому спостерігається максимальний вихід глюкану (продуцент *Aureobasidium pullulans*), вміщує сечовину і пептон як джерела азоту [65]. Введення в середовище культивування *Xanthomonas campestris* 8162 меляси дозволило виключити додаткове внесення органічного джерела азоту [11, 66]. Для утворення емульсану середовище повинно містити азотвмісні компоненти (сульфат та хлорид амонію, нітрати або сечовину) в кількості, що переважає питому потребу культури, оскільки синтезований полімер складається в основному з похідних аміноцукрів [33]. При культивуванні метилотрофів – продуцентів ЕПС – використовують мінеральні джерела азоту - амонійні солі [50, 54]. Для факультативних метилотрофів бажана наявність у середовищі дріжджового екстракту. Так, вихід ЕПС на середовищах з дріжджовим екстрактом складає 25-44, без нього - 10-20% від субстрату. У присутності дріжджового екстракту кількість синтезованих метилотрофами ЕПС становить 3-5 г/л, без джерела

факторів росту – лише 1-2.5 г/л. Для утворення ЕПС дріжджами *Rhodotorula acheniorum* найбільш сприятливим джерелом азоту є сульфат амонію [67]. Синтез етаполану відбувається в присутності як органічного, так і неорганічного азоту, однак більш сприятливими є мінеральні джерела (амонійні, нітратні, амонійно-нітратні) [8].

Співвідношення джерел вуглецевого і азотного живлення при мікробному синтезі ЕПС. Для оптимального синтезу ЕПС суттєве значення має співвідношення вуглецю і азоту (C/N) в середовищі культивування продуцента [7, 8, 14, 22, 46, 66, 68, 69]. Так, на прикладі *Methylophilus methylotrophus* показано, що швидкість синтезу ЕПС і вихід його від спожитого метанолу залежать від значення C/N [46]. Оптимальним для утворення ЕПС цими бактеріями є співвідношення C/N = 12. Вихід ЕПС *Enterobacter sakazakii* максимальний при C/N = 20 [22]. Оптимальним для синтезу ксантану є співвідношення C/N = 14-20 [66]. При культивуванні *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 на середовищі з соєвою олією максимальний вихід емульсану спостерігається при співвідношенні вуглець/азот, що дорівнює 7-8 [35].

Linton з співавт. [70] досліджували здатність бактерій *Methylophilus sp.* NC1B 12047, *Pseudomonas extorquens* NC1B 9399 та дріжджів *Pichia pastoris* синтезувати ЕПС на середовищі з метанолом. Було встановлено, що тільки *Methylophilus sp.* синтезував ЕПС в умовах лімітування азотом при хемостатному культивуванні. Оптимальним для синтезу ЕПС було співвідношення метанол/сульфат амонію, що дорівнювало 10:1. Два інших досліджуваних мікроорганізми реагували на ліміт азоту збільшенням окислення метанолу до CO₂ [70].

Досліди з хемостатною культурою *Pseudomonas mendocina* продемонстрували, що найбільш ефективною умовою утворення альгінату є ліміт по азоту, причому із збільшенням глибини лімітування синтез альгінату підвищується [71]. При N-лімітуванні бактерій *Pseudomonas aeruginosa* в безперервній культурі також збільшується вихід альгінату [72]. Мутант метилотрофної бактерії *Methylobacterium rhodesianum* при лімітуванні азотом утворює меншу кількість внутрішньоклітинного поліоксибутирату, а синтез ЕПС при цьому збільшується в 10 разів [52]. При низьких швидкостях розбавлення середовища ($D < 0.1 \text{ год.}^{-1}$) в умовах лімітування азотом підвищується вихід курдлану [73]. Однак при збільшенні значень D синтезувався інший ЕПС.

Виявилось несподіваним, що при лімітуванні вуглецем бактерії *Azotobacter vinelandii* синтезували ЕПС з такою ж високою швидкістю, як і в умовах лімітування іншими субстратами [4]. Аналогічні результати одержані при культивуванні *Xanthomonas campestris* в умовах лімітування росту вуглеводами. В той же час при ліміті по глюкозі не спостерігали синтезу ЕПС бактеріями *Pseudomonas sp.*, а при

лімітуванні амонієм 43% використаної глюкози перетворювалось в полісахарид, концентрація якого досягала 7.5 г/л.

Слід відзначити, що культивування продуцентів ЕПС в хемостаті при лімітуванні вуглецем найчастіше призводить до появи немуюкідних варіантів і виродженню культури як продуцента ЕПС [1]. Однак в літературі є відомості про те, що в безперервній культурі ($D=0.05 \text{ год.}^{-1}$) на NH_4 -лімітованому середовищі також можливе виникнення немуюкідних варіантів [74]. Так, при культивуванні *Pseudomonas aeruginosa* в таких умовах впродовж 12 днів кількість синтезованого альгінату і процентний вміст мукоюкідних клітин знижувались практично до нуля. При цьому спостерігалось зниження активності ферментів, які беруть участь в синтезі альгінату.

Слід відзначити, що дуже низький вміст азоту в середовищі культивування продуцентів ЕПС призводить до зменшення рівня біомаси, змінення фізіологічного стану клітин та зниження виходу ЕПС від субстрату, хоча вихід ЕПС по відношенню до біомаси може збільшуватися [1].

Наші дослідження показали, що при вирощуванні *Acinetobacter sp.* 12S на суміші етанолу і глюкози «глибина» лімітування джерелом азотного живлення є одним з факторів, що регулюють спрямованість біосинтетичних процесів в сторону утворення ЕПС. Так, вивчення впливу концентрації джерела азоту (нітрату амонію) в середовищі культивування бактерій на синтез ЕПС показало, що, незалежно від вмісту етанолу та глюкози в середовищі, при зниженні концентрації азоту спостерігалось суттєве підвищення виходу ЕПС по відношенню до біомаси та субстрату [75].

Спосіб подачі субстрату. Для мікроорганізмів, які утилізують джерела вуглецю, здатні пригнічувати ріст клітин, велике значення має спосіб подачі субстрату. При культивуванні метанонокислюючих бактерій звичайно застосовують дробний або безперервний спосіб подачі субстрату. Введенням додаткової кількості метанолу в кінці експоненційної фази росту *Methylomonas mucosa* [76] вдалося збільшити концентрацію ЕПС в культуральній рідині, покращити його фізико-хімічні властивості та скоротити тривалість ферментації.

Дослідження особливостей метаболізму етанолу у продуцента етаполану показало, що при концентрації субстрату в середовищі вище 1% (за об'ємом) спостерігається накопичення ацетату в культуральній рідині, що призводить до пригнічення росту та синтезу ЕПС [77]. Встановлено, що проміжні продукти окислення етанолу та ацетальдегіду (НАДН та НАДФН) є інгібіторами активності ацетил-КоА-синтетази – ферменту, за допомогою якого ацетат залучається до метаболізму. Зниження початкової концентрації етанолу до 0,5% з наступним дробним внесенням субстрату в процесі культивування бактерій дозволило інтенсифікувати ріст бактерій і утворення ЕПС. Для прове-

дення біохімічних досліджень продуцента етаполану використовували мутантний штам бактерій, який не синтезує ЕПС, так як клітини ЕПС-утворюючого штаму неможливо було відділити від високов'язкого полісахариду з великою молекулярною масою. Результати досліджень регуляції ацетил-КоА-синтетази у мутантного штаму були використані для вдосконалення технології одержання етаполану на основі етанолу.

Вплив способу подачі субстрату на вихід ЕПС описаний для вуглеводокислюючих бактерій *Xanthomonas* [12], *Alcaligenes* [73] і гриба *Aureobasidium* [78]. Збільшення виходу ксантану було досягнуто при поступовому добавленні глюкози з постійною швидкістю до концентрації її в середовищі 7%. Підвищення швидкості утворення курдлану спостерігалось при додатковому внесенні в кінці експоненційної фази росту *Alcaligenes faecalis* глюкози до кінцевої концентрації 6%. Вихід пулулану вдалося підвищити в два рази (до 58 г/л) при дворазовому внесенні сахарози (по 2.5%) в процесі культивування продуцента при початковій концентрації субстрату 5%. Максимальна швидкість синтезу глюкану у *Schizophyllum commune* та *Sclerotium glucanicum* досягається в умовах періодичного культивування шляхом періодичної подачі субстрату [79].

Джерела фосфору. Як джерела фосфору звичайно використовують одно- та двоосновні фосфати калію і натрію. При культивуванні метилотрофів з метою одержання ЕПС японські дослідники рекомендували середовище з високим вмістом фосфорних солей: K_2HPO_4 – 5.5 і Na_2HPO_4 – 10.0 г/л [80]. Використання фосфорних солей в таких концентраціях дозволило іншим авторам провести виділення і відбір продуцентів ЕПС, а також забезпечувало високий рівень синтезу ЕПС як у моно-, так і змішаних культур мікроорганізмів [43, 81].

Використання гліцерофосфату натрію, який краще засвоюється бактеріями в порівнянні з неорганічними фосфорними солями, привело до збільшення виходу ЕПС у *Methylomonas mucosa* [82]. Гліцерофосфат натрію як єдине джерело фосфору або в поєднанні з неорганічними солями попереджує втрати інгредієнтів поживного середовища, які утворюють нерозчинні осади при стерилізації, а також менше залужне середовище в порівнянні з неорганічними фосфатами. Використання гліцерофосфату в середовищі культивування *Pseudomonas aeruginosa* – продуцента альгінату описано також у роботі Кгіег з співавт. [83]. Автори відзначають, що лімітування фосфатом інгібувало синтез альгінату. Однак при знятті лімітування добавленням однакової кількості (24 ммоль) K_2HPO_4 , гліцерофосфату або фосфорилхоліну найбільш помітна стимуляція біосинтезу альгінату (до 6 г/л) спостерігалась для фосфорилхоліну (в 3 рази вища, ніж при використанні інших сполук).

У роботі [84] відзначається, що синтез альгінату підвищується в 4 рази при зниженні вмісту фосфатів в середовищі до 0.1-0.8 ммоль, тобто майже в 10 разів у порівнянні з концентрацією цих солей, яка використовувалась іншими дослідниками. У деяких випадках при концентрації фосфатів вище 0.5 і нижче 0.2 ммоль має місце зниження синтезу ЕПС метилотрофними бактеріями [85]. Достатньо низькі концентрації фосфору в середовищі бажані при культивуванні бактерій роду *Klebsiella* - продуцентів ЕПС [86]. В той же час вихід ЕПС *Pseudomonas sp.* GSP-910 збільшується при підвищенні вмісту фосфатів в середовищі до 80 ммоль [87]. При вивченні впливу різних факторів на утворення альгінату і поліоксибутирату штамом *Azotobacter vinelandii* в періодичній культурі було встановлено, що при високій концентрації фосфатів в середовищі (7.5 г/л) збільшується вихід альгінату (до 6.5-7 г/л), а вміст поліоксибутирату зменшується до 40% і становить 1 г/л [64].

Іони металів. Відомо, що іони металів необхідні для росту мікроорганізмів і синтезу ними ЕПС [1], однак питання їх впливу на синтез ЕПС вивчені недостатньо.

На процес синтезу ЕПС в деяких випадках суттєвий вплив проявляють іони Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} . Так, додавання марганцю (500 мкмоль) в середовище культивування *Rhizobium meliloti* приводить до збільшення кількості синтезованих ЕПС більш, ніж в 4 рази (до 2.5 г/л) [88]. В присутності 100 мкмоль хлориду марганцю або сульфату алюмінію кількість ЕПС, утворюваних *Rhizobium trifolii* при вирощуванні на рідкому маннітно-дріжджовому середовищі, підвищується на 12 і 7% відповідно [89]. Вплив іонів марганцю на синтез ЕПС ризобіями відзначається також в роботі Арраппа і Престон [90]. На думку авторів, іони марганцю та алюмінію впливають на активність ферментів, які беруть участь у синтезі ЕПС у ризобій [89].

Експериментальні дані, одержані Гвоздяком з співавт. [66] показали, що додавання мікроелементів (в певній концентрації і поєднанні) збільшує вихід і покращує тиксотропні властивості ксантану. Lee з співавт. [91] було встановлено, що додавання іонів заліза (III) в періодичну культуру *Xanthomonas campestris* супроводжувалось підвищенням рівня біомаси і зниженням синтезу ксантану. Вихід ксантану значно підвищувався в присутності цинку і магнію [92]. Збільшення концентрації заліза від 0 до 50 мкмоль в середовищі культивування *Azotobacter chroococcus* В-8 супроводжувалось зниженням виходу ЕПС в 16 разів [93]. У той же час деякі метилотрофні бактерії - продуценти ЕПС – характеризуються більш високою активністю синтезу полісахаридів за наявності в середовищі 5-10 мг/л заліза [5, 6, 50, 51, 76]. Для кращого засвоєння іонів заліза в середовище додають хелатуючі агенти - лимонну і 2,3-дигідробензойну кислоти, ЕДТА. Оптимальна концентрація хелатуючих агентів складає 0.0001-0.02%.

При дослідженні впливу кальцію (0.068-2.72 ммоль) на утворення альгінату бактеріями *Azotobacter vinelandii* і *Pseudomonas aeruginosa* було встановлено, що низькі концентрації пригнічують ріст, особливо при високих швидкостях розбавлення середовища [94]. Із збільшенням концентрації Ca^{2+} в культуральній рідині синтез альгінату підвищується; при цьому спостерігається також покращення його реологічних властивостей. Автори вважають, що утворення більш гетерополімерних структур в цьому випадку обумовлене позаклітинною епімеризацією альгінату (зокрема, ізомеризацією полімануранової кислоти до гулуранової), на яку впливає кальцій [94, 95]. Підвищення синтезу альгінату бактеріями *Pseudomonas aeruginosa* спостерігалось при збільшенні вмісту Mg^{2+} в середовищі [7].

Дослідження синтезу альгінату *Azotobacter vinelandii* в умовах хемостатного культивування показали, що вихід ЕПС збільшується при лімітуванні MoO_4^{2-} , K^+ [4]. В умовах ліміту по Mg^{2+} спостерігали зниження виходу ксантану [96].

Стимулююча дія іонів Fe^{3+} на синтез пулулану відзначається в роботі Reeslev і Jensen [97]. Для синтезу емульсану *Acinetobacter calcoaceticus* необхідна наявність в середовищі двовалентних катіонів Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} в кількості 1-100 ммоль [33].

Температура і рН. Температура і рН середовища, оптимальні для росту продуцента, здебільшого є оптимальними і для синтезу ЕПС. У ряді випадків зниження температури нижче оптимальної супроводжується збільшенням концентрації ЕПС [3, 81, 98], що можна розглядати як прояв захисних функцій ЕПС у відповідь на неоптимальні умови існування продуцента. Крім того, цілком можливо, що у деяких мікроорганізмів температурний оптимум ферментів, які беруть участь в утворенні (чи полімеризації) ЕПС, відрізняється від оптимуму ферментів, що використовуються для синтезу біомаси. У *Pseudomonas sp.* GSP-910 оптимум температури для синтезу ЕПС складає 25°C , для росту – 18°C [87]. Для мутантного термофільного штаму *Methylomonas methanolica* оптимальною для синтезу ЕПС є температура 37°C , для росту – 35°C [99]. Williaws і Wimpenny [100] встановили, що при безперервному культивуванні *Pseudomonas sp.* NC1B 11264 концентрація біомаси залишається однаковою в діапазоні температури $20-37.5^\circ\text{C}$, тоді як ефективність перетворення глюкози в полісахарид і в'язкість культуральної рідини суттєво змінюються. Максимум утворення ЕПС спостерігається при 30°C .

Для мікроорганізмів - продуцентів ЕПС на метані – має велике значення термотолерантність, так як ріст на метані супроводжується виділенням більшої кількості тепла, ніж на метанолі [56]. Зниження температури культивування *Methylococcus thermophilus* нижче оптимальної супроводжується збільшенням виходу ЕПС [43]. Температура культивування продуцентів гелану та склероглюкану впливає на вихід ЕПС

[68, 101]. Із зниженням температури спостерігається утворення побічних продуктів: щавелевої, яблучної і фумарової кислот [101, 102]. Процес утворення ЕПС у гало- і термотолерантних бактерій роду *Bacillus* є термозалежним [103]. Молочнокислі бактерії *Lactococcus lactis* синтезують два ЕПС - нейтральний і кислий [104]. В умовах хемостатного культивування утворення нейтрального ЕПС знижується з підвищенням температури (з 65 мкг/мл при 25°C до 18 мкг/мл при 30°C). Концентрація кислого ЕПС (10 мкг/мл) не змінюється в діапазоні температур 20-30°C.

Синтез ЕПС у мікроорганізмів є більш чутливим до змін рН, ніж синтез біомаси. Підтримання рН постійним (на рівні 7.0) впродовж процесу культивування *Pseudomonas sp.* EPS-5028 сприяло підвищенню виходу ЕПС [105]. При культивуванні *Azotobacter vinelandii* рН середовища знижується до кінця процесу з 7.4 до 5.5 [84]. Вирощування бактерій в умовах постійного рН, рівного 7.0-8.2, призводило до збільшення кількості синтезованих ЕПС в 2-3 рази. Для створення оптимального для синтезу альгінату значення рН рекомендують введення в середовище культивування буферу, наприклад, трис-(гідроксиметил)-амінометану. Підвищення виходу ЕПС при культивуванні метилотрофних бактерій на середовищі Кодама [80] також обумовлене постійним нейтральним значенням рН впродовж процесу внаслідок наявності в середовищі фосфатного буферу.

У періодичній культурі *Aureobasidium pullulans* кількість дріжджоподібних клітин збільшується при підвищенні початкового значення рН від 3.5 до 6.0 [106]. Одночасно збільшується кількість синтезованого пулулану, тоді як рівень біомаси не змінюється. Крім того, при підтриманні рН в межах 5.0-6.3 синтез меланіну клітинами є мінімальним, що значно полегшує очистку пулулану. Як і в умовах періодичної культури, при хемостатному культивуванні *Aureobasidium pullulans* морфологія клітин визначається рН середовища: низькі значення рН є сприятливими для утворення ниткоподібних форм [107]. Оптимальним для біосинтезу пулулану було значення рН 4.5, при якому культура вміщувала 50% дріжджоподібних і 50% ниткоподібних клітин. Автори вважають, що в хемостатній культурі ниткоподібні клітини також синтезують пулулан при низьких значеннях рН середовища. З підвищенням рН рівень біомаси збільшується, але вихід пулулану знижується.

При культивуванні *Lactobacillus casei* CRL 87 в умовах постійного значення рН середовища, рівного 6.0, кількість синтезованих ЕПС була максимальною і складала 488 мг/л [108]. Однак вихід ЕПС по відношенню до одиниці біомаси був найбільшим при рН 4.0.

У літературі відзначається стимулююча дія органічних кислот (пірувату, цитрату, сукцинату, α -кетоглутарату) на утворення ксантану бактеріями *Xanthomonas*

campestris [13]. Автори вважають, що дія органічних кислот пов'язана з встановленням сприятливого для синтезу ксантану значення рН. Аналогічний ефект має місце при введенні в середовище культивування *X.campestris* фумарової кислоти [66]. У цьому випадку спостерігається збільшення виходу ксантану з 6.0 до 9.1 г/л.

Аерація. Переважна більшість мікроорганізмів - продуцентів ЕПС є строгими аеробами, рідше - факультативними анаеробами.

Анаеробні бактерії *Clostridium perfringens* здатні продукувати ЕПС при культивуванні в строго анаеробних умовах [1]. *Acetobacter xylinum* в статичних умовах культивування продукує більше целюлози, ніж при аерації [109]. Рівень дихання бактерій впливає на інтенсивність синтезу ЕПС: при більш активному диханні кількість ЕПС зменшується, так як більше вуглецевого субстрату перетворюється в CO_2 .

Потреба в розчиненому кисні строго специфічна для кожного продуцента, вона встановлюється експериментально і змінюється на різних фазах росту. Для деяких культур високий рівень аерації є необхідним у фазі експоненційного росту і небажаним у стаціонарній фазі [2 - 4]. Навпаки, для інших продуцентів ЕПС високий рівень аерації є необхідним впродовж всього процесу культивування [54].

Слід відзначити, що концентрація розчиненого кисню в середовищі має суттєве значення при одержанні ЕПС на основі C_1 - C_2 -сполук. На початку процесу культивування ця величина не повинна перевищувати 10-20% від насичення повітрям. При більш високих концентраціях розчиненого кисню спостерігається інгібування росту мікроорганізмів, що може бути пов'язане не тільки з накопиченням токсичних похідних кисню, але і з утворенням токсичних продуктів окислення C_1 - C_2 -сполук, які пригнічують ріст продуцента.

При вивченні впливу умов культивування на ріст і утворення ЕПС *Acinetobacter sp.* 12S було встановлено, що на початку процесу бактерії є чутливими до високих концентрацій розчиненого кисню. Так, рівень pO_2 не повинен перевищувати 20-30% насичення повітрям (при концентрації розчиненого кисню в середовищі понад 40% спостерігається уповільнення, а понад 50% - пригнічення росту культури) [8, 110]. Додання синтетичного антиоксиданту іонолу (0.01%) в середовище при вирощуванні *Acinetobacter sp.* 12S в ферментаторі в умовах високої концентрації розчиненого кисню (50% насичення) супроводжувалось відсутністю лаг-фази, збільшенням швидкості росту бактерій і синтезу ЕПС, скороченням тривалості культивування.

Аналогічні закономірності були встановлені при реалізації від'ємно-доливного способу культивування *Acinetobacter sp.* 12S без внесення іонолу. У цьому випадку пригнічення росту бактерій не спостерігали і при більш високих значеннях pO_2 (до 80% насичення). Більш того, при вирощуванні *Acinetobacter sp.* 12S від'ємно-доливним спо-

собом в умовах високих концентрацій розчиненого кисню (70-80% насичення) відзначалося підвищення максимальних питомих швидкостей росту і синтезу ЕПС, а також зміщення часу їх досягнення в більш ранню ростову фазу. Очевидно, в таких умовах захист клітин від токсичної дії кисню зумовлений високою (15-20%) концентрацією інокуляту з стаціонарної фази росту (високов'язкої культуральної рідини, що містить ЕПС). На нашу думку, це явище можна розглядати як прояв адаптивних механізмів, що дозволяють популяції вижити в несприятливих умовах.

Із збільшенням швидкості перемішування від 200 до 800 об/хв. вихід пулулану підвищувався в 4 рази [111]. Наявність взаємозв'язку між рівнем аерації, морфологічними формами продуцента і біосинтезом пулулану відзначається в роботі Simon з співавт. [112]. Вихід альгінату також в значній мірі залежить від концентрації розчиненого кисню в середовищі культивування продуцента [64, 71]. При високій концентрації кисню спостерігається зниження швидкості синтезу альгінату. В таких умовах більша частина вуглецю перетворюється в CO_2 . При нестачі кисню вихід ЕПС також знижується, при цьому в клітинах *Azotobacter vinelandii* накопичується надлишок полі- β -гідроксибутирату. Так, в періодичній культурі на безазотному середовищі при швидкості перемішування 120 об/хв. вихід альгінату складав лише 1 г/л, а кількість полі- β -гідроксибутирату перевищувала 50% від ваги біомаси [64]. При збільшенні швидкості перемішування до 280 об/хв. вихід альгінату підвищувався до 6.5-7.0 г/л; вміст полі- β -гідроксибутирату в клітинах знижувався до 30%.

Можливість регуляції біосинтезу ЕПС шляхом змінення рівня аерації (з використанням різних типів мішалок і способів перемішування) показана в роботах Rau з співавт. [79] і Осадчої з співавт. [113]. Дослідження синтезу ксантану при культивуванні продуцента в ферментаторі показало, що максимальний вихід ЕПС спостерігався при швидкості перемішування 150 об/хв. у перші 48 год. і 280 об/хв. впродовж решти часу, необхідного для досягнення найвищої в'язкості [114]. Встановлено, що оптимальна аерація складає 0.5 л/л середовища за хв., а швидкість споживання кисню варіює від 0.4 ммоль O_2 /л за хв. при швидкості перемішування 150 об/хв. до 1.5 ммоль O_2 /л за хв. при 280 об/хв.

Показано, що питома швидкість утворення β -1,3-глюкану у *Alcaligenes faecalis* залежить від швидкості споживання кисню клітинами, яка в умовах оптимального синтезу полімеру становить 50 ммоль O_2 /л за год. [115]. Для синтезу емульсанів з етанолу потік кисню повинен бути 190 ммоль O_2 /л за год і вище [33].

Як показано Linton з співавт. [70], при культивуванні *Methylophilus sp.* в умовах лімітування киснем полісахарид утворюється в низьких концентраціях, однак при збільшенні глибини лімітування концентрація ЕПС в культуральній рідині підвищується.

ся. Утворенню ЕПС *Methylomonas methanolica* MV 13 сприяє висока температура культивування, низька швидкість росту і лімітування киснем [99]. Причому кисень є найбільш суттєвим лімітуючим фактором для максимального виходу ЕПС при надлишку вуглецю і азоту як у безперервному, так і в періодичному процесі культивування продуцента. Southgate і Goodwin [46] показали, що *Methylophilus methylotrophus* при безперервному культивуванні в умовах ліміту по метанолу синтезує ЕПС зі швидкістю 18 мг/год.г біомаси. При лімітуванні росту бактерій киснем або азотом цей показник збільшується в 3 і 4 рази відповідно.

Linton з співавт. [70], а також Southgate і Goodwin [46] вважають, що синтез ЕПС з метанолу є ефективним шляхом видалення формальдегіду при обмеженості дихання клітин за умови, що утворення ЕПС не призводить до загального надсинтезу відновлювальних еквівалентів. Таким чином, синтез ЕПС можна розглядати як відповідну реакцію і захисний фактор клітин на дію токсичних метанолу і формальдегіду.

На стадії утворення ЕПС різко підвищується в'язкість культуральної рідини, що ускладнює доступ кисню до клітин. Крім того, перенесення великих мас кисню при періодичному культивуванні може призвести до накопичення в середовищі токсинів і загибелі клітин [3, 116, 117]. При безперервному культивуванні цей фактор має менше значення. На ефективність процесів аерації можуть суттєво впливати конструкція ферментатора і тип мішалки. Так, розроблено ферментатор, оснащений низькошвидкісною мішалкою незвичайної конструкції, який дозволяє вести процес без ліміту по кисню [4, 117]. Розроблено тип реактора для одержання ксантану, який відрізняється від традиційних реакторів тим, що мішалка має петлевидну форму, і перемішування здійснюється ерліфтним способом [118]. Використання такого реактора дозволяє підвищити продуктивність біосинтезу ЕПС і скоротити тривалість культивування продуцента.

Культивування продуцентів ЕПС в періодичному та безперервному режимах.

У мікроорганізмів-продуцентів ЕПС синтез полісахаридів може бути зв'язаним з ростом, наприклад, у *Methylocystis parvus* ОВВР [54], частково зв'язаним - *Xanthomonas*, *Methylomonas methanolica* [1, 99], і не зв'язаним - *Alcaligenes*, *Rhizobium* [1, 119].

У більшості мікроорганізмів час досягнення максимальної питомої швидкості росту і синтезу ЕПС не співпадає. Як правило, максимальна швидкість синтезу ЕПС спостерігається в кінці експоненційної, початку стаціонарної фази росту. Однак концентрація ЕПС в культуральній рідині досягає найбільш високого значення в кінці періодичного процесу, тобто в стаціонарній фазі. В залежності від умов культивування тривалість періодичного процесу для різних продуцентів ЕПС складає від 24 до 120 годин.

Визначення фази росту продуцента, в якій швидкість синтезу ЕПС є максимальною, а також фази росту, в якій досягається максимальна концентрація ЕПС, дозволить встановити оптимальну тривалість процесу при періодичному культивуванні. Зпівставлення часу досягнення максимальної швидкості росту і синтезу ЕПС дозволяє визначити оптимальну швидкість розбавлення середовища при безперервному культивуванні. Так як максимальна швидкість синтезу ЕПС у продуцентів здебільшого не співпадає у часі з максимальною швидкістю їх росту, можна передбачити, що для оптимального виходу ЕПС вести безперервний процес при високих швидкостях розбавлення середовища недоцільно.

Максимальна питома швидкість утворення емульсану у *Acinetobacter calcoaceticus* спостерігається в пізній експоненційній фазі росту; тривалість процесу культивування складає 24-30 годин [33].

Показано, що швидкість утворення ЕПС метилотрофним штамом *Methylobacterium methanolicum* M13V є максимальною в кінці експоненційної фази росту і поступово знижується в фазі сповільненого росту [99]. Однак кількість синтезованих ЕПС та їх вихід зростає після припинення росту.

Утворення ЕПС у *Methylocystis parvus* ОВВР починалось і закінчувалось майже в той же час, що і ріст культури. Однак в'язкість культуральної рідини суттєво підвищувалась у стаціонарній фазі росту (від 160 до 900 мПа·с) [54].

В облигатних метаноокислюючих бактерій *Methylococcus sp.* і *M. thermophilus* максимальна швидкість синтезу ЕПС спостерігається у фазі сповільненого росту, концентрація ЕПС в культуральній рідині досягає максимуму в стаціонарній фазі [8, 43]. Показано, що умови культивування, а також спосіб одержання інокуляту дозволяють зсунути час досягнення максимальної швидкості утворення ЕПС в більш ранню ростову фазу, що дає можливість скоротити тривалість культивування продуценту з метою одержання максимальної кількості ЕПС [8].

При періодичному культивуванні *Pseudomonas mendocina* синтез альгінату починається в експоненційній фазі росту, однак основна кількість полімеру (більше 75%) синтезується після вичерпання в середовищі джерела азоту [71]. Аналогічні закономірності синтезу альгінату встановлені для іншого продуценту цього ЕПС - *Azotobacter vinelandii* [16]. У той же час для *Pseudomonas aeruginosa* максимальний вихід альгінату відзначений в експоненційній фазі росту [72].

При вивченні хемостатного культивування *Pseudomonas aeruginosa* (в умовах лімітування азотом) встановлено, що синтез альгінату не залежить від швидкості розбавлення середовища в межах значень $D=0.05-0.1 \text{ год.}^{-1}$ [72]. Питома швидкість утворення ЕПС зростала при підвищенні швидкості розбавлення. Однак при тривалому

культивуванні в таких умовах штам з великою частотою дисоціював і утворював немуюкідні варіанти. В роботі Williams з співавт. [74] відзначається, що поява немуюкідних варіантів *P.aeruginosa* спостерігається також при вирощуванні бактерій на N-лімітованому середовищі при низьких швидкостях розбавлення (0.05 год.^{-1}). Досліди з хемостатною культурою *P. mendocina* показали, що оптимальна швидкість розбавлення середовища для синтезу альгінату складає 0.05 год.^{-1} [71]. У таких умовах при ліміті по азоту вихід альгінату складав 64%, тоді як при лімітуванні вуглецем - лише 23.7%. *Azotobacter vinelandii* характеризується високим рівнем синтезу альгінату при значеннях $D=0.05-0.25 \text{ год.}^{-1}$, швидкість синтезу ЕПС у вказаних межах значень D практично постійна, вихід альгінату з сахарози варіює в залежності від лімітуючого джерела живлення [120, 121].

Максимальний синтез ЕПС бактеріями *Agrobacterium radiobacter* NC1В при безперервному культивуванні в умовах лімітування азотом спостерігається при низьких швидкостях розбавлення ($0.04-0.08 \text{ год.}^{-1}$) [14]. Найвищий вихід курдлану у безперервному процесі при лімітуванні азотом відзначається при швидкостях розбавлення середовища менше 0.1 год.^{-1} [73]. Для *Xanthomonas campestris* також показано, що швидкість утворення ксантану є функцією ступеню розбавлення середовища [7, 66, 122]. Аналогічні закономірності встановлені для C_1 -окислюючих [46, 99], а також для молочнокислих бактерій [123].

Вплив умов культивування на склад і властивості мікробних ЕПС

Умови культивування впливають не тільки на такі показники процесу, як кількість ЕПС, швидкість їх утворення, вихід ЕПС від субстрату, але і на фізико-хімічні властивості синтезованих ЕПС.

Важливою характеристикою мікробних ЕПС є реологічні властивості їхніх розчинів, які в значній мірі залежать від якісного та кількісного складу полісахаридів. Відмінності в реологічних характеристиках ЕПС, синтезованих одним продуцентом, можуть бути пояснені його здатністю синтезувати декілька різних за фізико-хімічними властивостями полімерів, а також зміненням кількості бокових замісників у складі ЕПС в залежності від умов культивування [7, 54, 117, 124, 125]. Крім того, в процесі безперервного культивування можливе виникнення варіантів продуцентів, які продукують ЕПС з різними властивостями (*Xanthomonas campestris*, *Azotobacter vinelandii*) [1]. На фізико-хімічні властивості мікробних ЕПС в значній мірі впливають такі фактори, як

тривалість ферментації, склад середовища, спосіб подачі субстрату, рівень аерації та ін. Таким чином, дослідження впливу умов культивування продуценту на склад та властивості синтезованих ЕПС є одним з першочергових завдань біотехнології мікробних ЕПС.

Хімічний склад ЕПС. На відміну від внутрішньоклітинних полісахаридів, генетична інформація про біосинтез ЕПС часто буває локалізована в плазмідах, що, можливо, є причиною лабільності їх синтезу [126]. На відміну від структурно-метаболических і структурних полісахаридів клітинної стінки склад ЕПС може розрізнятися у одного і того ж продуцента в залежності від умов його культивування. При цьому основний ланцюг полісахариду найчастіше залишається незмінним, а найбільших змін зазнають бокові ланцюги – їх довжина, склад, число розгалужень, а також склад і природа замісників - ацильних залишків, О-метильних груп, залишків піровиноградної та інших оксикислот, сульфатів і фосфатів. Склад мікробних ЕПС в значній мірі підданий впливу таких факторів, як тривалість ферментації, склад середовища, спосіб подачі субстрату і його природа, ступінь розбавлення середовища та тип лімітуючого фактора.

Так, дослідження хімічного складу ксантану, одержаного при безперервному культивуванні в умовах шести різних варіантів лімітування показали, що співвідношення моносахаридів в ЕПС не змінюється [117]. В роботі Evans з співавт. [127] показано, що в умовах безперервного культивування при лімітуванні калієм або магнієм в складі ксантану знижувався вміст D-манози і глюкуронової кислоти. При цьому суттєво нижчою була в'язкість культуральної рідини. У складі ЕПС *Xanthomonas juglandis* спостерігали різні кількості рамнози в залежності від лімітуючого фактора [128].

Вміст пірувату в складі ксантану може варіювати від 0 до 7.5% в залежності від складу середовища і штаму [2, 7, 96, 116, 117, 124, 129-131]. Ксантан з низьким вмістом пірувату одержують при зниженні концентрації азоту в середовищі і невисокому рівні аерації [130]. Так, при концентрації $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ в середовищі 0.1% і аерації 0.25 л/л середовища за хв. вміст залишків пірувату в ксантані складає 2%. Введення в середовище K_2HPO_4 і підвищення аерації до 1.5 л/л середовища за хв. супроводжується синтезом високов'язкого ксантану, який вміщує більш як 4% пірувату [117]. Вихід ксантану від заданого субстрату в обох випадках був однаковим і становив 50-60%.

Як показали Tait з співавт. [132] на синтез, склад і в'язкість розчинів ксантану при культивуванні *Xanthomonas campestris* в періодичній культурі впливали тривалість процесу культивування і ліміт джерела вуглецевого живлення; у безперервному процесі – швидкість розбавлення середовища. При високих значеннях швидкості розбавлення ксантан характеризувався більшим вмістом ацетильних груп, меншим - пірувату; при цьому спостерігали зниження в'язкості розчинів ЕПС.

Rogovin з співавт. [114], Silman і Rogovin [122] приводять дані про змінення в'язкості розчинів ксантану під час періодичного і безперервного культивування продуцента. При одностадійному способі безперервного культивування в'язкість розчинів ксантану зменшувалась по мірі підвищення швидкості розбавлення середовища, в той час як швидкість утворення ксантану зростала. Очевидно, причинами збільшення швидкості синтезу ЕПС в цьому випадку є більш ефективне перемішування і масоперенос, що мають місце при низьких значеннях в'язкості культуральної рідини, тобто при високій швидкості розбавлення середовища.

В залежності від умов культивування *Azotobacter vinelandii* і *Pseudomonas aeruginosa* співвідношення гулурунової і манурунової кислот в складі альгінату може варіювати, однак первинна форма утворюваного полімеру залишається незмінною і являє собою поліманурунову кислоту [117]. Під дією позаклітинної альгінатепімерази відбувається ізомеризація частини поліманурунової кислоти до гулурунової. Активність цього ферменту в значній мірі залежить від вмісту кальцію в середовищі культивування продуцента. Підвищення концентрації кальцію супроводжується збільшенням вмісту гулурунової кислоти в складі альгінату і суттєвим покращенням його реологічних властивостей [94, 117, 133]. В той же час в роботі Deryabin з співавт. [134] відзначається, що більш високою в'язкістю характеризуються розчини альгінату з великим вмістом у його складі манурунової, а не гулурунової кислоти. При цьому співвідношення кислот в складі альгінату залежить від концентрації фосфору в поживному середовищі: при збільшенні вмісту фосфору співвідношення манурунової і гулурунової кислот зростає від 2 до 25.

Реологічні властивості альгінату залежать не тільки від співвідношення у його складі гулурунової та манурунової кислот, але і від вмісту О-ацетильних груп. Показано, що альгінат, який практично не містить гулурунової кислоти, характеризується високим вмістом О-ацетильних груп [95] тобто ацетильованими є, в основному, залишки манурунової кислоти. Однак до теперішнього часу не вдалось остаточно в'яснити вплив умов культивування на вміст ацетильних груп в альгінаті і його реологічні властивості. Зокрема, при культивуванні продуцента на середовищі з низьким вмістом кальцію не вдалось одержати високоацетильований альгінат.

При культивуванні бульбочкових бактерій роду *Rhizobium* в присутності марганцю або алюмінію спостерігали зміни в хімічному складі синтезованих ЕПС [89, 90]. Так, додавання 100 мкмоль хлориду марганцю чи сульфату алюмінію в середовище культивування *Rhizobium trifolii* супроводжувалось збільшенням в складі синтезованих ЕПС вмісту D-глюкози на 24 - 32% і зниженням залишків урунових кислот на 25 - 35% [89]. На думку автора, іони марганцю і алюмінію впливають на активність фер-

ментів, які беруть участь в синтезі ЕПС у ризобій. У присутності 40 мкмоль марганцю штам бульбочкових бактерій синтезував ЕПС із зниженим вмістом уронової кислоти і неуглеводних компонентів, але з підвищеним вмістом глюкози [90].

Аналіз моносахаридного складу ЕПС, синтезованих представниками родів *Klebsiella*, *Acinetobacter* і *Rhodotorula* на різних стадіях росту, показав, що він залишається незмінним у ЕПС *Acinetobacter* і *Rhodotorula*, однак широко варіює у ЕПС *Klebsiella* [135, 136]. Так, в експоненційній фазі росту утворюється ЕПС з високим вмістом манози; у складі ЕПС, синтезованого в пізній стаціонарній фазі, маноза не виявлена. По мірі росту продуцента вміст рамнози в ЕПС збільшувався з 12 до 55%, а галактози - знижувався з 63 до 45%. При зміні джерела вуглецю в середовищі змінювався склад ЕПС *Klebsiella sp.* K32 і *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. Так, найбільш високий вміст манози у складі ЕПС цих бактерій відзначено при рості на середовищі з рамнозою.

В залежності від природи джерела вуглецевого живлення в середовищі культивування *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 синтезуються α - або β -емульсани, які відрізняються вмістом залишків жирних кислот і їх співвідношенням [33]. При культивуванні штаму на середовищі з етанолом, пальмітатом натрію або додеканом, утворюються α -емульсани, які вміщують 5-19% залишків жирних кислот. При використанні як джерела вуглецю пентадекану, гексадекану чи гептадекану синтезуються тільки β -емульсани, в складі яких виявлено 2-3% жирних кислот. Емульсани з високим вмістом жирних кислот характеризуються більш високою емульгуючою активністю; причому на емульгуючу активність впливає як загальна кількість залишків жирних кислот, так і їх співвідношення [31, 33].

Перенесення змішаної культури метанол- і метанокислюючих бактерій з метану на метанол супроводжувалось зникненням в ЕПС залишків дезоксицукрів - фукози і рамнози [137]. Модифікація полісахариду була обумовлена селективним інгібуванням метанолом метанокислюючих бактерій, які здійснювали дезоксилювання галактози і манози. У той же час є дані про те, що при вирощуванні *Blastobacter viscosus* [51] на метанолі і глюкозі моносахаридний склад ЕПС не змінювався. Співвідношення глюкози і галактози в складі ЕПС, синтезованих метанокислюючими бактеріями *Methylococcus capsulatus* в умовах безперервного культивування, змінювалось в залежності від типу лімітуючого субстрату [138]. При лімітуванні фосфором співвідношення глюкози і галактози складало 1:1, амонійним азотом - 1:2, киснем - 1:14.

В залежності від умов культивування змінюється склад і фізико-хімічні властивості ЕПС, синтезованих фітопатогенною бактерією *Clavibacter michiganense* [139] бактеріями *Volcaniella eurihalina* [140], *Bacillus polymyxa* [141], молочнокислими бак-

теріями *Lactobacillus delbrueckii* [142]. Так, наприклад, при вирощуванні *Bacillus polytuxa* на середовищах з різними джерелами азоту (дріжджовий автолізат, пептон, білково-вітамінний концентрат, сульфат амонію) співвідношення нейтральних моносахаридів в складі поліміксану практично не змінюється, однак вміст уронових кислот варіює в широких межах - від 9 до 35% [141]. Автори відзначають, що поліміксани з різним вмістом уронових кислот характеризуються різною в'язкістю розчинів.

При вивченні впливу умов культивування *Acinetobacter sp.* 12S на склад етаполану було встановлено, що в залежності від природи джерела вуглецю та концентрації катіонів калію в середовищі вміст в ЕПС залишків піровиноградної кислоти варіює (в % до маси умовно сухої речовини) від 3.0 до 4.3; уронових кислот - від 15.3 до 22.5; жирних кислот - від 1.8 до 6.5 [8, 143, 144]. Молярне співвідношення глюкози, манози, галактози та рамнози у складі всіх ЕПС залишається незмінним і становить 3:2:1:1. При вирощуванні продуцента на суміші етанолу та глюкози хімічний склад ЕПС не відрізнявся від синтезованого на моносубстратах, однак вміст жирних кислот у складі ЕПС був найвищим на змішаному субстраті [145].

Молекулярна маса ЕПС. Одним з факторів, які визначають реологічні властивості розчинів мікробних ЕПС, є молекулярна маса цих полімерів, величина якої варіює в залежності від умов культивування продуцента. Так, вивчення впливу умов культивування (заміна джерела вуглецевого живлення, зміна рН) на утворення і властивості ЕПС дріжджів *Bullera alba* показало, що синтезовані ЕПС мали однаковий моносахаридний склад, але різну молекулярну масу [146]. Зміна складу поживного середовища при культивуванні *Pseudomonas viscogena* супроводжувалась підвищенням виходу ЕПС, однак при цьому зменшувалась його молекулярна маса [147]. При культивуванні облигатного метилотрофа *Methylomonas parvus* ОБВР біосинтез біомаси та ЕПС починався і закінчувався одночасно, однак в стаціонарній фазі росту при постійній концентрації полісахариду в'язкість культуральної рідини збільшувалась в 6 разів. Припускається, що це явище обумовлене структуруванням розчинів ЕПС і підвищенням його молекулярної маси [54]. Молекулярна маса ЕПС, синтезованих молочнокислими бактеріями *Lactococcus lactis* у безперервному процесі, залежить від природи лімітуючого фактору [123]. Із збільшенням тривалості культивування *Aureobasidium pullulans* молекулярна маса ЕПС знижується [148].

Слід відзначити, що питання про те, чи існує зв'язок між швидкістю росту мікроорганізмів і молекулярною масою синтезованих полісахаридів, на сьогоднішній день практично не досліджене. Відомі поодинокі дослідження, присвячені його вивченню. Так, показано, що *Salmonella enteritidis* при високій швидкості росту продукує ліпополісахарид з більш короткими ланцюгами О-антигену [1]. Можливо, аналогічні зако-

номірності характерні і для ЕПС. Evans з співавт. [127] показали, що ксантан, синтезований *Xanthomonas juglandis* при низьких швидкостях розбавлення середовища ($D=0.03 \text{ год.}^{-1}$), складається з більш довгих нерозгалужених молекул, ніж полісахарид, одержаний при високих швидкостях розбавлення.

Не дивлячись на те, що для багатьох ЕПС достатньо добре вивчена залежність реологічних властивостей розчинів від величини молекулярної маси, до теперішнього часу не вдається одержати ЕПС з заданою молекулярною масою. Так, молекулярна маса хітозану і пулулану варіює в досить широких межах (від 200 тис. до 4 млн.) в залежності від складу середовища, тривалості культивування, рН, аерації [149]. Потрібні додаткові дослідження для того, щоб встановити залежність між умовами культивування продуцента, швидкістю його росту і молекулярною масою синтезованих полісахаридів.

Наші дослідження показали, що в процесі періодичного культивування *Acinetobacter sp.* в залежності від початкової концентрації одновалентних катіонів в середовищі у складі синтезованого етаполану змінюється співвідношення фракцій різної молекулярної маси, що призводить до змінення реологічних властивостей розчинів ЕПС [143, 150, 151].

У деяких випадках продуценти ЕПС синтезують позаклітинні ферменти, які розщеплюють свій власний ЕПС, в результаті чого знижується їх молекулярна маса і в'язкість культуральної рідини. Подавлення активності альгінатліази при культивуванні *Azotobacter vinelandii* залишається однією з основних проблем економічного виробництва високомолекулярних мікробних альгінатів. Найбільш ефективним засобом проти зниження в'язкості альгінатів виявилось введення в середовище культивування протеолітичних ферментів, які розщеплюють альгінатліазу [117]. Подібні проблеми зустрічаються при одержанні пулулану і ксантану.

Слід відзначити, що молекулярна маса мікробних ЕПС може змінюватися не тільки в різних умовах культивування продуцента, але також в процесі виділення і очистки ЕПС. Так, наприклад, молекулярна маса поліміксану після осадження етанолом знижувалась майже в 8 разів [141]. Авторами запропоновано нетрадиційні методи виділення та очистки ЕПС (електрокоагуляція, ультрафільтрація культуральної рідини, обробка культуральної рідини протеазами), які дозволяють одержувати високомолекулярні (2-3 млн.) ЕПС, розчини яких характеризуються високою в'язкістю.

Середня молекулярна маса етаполану після осадження його органічними розчинниками знижувалась у 3 рази, однак культивування продуцента у двостадійному процесі з внесенням у середовище на другій стадії формальдегіду дозволило підвищити молекулярну масу синтезованого ЕПС і покращити реологічні властивості його розчинів [152].

Зміна співвідношення синтезованих ЕПС. Відомо, що один і той же мікроорганізм може одночасно синтезувати більше одного типу ЕПС. Так, наприклад, деякі штами бактерій роду *Pseudomonas*, а також *Azotobacter vinelandii* утворюють два ЕПС - альгінат і леван [134, 153, 154]. *Rhizobium meliloti* утворює сукциноглюкан і галактоглюкан [155-157], *Alcaligenes faecalis* - курдлан і глюкан [1].

Зміна умов культивування часто супроводжується зміненням співвідношення утворюваних ЕПС або переважаючому синтезу одного з них, що врешті-решт також впливає на реологічні властивості кінцевого продукту.

Метилотрофний штам *Methylophilus methylophilus* у періодичному процесі при лімітуванні киснем утворює два ЕПС, розчини яких характеризуються різною в'язкістю [46]. Хімічний склад обох ЕПС є однаковим. При культивуванні штаму в хемостатному режимі в ліміті по азоту чи кисню синтезувався тільки ЕПС, який утворює нев'язкі розчини. Автори вважають, що різна в'язкість розчинів ЕПС обумовлена різною довжиною ланцюга і молекулярною масою цих полімерів.

Підвищення сахарози в середовищі культивування *Pseudomonas phaseolicola* супроводжується синтезом левану, в той час як на середовищах з глюкозою або глюконатом утворюється тільки альгінат [153]. Співвідношення левану і альгінату, утворюваних *P. syringae pv. phaseolicola*, також залежить від умов культивування продуцента [154]. Додання в середовище NaCl і етанолу супроводжується збільшенням синтезу левану.

При культивуванні *Azotobacter vinelandii* на середовищах з гліцерином і глюкозою леван складає відповідно 80 і 9% від загальної кількості утворюваних ЕПС [134].

При низькій осмолярності (0 і 0.2 М) середовища культивування *Rhizobium meliloti* спостерігається переважне утворення галактоглюкану; при підвищенні осмолярності до 0.4 і 0.6 М синтезується, в основному, сукциноглюкан [155]. Astete і Leigh [156] показали, що *Rhizobium meliloti* утворює галактоглюкан при лімітуванні росту бактерій фосфатами.

Молочнокислі бактерії *Lactococcus lactis subsp. cremoris* синтезують кислий і нейтральний ЕПС [104]. При хемостатному культивуванні з підвищенням температури утворення нейтрального ЕПС знижується; його продукція бактеріями збільшується в умовах голодування клітин по азоту.

В залежності від тривалості культивування *Aureobazidium pullulans*, складу середовища, рівня аерації і перемішування спостерігається зміна співвідношення двох полісахаридів - пулулану і ЕПС, здатного трансформуватися в пулулан [112]. Автори відзначають наявність взаємозв'язку між морфологічними формами гриба (бластоспори, хламідоспори, гіфи, перехідні форми), які переважають в тих чи інших умовах куль-

тивування, і рівнем синтезу обох ЕПС. Так, при наявності значного вмісту хламідоспор синтез пулулану спостерігається за будь-яких умов культивування, при вмісті гіфів більше 3% пулулан не утворюється [112]. При вирощуванні *Aureobazidium pullulans* на середовищі з глюкозаміном кількість синтезованого пулулану є невисокою, однак при цьому утворюються щонайменше два інших ЕПС [23].

Burkholderia cepacia утворює два різних за хімічним складом ЕПС, співвідношення яких залежить від умов культивування [158]. Аналогічні закономірності встановлені для полісахаридів, синтезованих термофільними бацилами [159]. *Streptococcus thermophilus* одночасно синтезує два ЕПС однакового хімічного складу, але різної молекулярної маси [160]. Співвідношення між обома ЕПС залежить від співвідношення вуглець/азот у середовищі.

Комплексний полісахаридний препарат етаполан, синтезований бактеріями *Acinetobacter sp.*, складається з нейтрального і двох кислих ЕПС, один з яких є ацильованим [144]. Нейтральний ЕПС є мінорним компонентом. Ацильований і неацильований полісахариди є ідентичними за молярним співвідношенням D-глюкози, D-манози, D-галактози, L-рамнози, D-глюкуронової і піровиноградної кислот (3:2:1:1:1:1) та структурою повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга. Різниця між цими ЕПС полягає в тому, що ацильований полісахарид вміщує жирні кислоти (C₁₂-C₁₈) [161]. Реологічні властивості розчинів етаполану, які обумовлюють його практичну цінність, визначаються співвідношенням в його складі ацильованого і неацильованого компонентів, а також вмістом жирних кислот в ацильованому полісахариді. Дослідження показали, що в процесі періодичного культивування *Acinetobacter sp.* в залежності від початкової концентрації одновалентних катіонів в середовищі в складі синтезованих ЕПС змінюється співвідношення обох кислих ЕПС, в також вміст жирних кислот в ацильованому полісахариді, що супроводжується зміненням властивостей розчинів етаполану [143, 150, 151, 162]. Для утворення високоацильованого ЕПС, який вміщує 12-16% жирних кислот, концентрація K⁺ і Na⁺ в середовищі повинна бути не нижче 0.09 М. [162].

Молекулярно-біологічні та генетичні дослідження синтезу ЕПС. З середини 80-х років з'являються публікації, присвячені генетичним дослідженням штамів-продуцентів ЕПС [164-167]. Ці дослідження стосувались, в основному, ідентифікації генів, які кодують синтез ЕПС у різних мікроорганізмів, і були направлені на підвищення продуктивності продуцента і збільшення виходу ЕПС. Найбільш повно ця інформація викладена в огляді Sutherland [168]. З виникненням технології рекомбінантних ДНК стало можливим вдосконалення існуючих та створення нових продуктивних штамів-продуцентів ЕПС, що дозволило підвищити ефективність процесів біосинтезу та знизити їх вартість. Так, створено рекомбінантний штам *Xanthomonas campestris*, здатний

синтезувати ксантан на середовищі з молочною сироваткою [169]. Для цього гени *lacZY* *Escherichia coli*, які кодуєть β-галактозидазу і лактозопермеазу, перенесли в плазмиду з широким кругом хазяїв так, щоб вони знаходились під транскрипційним контролем промотора одного з бактеріофагів *X. campestris*. Цю конструкцію ввели в *E. coli*, а потім перенесли з *E. coli* у *X. campestris* шляхом потрійного зхрещування. Трансформанти, які містили плазмиду, синтезували β-галактозидазу і лактозопермеазу, використовуючи лактозу як єдине джерело вуглецю та та синтезували ксантан на середовищі з глюкозою, лактозою та молочною сироваткою.

У 80-90-х роках значна увага дослідників приділялась вивченню біологічних функцій мікробних ЕПС, і генетичні дослідження були спрямовані на виявлення ролі ЕПС як фактора вірулентності, участі полісахаридів у захисті клітин мікроорганізмів від дії несприятливих факторів, у формуванні рослинно-бактеріальних симбіозів [170].

Слід відзначити, що на сьогоднішній день кількість публікацій, в яких розглядаються молекулярно-біологічні та генетичні аспекти залежності фізико-хімічних властивостей мікробних ЕПС від умов культивування продуцентів, є обмеженою. На жаль, причини, які викликають зміни складу ЕПС і механізми регуляції властивостей полісахаридів, залишаються практично недослідженими. Роботи, присвячені вивченню цих питань, почали з'являтися з середини 90-х років.

Так, літературні дані свідчать, що зміни у хімічному складі ЕПС в різних умовах культивування продуцентів можуть бути обумовлені зміненням активності або інактивацією ферментів (зокрема, глікозилтрансфераз), які беруть участь в утворенні нуклеозиддифосфатсахаридів – попередників синтезу ЕПС. Зокрема, у *Rhizobium leguminosarum* мутації в *exoB* гені (аналог *galE*), який кодує синтез УДФ-галактозоепімерази, супроводжувались відсутністю галактози у складі ЕПС [171]. У *galE* мутантів *Erwinia amylovora* змінювався склад синтезованого ліпополісахариду [172]. У той же час у молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis* мутації у *galE* гені не впливали на склад ЕПС, зокрема, на вміст галактози [173]. Було встановлено, що у даних бактерій утворення УДФ-галактози (як і УДФ-глюкози) контролюється рівнем активності іншого ферменту - УДФ-глюкозопірофосфорилази, синтез якого кодується *galU* геном.

Ідентифіковані гени *algI*, *algJ*, *algF*, відповідальні за ацетилювання альгінату у *Pseudomonas aeruginosa* [174].

У ЕПС-синтезуючих стрептококів групи В визначені гени (*cpsIaC* і *cpsIaD*), відповідальні за полімеризацію ЕПС [175]. Мутанти, дефектні за цими генами, синтезували ЕПС, склад яких був ідентичний складу ЕПС вихідного штаму, однак з більш низькою молекулярною масою (41000-45000 проти 90000-100000 у ЕПС вихідного штаму). Автори відзначають, що білки CpsC та CpsD є схожими за амінокислотним складом до біл-

ків грамнегативних бактерій (ExoP у *Rhizobium meliloti* та Wzz у ентеробактерій), які також є відповідальними за довжину синтезованого полісахаридного ланцюга. Ці білки у стрептококів піддані регуляції шляхом фосфорилування-дефосфорилування.

У різних видів бактерій роду *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) кластери генів *exo-exc* та *exp* є залученими до синтезу сукциноглюкану та галактоглюкану відповідно [157, 176-179]. Концентрація фосфатів у середовищі культивування є важливим фактором, який впливає на експресію *exp* генів [157, 177]. Встановлено, що регуляторами транскрипції кластера *exp* генів, який забезпечує синтез галактоглюкану, є білки MucR MucS [176, 178, 179].

* * *

Таким чином, аналіз наведених літературних і власних експериментальних даних показує, що утворення мікробних ЕПС (кількість синтезованих ЕПС, вихід ЕПС від субстрату, швидкість синтезу ЕПС) в значній мірі залежать від умов культивування продуцента. Склад поживного середовища (природа джерела вуглецю, азоту, фосфору, їх концентрації, співвідношення вуглець/азот, іони металів), спосіб подачі субстрату, фізико-хімічні фактори середовища (температура, рН, рівень аерації), тривалість процесу періодичного культивування, швидкість розбавлення середовища при безперервному культивуванні є основними факторами, що впливають на синтез ЕПС.

На сьогоднішній день більшість відомих мікробних ЕПС одержують на основі вуглеводних субстратів. Однак дослідження, проведені в 70-80-х роках, продемонстрували можливість розширення сировинної бази мікробіологічного виробництва ЕПС за рахунок використання нехарчових субстратів (метан, метанол, етанол, етиленгліколь, вуглеводні).

При одержанні мікробних ЕПС як джерело азотного живлення використовують мінеральні (амонійні солі, нітрати) і органічні компоненти (дріжджовий і кукурудзяний екстракти, пептон, сечовина). У деяких випадках органічний азот, а також поєднання органічного і мінерального азоту сприяє підвищеному синтезу ЕПС.

Лімітування росту продуцентів ЕПС азотним джерелом живлення в умовах надлишку вуглецю дозволяє направити біосинтетичні процеси в сторону синтезу ЕПС.

При одержанні ЕПС на основі C₁-C₂-сполук існують певні обмеження для підвищення концентрації в середовищі метану, метанолу та етанолу. У випадку метану це обмежена розчинність його у воді і підвищена вибухонебезпечність, у випадку метанолу і етанолу – пригнічення життєдіяльності клітин високими концентраціями спиртів. У зв'язку з цим, при одержанні ЕПС на основі метанолу і етанолу можлива дробна подача субстрату, при використанні метану - зменшення концентрації азоту в середовищі з метою підтримання оптимального співвідношення вуглець/азот. Крім того, при куль-

тивуванні продуцентів ЕПС на метанолі і етанолі в умовах примусової аерації, коли має місце зниження концентрації спиртів в середовищі в результаті їх виносу з відпрацьованим повітрям, дробний спосіб подачі субстрату дає можливість підтримувати концентрацію спиртів на необхідному для оптимального синтезу ЕПС рівні

Здебільшого температура і рН, оптимальні для росту продуцента, є оптимальними і для синтезу ЕПС. Однак в деяких випадках зниження або підвищення температури культивування продуцентів відносно оптимальної для їх росту приводить до збільшення концентрації синтезованих ЕПС. Підтримання рН середовища на постійному рівні впродовж процесу культивування більшості продуцентів також супроводжується підвищенням синтезу ЕПС.

Рівень аерації на початку процесу культивування продуцентів ЕПС визначається їх фізіологічними особливостями (зокрема, відношенням до кисню). Однак по мірі синтезу ЕПС і збільшення в'язкості культуральної рідини виникає потреба в підвищенні рівня аерації і посиленні масопереносу. Ці обставини необхідно враховувати при виборі конструкції апаратів для культивування продуцентів ЕПС, зокрема, типу їх перемішувачих пристроїв.

Оскільки максимальна швидкість утворення ЕПС у більшості продуцентів не співпадає у часі з досягненням максимальної питомої швидкості їх росту, безперервний процес одержання ЕПС, як правило, проводять при низьких швидкостях розбавлення середовища (0.03-0.05 год.⁻¹).

Умови культивування продуцента суттєво впливають не тільки на процес синтезу ЕПС, але також на склад і фізико-хімічні властивості полісахаридів. В різних умовах вирощування може змінюватись хімічний склад ЕПС, їх молекулярна маса, а також співвідношення декількох полісахаридів. На жаль, не у всіх роботах, присвячених вивченню цих питань, приводяться відомості про вплив таких змін на реологічні властивості розчинів синтезованих ЕПС. Склад і властивості ЕПС залежать від таких факторів, як тривалість процесу періодичного культивування, склад середовища (зокрема, природа вуглецевого субстрату), рН, температура, аерація, швидкість розбавлення середовища і лімітуючий фактор при безперервному культивуванні. У більшості випадків в різних умовах культивування основний вуглеводний ланцюг утворюваних ЕПС залишається незмінним, а найбільших змін зазнають бокові ланцюги - їх довжина, склад, ступінь розгалуження, а також природа і склад замісників, серед яких можуть бути функціональні групи, що визначають фізико-хімічні властивості розчинів ЕПС. Однак, причини, що обумовлюють такі зміни складу полісахаридів, а також механізми, які регулюють властивості синтезованих ЕПС, залишаються до нинішнього часу практично недослідженими.

Крім того, зміни складу та властивостей мікробних ЕПС в процесі культивування продуцента є також мало вивченим питанням. Так як існуючі технології виробництва мікробних ЕПС являють собою періодичні процеси, орієнтовані на максимальний вихід ЕПС, а їх склад в процесі культивування може змінюватися, то немає гарантій одержати продукт з необхідними стабільними властивостями. Потрібні також додаткові дослідження взаємозв'язку фізіологічного стану продуцента з складом і властивостями синтезованих ЕПС.

Таким чином, не дивлячись на численні дослідження впливу умов культивування на утворення та властивості ЕПС, одержання полісахаридів сталого складу з очікуваними властивостями залишається найбільш важливим і першочерговим завданням при організації промислового виробництва мікробних ЕПС.

На основі аналізу літературних і власних експериментальних даних нами розроблена стратегія одержання мікробних полісахаридів зі стабільними заданими властивостями [163]. Вона базується на реалізації чотирьох підходів до регуляції складу, фізико-хімічних властивостей і інтенсифікації синтезу ЕПС. Два з цих підходів стосуються впливу умов культивування на властивості полісахаридів, а саме:

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

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

На основі досліджень впливу умов культивування на синтез та властивості етаплану розроблена технологія одержання цього ЕПС, яка дозволяє одночасно збільшити в 4-5 разів кількість синтезованого ЕПС і регулювати його фізико-хімічні властивості в залежності від області практичного використання [144].

ЛІТЕРАТУРА

1. Sutherland I.W. Biosynthesis of microbial polysaccharides // *Adv. Microbiol. Physiol.* - 1982. - 23. - P. 79-150.
2. Slodki M.E., Cadmus M.C. Production of microbial polysaccharides // *Adv. Appl. Microbiol.* - 1978. - 23. - P. 19-54.
3. Sandford P.A. Microbial polysaccharides // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* - 1979. - 36. - P. 265-313.
4. Pace G.W., Righelato R.C. Production of extracellular microbial polysaccharides // *Adv. Biochem. Eng.* - 1980. - 15, N 12. - P. 41-70.

5. Kanamaru K., Hieda T., Iwamuro Y. Isolation and characterization of a *Hyphomicrobium* species and its polysaccharide formation from methanol // Agr. Biol. Chem. - 1982. - 46, N 10. - P. 2411-2417.
6. Kanamaru K., Iwamuro Y., Micami Y. 2-O-methyl-D-mannose in an extracellular polysaccharide from *Hyphomicrobium* sp. // Agr. Biol. Chem. - 1982. - 46, N 10. - P. 2419-2424.
7. Sutherland I.W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides // Annu. Rev. Microbiol. - 1985. - 39. - P. 243-270.
8. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез экзополисахаридов на C₁ - C₂ -соединениях. Киев: Наук.думка, 1992. – 212 с.
9. Linton J.D. The relationship between metabolite production and the growth efficiency of the producing organism // FEMS Microbiol. Rev. - 1990. - 75, N 1. - P. 1-18.
10. Prigent J.R. Les aspects industriels dans la production des polysaccharides microbiens // Petrole et techn. - 1988. - 342. - P. 35-38.
11. Lazaridou A., Biliaderis C.G., Roukas T., Izydorczyk M. Production and characterization of pullulan from beet molasses using a nonpigmented strain of *Aureobasidium pullulans* in batch culture // Appl. Biochem. Biotechnol. - 2002. – 97, N 1. – P. 1-22.
12. Pat. 4282321 USA, IC³ C 12 P 19/06. Fermentation process for production of xanthan. - Publ. 04.08.81.
13. Souw P., Demain A.Z. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459 // Appl. Environ. Microbiol. - 1979. - 37, N 6. - P. 1186-1192.
14. Linton J.D., Jones D.S., Woodard S. Factors that control the rate of exopolysaccharide production by *Agrobacterium radiobacter* NCIB 11883 // J. Gen. Microbiol. - 1987. - 133. - N 11. - P. 2979-2987.
15. Okabe E., Nakajima M., Murooka H., Nisizawa K. Investigation of carbon and phosphorus sources in cultural media of a selected strain of alginate-producing *Azotobacter vinelandii* // J. Ferment. Technol. - 1981. - 59, N 1. - P. 1-7.
16. Horan N.J., Jarman T.R., Dawes E.A. Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture // J. Gen. Microbiol. - 1983. - 129, N 10. - P. 2985-2990.
17. Clementi F., Fantozzi P., Mancini F., Moresi M. Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii* // Enzyme and Microb. Technol. - 1995. - 17, N 11. - P. 983-988.
18. Fett W.F., Wijey C. Yields of alginates produced by fluorescent pseudomonadas in batch culture // J. Ind. Microbiol. - 1995. - 14, N 5. - P. 412-415.
19. Северина Л.О., Усенко И.А., Плакунов В.К. Биосинтез экзополисахарида экстремально галофильной архебактерией *Halobacterium volcanii* // Микробиология. - 1990. - 59, N 3. - С. 437-442.
20. Martinez-Checa F., Toledo F.L., Vilchez R., Quesada E., Calvo C. Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – 58, N 3. – P. 358-363.
21. Tallgren A.H., Airaksinen U., Weissenberg R., Ojamo H., Kuusisto J., Leisola M. Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beets // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – 65, N 2. – P. 862-864.
22. Scheepe-Leberkuhne M., Wagner F. Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthesized by *Enterobacter sakazakii* // Biotechnol. Lett. - 1986. - 8, N 10. - P. 695-700.

23. Cescutti P., Pupulin R., Delben F., Abbate M., Dentini M., Sparapano L., Rizzo R., Crescenzi V. New exopolysaccharides produced by *Aureobasidium pullulans* on glucosamine // Carbohydr. Res. – 2002. – 337, N 13. – P. 1201-1207.

24. Hagiwara S., Yamada K. Studies on the utilization of petrochemical product by microorganisms. Pt. 2. Production of polysaccharide from ethandiol by *Arthrobacter simplex var. viscosus n. var.* // Agr. Biol. Chem. - 1970. - 34, N 9. - P. 1283-1295.

25. Tanaka A., Cho J., Teranishi J. Production of polysaccharides from lower alcohols and glycols by nitrogen-fixing *Pseudomonas sp.* // J. Ferment. Technol. - 1974. - 52, N 10. - P. 739-746.

26. Jamagushi M., Sato A. Образование вязких полисахаридов из этиленгликоля. Условия культивирования и идентификация продуцируемых микроорганизмами полисахаридов // Коге гйдаюцуин бисайбуцу коге гйдаюцу кэнкюсе кэнкю хококу, Rept. Ferm. Res.Inst. - 1977. - N 49. - P. 91-101. - Цит. по: РЖ Биология. - 1978. - N 5X393.

27. Jamagushi M., Sato A. Образование вязких полисахаридов из этиленгликоля. Компоненты и свойства полисахаридов // Там же. - P. 103-114. - Цит. по: РЖ Биология. - 1978. - N 5X394.

28. Jamagushi M., Sato A. Образование вязких полисахаридов из n-парафинов // Там же. - P. 115-121. - Цит. по: РЖ Биология. - 1978. - N 5X395.

29. Егоров Н.С., Работнова И.Л., Гречушкина Н.Н. Рост микобактерий на средах с n-алканами и некоторые продукты их метаболизма // Микробные метаболиты. - М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979. - С. 117-133.

30. Семенова Е.В., Мудрик Е.С., Егоров Н.С. Образование экзогликана *Mycobacterium cyaneum* в непрерывной культуре // Микробиология. - 1987. - 56, N 3. - С. 506-508.

31. Belsky I., Gutnick D.L., Rosenberg E. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: determination of emulsifier-bound fatty acids // FEBS Lett. - 1979. - 101, N 1. - P. 175-178.

32. Rosenberg E., Zuckerberg A., Rubinovitz C., Gutnick D.L. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties // Appl. Environ. Microbiol. - 1979. - 37, N 3. - P. 402-408.

33. Pat. 4234689 USA IC³ C 12 P 19/04. Production of α -emulsans / Gutnick D.L., Rosenberg E., Shabtai Y. - Publ. 18.11.80.

34. Pat. 4395353 USA IC³ B 01 F 17/30. Polyanionic heteropolysaccharide biopolymers / Gutnick D.L., Rosenberg E., Belsky I., Sava Z. - Publ. 26.07.83.

35. Shabtai Y., Wang D.I.C. Production of emulsan in a fermentation process using soybean oil (SBO) in a carbon-nitrogen coordinated feed // Biotechnol. Bioeng. - 1990. - 35, N 8. - P. 753-765.

36. Kaplan N.E., Rosenberg E., Jann B., Jann K. Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 // Eur. J. Biochem. - 1985. - 152. - P. 453-458.

37. Kaplan N.E., Zosim Z., Rosenberg E. Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein // Appl. Environ. Microbiol. - 1987. - 53, N 2. - P. 440-446.

38. Rosenberg E., Rubinovitz C., Gottlieb A., Rosenhak S., Ron E.Z. *Acinetobacter calcoaceticus* A2. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2 // Appl. Environ. Microbiol. - 1988. - 54, N 2. - P. 317-322.

39. Rosenberg E. Microbial diversity as a source of useful biopolymers // J. Ind. Microbiol. - 1993. - 11. - P. 131-137.

40. Tam K.T., Finn R.K. Polysaccharide formation by a *Methylomonas* // Amer. Chem. Soc. Symp. - 1977. - 45. - P. 58-80.
41. Pat. 8012060 Japan, IC³ C 08 B 37/10. Preparation of polysaccharide MH-2 from microorganisms / Ajinomoto Co. - Publ. 17.03.80.
42. Higgins R.H., Best D.J., Hammond R.C., Scott D. Methane-oxidizing microorganisms // Microbiol. Rev. - 1981. - 45, N 4. - P. 556-590.
43. Гринберг Т.А., Щурова З.П., Романовская В.А., Малашенко Ю.Р. Регуляция синтеза экзополисахарида у облигатного метилотрофа *Methylococcus sp.* // Микробиол. журн. - 1983. - 45, N 4. - С. 44-47.
44. Пинчук Г.Э., Щурова З.П., Шатохина Э.С. Характеристика роста метанооксиляющей бактерии *Methylococcus thermophilus* в присутствии аминокислот аспартатного семейства // Микробиология. - 1987. - 56, N 4. - С. 621-625.
45. Kenne L., Lindberg B. Bacterial polysaccharides. Polysaccharides. - New York, London: Acad. press, 1983. - Vol. 2. - P. 287-363.
46. Southgate G., Goodwin P.M. The regulation of exopolysaccharide production and of enzymes involved in C₁-assimilation in *Methylophilus methylophilus* // J. Gen. Microbiol. - 1989. - 135. - P. 2859-2867.
47. Дерябин В.В., Старухина Л.А., Усов А.И., Яроцкий С.В. Кислый экзополисахарид облигатно-метилотрофных бактерий *Methylobacillus methylophilus* ВСБ-792 // Биотехнология. - 1986. - N 5. - С. 22-27.
48. Старухина Л.А., Дерябин В.В., Яроцкий С.В. Экзогенные углеводсодержащие биополимеры облигатного метилотрофа *Methylobacillus methylophilus* ВСБ-792 (ЦМПМВ-1946) // XIII Всесоюз. конф. "Химия и биохимия углеводов" (Тбилиси, 17-19 ноября, 1987): Тез. докл. конф. - Пушкино: НЦБИ АН СССР, 1987. - С. 131-132.
49. Misaki A., Tsuburava Y., Kakuta M. D-allose-containing polysaccharide synthesized from methanol by *Pseudomonas species* // Carbohydr. Res. - 1979. - 75, N 1. - P. 8-19.
50. Пат. 929015 СССР, МКИ³ C 12 P 19/04. Способ получения полисахаридов / Такаяма Е., Нозава Ц., Масуда Е. (Япония) // Открытия. Изобрет. - 1982. - N 18. - С. 303.
51. Логинова Н.В., Троценко Ю.А. Образование экзополисахарида *Blastobacter viscosus* при росте на среде с метанолом // Прикл. биохимия и микробиология. - 1980. - 16, N 3. - С. 331-334.
52. Breuer U., Ackerman J.U., Babel W. Accumulation of poly-(3-hydroxybutyric acid) and over production of exopolysaccharides in a mutant of a methylotrophic bacterium // 4th Symp. Bact. Polyhydroxyalkanoates (Montreal, Aug. 14-18, 1994). - Can. J. Microbiol. - 1995. - 41, Suppl. n 1. - P. 55-59.
53. Davis E.N., Wallen L.L. Viscous product from activated sludge by methanol fermentation // Appl. Environ. Microbiol. - 1976. - 32, N 2. - P. 303-305.
54. Hou C.T., Laskin A.I., Pattel R.N. Growth and polysaccharide production by *Methylocystis parvus* OBBP on methanol // Appl. Environ. Microbiol. - 1978. - 37, N 5. - P. 800-804.
55. Pat. 3932218 USA, IC² C 12 D 13/04. Production of heteropolysaccharides by fermentation of methanol / Finn R.K., Tannahill A.L., Laptevitz J.E. - Publ. 13.01.76.
56. Harada T. Special bacterial polysaccharides and polysaccharidases // Biochem. Soc. Symp. - 1983. - 48. - P. 97-116.
57. Rees D.A., Morris E.R., Thom D., Madden K. Shapes and interaction of carbohydrate chains // Polysaccharides. - New York, London: Acad. press, 1982. - Vol. 1. - P. 196-281.

58. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Образование на углеводных субстратах экзополисахаридов штаммом *Acinetobacter sp.* и особенности его С₆-метаболизма // Микробиология. – 2002. Т.71, № 2.- С. 215-221.

59. Пирог Т.П., Коваленко М.А. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахарида этаполана на смеси этанола и глюкозы // Междуна. конф. «Микробиология и биотехнология XXI столетия» (Минск, 21-25 мая 2002), С. 56-57.

60. Pat. 1513104 Britain, IC³ C 12 D 13/04. Process for the production of polysaccharide / R.C.Rhigelato, Deavin L. - Publ. 07.06.78.

61. Courtois B., Courtois J., Heyraud A. Effect of biosynthesis conditions on the chemical composition of the water-soluble polysaccharides of fastgrowing *Rhizobia* // J. Gen. Appl. Microbiol. - 1986. - 32, N 6. - P. 519-526.

62. Leps W.T., Thompson B.G., Brandingen M.A. Effect of medium constituents and pH control on growth and exopolysaccharide production by *Rhizobium trifolii* // Abstr. 87th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. (Atlanta, Ga, 1987, 1-6 March). - Washington D.C., 1987. - P. 265.

63. Ткаченко А.А., Алиева С.Н. Биосинтез левана *Gluconobacter oxydans* Л-1 в питательных средах с мелассой // Вестн. ЛГУ. Сер. 3. - 1988. - N 4. - С. 75-81.

64. Brivonese A.C., Sutherland I.W. Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture // Appl. Microbiol. Biotechnol. -1989. - 30, N 1. - P. 97-102.

65. Юрлова Н.А., Кирий А.И., Кудряшова О.А. Влияние состава питательной среды на синтез экстрацеллюлярного полисахарида *Aureobasidium pullulans* // Микробиология. - 1994. - 63, N 6. - С. 1031-1037.

66. Гвоздяк Р.И., Матышевская М.С., Григорьев Е.Ф., Литвинчук О.А. Микробный полисахарид ксантан. - Киев: Наук. думка, 1989. - 212 с.

67. Grigorova D., Pavlova K., Panchev I. Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC // Appl. Biochem. Biotechnol. – 1999. – 81, N 3. – P. 181-191.

68. Giavasis I., Harvey L.M., McNeil B. Gellan gum // Crit. Rev. Biotechnol. – 2000. – 20, N 3. – P. 177-211.

69. Leroy F., Degeest b., De V.L. A novel area of predictive modelling: describing the functionality of beneficial microorganisms in foods // Int. J. Food Microbiol. – 2002. – 73, N 2-3. – P. 251-259.

70. Linton J.D., Watts P.D., Austin R.M. The energetics and kinetics of extracellular polysaccharide production from methanol by microorganisms possessing different pathways of C₁-assimilation // J. Gen. Microbiol. - 1986. - 132, N 3. - P. 779-788.

71. Sengha S.S., Anderson A.J., Hasking A.J., Dawes E.A. The production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture // J. Gen. Microbiol. - 1989. - 135, N 4. - P. 795-804.

72. Mian F.A., Jarman T.R., Righelato D.N. Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. - 1978. - 134, N 2. - P. 418-422.

73. Phillips K.R., Pik J., Lawford H.G., Lavers B., Kligerman A., Lawford G.R. Production of curdlan-type polysaccharide by *Alcaligenes faecalis* in batch and continuous culture // Can. J. Microbiol. - 1983. - 29, N 10. - P. 1331-1338.

74. Williams S.G., Greenwood J.A., Jones C.W. Physiological and biochemical changes accompanying the loss of mucoidy by *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology. - 1996. - 142, N 4. - P. 881-888.

75. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В., Криштаб Т.П. Интенсификация синтеза экзополисахарида этаполана на смеси ростовых субстратов // Микробиология. – 2002. – (В печати).

76. Pat. 3878045 USA, IC² C 12 D 13/04. Process for the production of heteropolysaccharides by fermentation of methanol / Tannahill A.L., Finn R.K. - Publ. 10.07.75.

77. Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В. Регуляция активности ацетил-КоА-синтетазы у мутантного штамма *Acinetobacter sp.*, не образующего экзополисахарида // Междун. конф. “Микробиология и биотехнология XXI столетия» (Минск, 21-25 мая 2002). - С. 58-59.

78. Shin Y.C., Rim Y.H., Lee H.C. Production of pullulan by a fed-batch fermentation // Biotechnol. Lett. - 1987. - 9, N 9. - P. 621-624.

79. Rau U., Gura E., Olszewski A., Wagner E. Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing // J. Ind. Microbiol. - 1992. - 9, N 1. - P. 19-26.

80. Кодама Т., Накахара Т., Омори Т. Бинх Н.Т., Хошино К., Минода И. Образование внеклеточных полисахаридов водородными и метаниспользующими микроорганизмами // Рост микроорганизмов на C₁-соединениях: Тез. докл. симп. (12-16 сентября 1977 г., Пушино). Пушино: ИЦБИ АН СССР. - 1977. - С.213-215.

81. Гринберг Т.А. Способность смешанных культур метилотрофных микроорганизмов синтезировать экзополисахариды // Микробиол. журн. - 1987. - 49, N 2. - С. 52-56.

82. Pat. 4006058 USA, IC² C 12 D 13/04. Biopolymer production process / J.G.Savins. - Publ. 01.02.77.

83. Krieg D.P., Bass J.A., Mattingly S.J. Stimulation of alginate synthesis by the addition of phosphorylcholine to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* grown under phosphate-limiting conditions // Abstr. 87th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. (Atlanta, Ga, 1987, 1-6 March). - Washington D.C., 1987. - P. 89.

84. Pat. 2233397 France, IC² C 12 D 13/04. Procède pour la production d'un polysaccharide d'alginate type. - Publ. 14.11.75.

85. Пат.524576 СССР, МКИ² C 12 D 13/04. Способ получения полисахарида /Фрейзер К.,Эллиот И. (США) // Открытия. Изобрет. - 1976. - N 18. - С.184.

86. Graber-Gubert M., Morin A., Monsan P. Isolation of microorganisms producing 6-deoxyhexose-containing polysaccharides // Syst. Appl. Microbiol. - 1988. - 10, N 2. - P. 200-205.

87. Manresa A., Espuny M.J., Guinea J. Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas sp.* GSP-910 // Appl. Microbiol. - 1987. - 26, N 4. - P. 347-351.

88. Appanna V.D. Stimulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti* JJ-1 by manganese // Biotechnol. Lett. - 1988. - 10, N 3. - P. 205-206.

89. Appanna V.D. Exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium trifolii* in the presence of manganese and aluminium // Microbios. Lett. - 1989. - 40, N 157. - P. 31-36.

90. Appanna V.D., Preston C.M. Manganese elicits the synthesis of a novel exopolysaccharide in an arctic *Rhizobium* // FEBS Lett. - 1987. - 215, N 1. - P. 79-82.

91. Lee P.K., Chang H.N., Kim B.H. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in continuous fermentation // Biotechnol. Lett. - 1989. - 11, N 8. - P. 573-578.

92. Nirmala C., Purushothaman D. Production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris var. oryzae* as influenced by nutritional factors // Nat. Acad. Sci. Lett. - 1991. - 14, N 2. - P. 71-74.

93. Ferrala N.F., Westervelt P., Mabbott G.A., Fekete F.A. Relationship between extracellular polysaccharide production and medium iron concentration in nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum* B-8 // Abstr. 86th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. (Washington, 23-28 March, 1986). - Washington D.C., 1986. - P. 217.

94. Annison G., Couperwhite I. Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii* // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1986. - 25, N 1. - P. 55-61.

95. Annison G., Couperwhite I. Composition of alginate synthesized during the growth cycle of *Pseudomonas aeruginosa* // Austral. J. Biol. Sci. - 1987. - 40, N 4. - P. 435-441.

96. Davidson I.W. Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture // FEMS Microbiol. Lett. - 1978. - 3. - P. 347-349.

97. Reeslev M., Jensen B. Influence of Zn^{2+} and Fe^{3+} on polysaccharide production and mycelium/yeast dimorphism of *Aureobasidium pullulans* in batch cultivations // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1995. - 42, N 6. - P. 910-915.

98. Елинов Н.П. Некоторые микробные полисахариды и их практическое применение // Успехи микробиологии. - М.: Наука, 1982. - С. 158-177.

99. Haggstrom L. Mutant of *Methylobacterium methanolicum* and its characterization with respect to biomass production from methanol // Appl. Environ. Microbiol. - 1977. - 33, N 3. - P. 567-576.

100. Williams A.G., Wimpenny W.T. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* sp. NC1B 11264 grown in continuous culture // J. Gen. Microbiol. - 1978. - 104, N 1. - P. 47-57.

101. Wang Y., McNeil B. Effect of temperature on scleroglucan synthesis and organic acid production by *Sclerotium glaucum* // Enzyme and Microbiol. Technol. - 1995. - 17, N 10. - P. 893-899.

102. Wang Y., McNeil B. Scleroglucan // Crit. Rev. Biotechnol. - 1996. - 16, N 3. - P. 185-215.

103. Pfiffner S.M., Inerney M.J., Penneman G., Knapp R.M. Isolation of halo-tolerant, thermotolerant, facultative polymer-producing bacteria and characterization of exopolymer // Appl. Environ. Microbiol. - 1986. - 51, N 6. - P. 1224-1229.

104. Marshall V.M., Cowie E.N., Moreton R.S. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC 330 // J. Dairy Res. - 1995. - 62, N 4. - P. 621-628.

105. Marques A.M., Estanol J., Alsina J.M. Production and rheological properties of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas* sp. strain EPS-5028 // Appl. Environ. Microbiol. - 1986. - 52, N 2. - P. 1221-1223.

106. Heald P.J., Kristiansen B. Synthesis of polysaccharide by yeast-like forms of *Aureobasidium pullulans* // Biotechnol. Bioeng. - 1985. - 27, N 10. - P. 1516-1519.

107. McNeil B., Kristiansen B., Seviour R.J. Polysaccharide production and morphology of *Aureobasidium pullulans* in continuous culture // Biotechnol. Bioeng. - 1989. - 33, N 9. - P. 1210-1212.

108. Mozzi F., Degiori G.S., Oliver G., Devaldez G.F. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH // Biotechnol. Lett. - 1996. - 18, N 4. - P. 435-439.

109. Dudman W.F. Cellulose production by *Acetobacter* strains submerged culture // J. Gen. Microbiol. - 1960. - 22, N 1. - P. 25-39.

110. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Малашенко Ю.Р. Влияние факторов внешней среды на образование и свойства экзополисахаридов *Acinetobacter sp.* // Прикл. биохимия и микробиология. - 1998. - 34, N 1. - С. 70-74.
111. McNeil B., Kristiansen B. Influence of impeller speed upon the pullulan fermentation // *Biotechnol. Lett.* - 1987. - 9, N 2. - P. 101-104.
112. Simon L., Caye-Vaugien C., Bouchonneau M. Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations // *J. Gen. Microbiol.* - 1993. - 139, N 5. - P. 979-985.
113. Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Резник С.Р. Влияние условий аэрации на синтез и экскрецию полисахаридов при их глубинном культивировании // *Биотехнология.* - 1993. - N 3. - С. 12-14.
114. Rogovin P., Albrecht W., Sohns V. Production industrial-grade polysaccharide B-1459 // *J. Biotechnol. Bioeng.* - 1965. - 7, N 1. - P. 161-169.
115. Lawford H., Rousseau J. Effect of oxygen on the rate of β 1,3-glucan microbial exopolysaccharide production // *Biotechnol. Lett.* - 1989. - 11, N 2. - P. 125-131.
116. Pace G.W. Microbial polysaccharides // *Adv. Biotechnol.: Proc. Int. Ferment. Symp.* - 1981. - Vol. 3. - P. 433-439.
117. Margaritis A., Pace G.W. Microbial polysaccharides // *Comprehens. Biotechnol.* - Oxford. etc. Pergamon press, 1985. - Vol.3. - P. 1005-1044.
118. Oosterhuis N.M.G., Baal H.C.I., Koerts K. New chances for microbial polysaccharides // *World Biotech. Rept. Conf. (San Francisco, Nov. 1986).* - New York, London: 1986. - Vol. 2, pt.3. - P. 105-112.
119. Pat. 2488909 France, IC³ C 12 P 19/04. Production de polysaccharides microbiens / Kim L., Gordon S. - Publ. 26.02.82.
120. Jarman T.R. Bacterial alginate synthesis // *Microbial polysaccharides and polysaccharases* / Ed.R.C.W. Berkeley et al. - London: Acad. press, 1978. - P. 35-50.
121. Jarman T.R., Deavin L., Slocombe S., Rhigelato R.C. Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii* // *J. Gen. Microbiol.* - 1978. - 107, N 1. - P. 59-64.
122. Silman R.W., Rogovin P. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: effect of dilution rate // *Biotechnol. Bioeng.* - 1972. - 14. - P. 23-31.
123. Looijesteijn P.J., van Casteren W.H., Tuinier R., Doeswijk-Voragen C.H., Hugenholtz J. Influence of different substrate limitation on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis subsp. cremoris* in continuous culture // *J. Appl. Microbiol.* - 2000. - 89, N 1. - P. 116-122.
124. Sandford P.A. Industrial utilization of polysaccharides. *Polysaccharides.* - New York, London: Acad. press. - 1983. - Vol.2. - P. 411-490.
125. Sandford P.A., Cottrell I.W., Pettitt D.J. Microbial polysaccharides: new products and their commercial application // *Pure and Appl. Chem.* - 1984. - 56, N 7. - P. 879-892.
126. Chida K., Chen G.I., Kodama T., Minoda Y. Acidic polysaccharide production from methane by new methane-oxidizing bacterium H-2 // *Agr. Biol. Chem.* - 1983. - 47, N 2. - P. 275-280.
127. Evans C.G.T., Yeo R.G., Ellwood D.C. Continuous culture studies on the production of extracellular polysaccharides by *Xanthomonas juglandis* // *Microbial polysaccharides and polysaccharases* / Ed. Berkeley R.C.W. et al. - London: Acad. press, 1978. - Vol. 3. - P. 51-68.

128. Pat. 1512536 Britain, IC³ C 12 D 13/04. Productions of polysaccharides. - Publ. 01.06.78.
129. Cadmus M.C., Rogovin S.P., Burton K.A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain // Can. J. Microbiol. - 1976. - 22. - P. 942-948.
130. Cadmus M.C., Knutson C.A., Lagoda A.A., Pittsley J.E., Burton K.A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors // Biotechnol. Bioeng. - 1978. - 20, N 7. - P. 1003-1014.
131. Philips J.C., Miller J.W., Wernan W.C. A high-pyruvate xanthan for EOR // Soc. Petrol. Eng. J. - 1985. - Aug. - P. 594-602.
132. Tait M.I., Sutherland I.W., Clarke-Sturman A.J. Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide // J. Gen. Microbiol. - 1986. - 132, N 6. - P. 1483-1492.
133. Skjar-Braek G., Smidsrod O., Larsen B. Tailoring of alginates by enzymatic modification in vitro // Int. J. Biol. Macromol. - 1986. - 8, N 6. - P. 330-336.
134. Deryabin V.V., Starukhina L.A., Glukhova E.V. Structural and rheological characterisation of exopolysaccharides from new strains of *Azotobacter vinelandii* // Abstr. 6th Eur. Symp. Carbohydr. Chem. (Edinburgh, 1-13 Sept., 1991). - Letehevorth, 1991. - P. 137.
135. Bryan B. A., Linhardt R.J., Daniels L. Variation in composition and yield of exopolysaccharides produced by *Klebsiella sp.* strain K32 and *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 // Appl. Environ. Microbiol. - 1986. - 51, N 6. - P. 1304-1308.
136. Bryan B.A., Linhardt R.J., Daniels L. Variation in composition and yield of exopolysaccharides produced by *Klebsiella*, *Acinetobacter*, and *Rhodotorula* species // Abstr. 86th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. (Washington, 23-28 March, 1986). - Washington D.C., 1986. - P. 272.
137. Huq M.N., Ralph B.J., Rickard P.A.D. The extracellular polysaccharide of a methylotrophic culture // Austral. J. Biol. Sci. - 1978. - 31, N 3. - P. 311-316.
138. Хмеленина В.Н., Гаязов Р.Р., Сузина Н.Е. Синтез полисахаридов *Methylococcus capsulatus* в различных условиях культивирования // Микробиология. - 1992. - 61, N 3. - С. 404-410.
139. Van A.N.K., McMillan B.D., Dryden P. The multi-component extracellular polysaccharide of *Clavibacter michiganense subsp. insidiosum* // Phytopathology. - 1987. - 77, N 3. - P. 496-501.
140. Bejar V., Calvo C., Moliz J., Diazmartinez F., Quesada E. Effect of growth conditions on the rheological properties and chemical composition of *Volcaniella eurihalina* exopolysaccharide // Appl. Biochem. Biotechnol. - 1996. - 59, N 1. - P. 77-86.
141. Болоховская В.А., Гвоздяк Р.И., Воцелко С.К. Физико-химические свойства препаратов полимиксана, полученных из различных штаммов *Bacillus polymyxa* // Микробиол. журн. - 1993. - 55, N 2. - С. 27-34.
142. Bouzar F., Cerning J., Desmazeaud M. Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants // J. Dairy Sci. - 1996. - 79, N 2. - P. 205-211.
143. Пирог Т.П., Краснопевцева Н.В., Гринберг Т.А., Власов С.А., Воцелко С.К., Малашенко Ю.Р. Изменение некоторых свойств экзополисахаридов *Acinetobacter sp.* в процессе периодического культивирования // Биотехнология. - 1991. - N 4. - С. 67-70.

144. Пирог Т.П. Принципи регуляції складу і фізико-хімічних властивостей екзополісахаридів, синтезованих *Acinetobacter sp.* – Дис. ... д-ра. біол. наук. - Київ, 1999. – 450 с.
145. Коваленко М.О., Коваленко О.Г., Пирог Т.П. Антифiтовiрусна активнiсть нативних та дезацильованих препаратiв мiкробного екзополiсахариду етаполану // Вiсник Киiвського Нацiонального унiверситету iм. Шевченка. Бiологiя. - 2001. - Вип. 35. - С. 32-35.
146. Ананьева Е.П., Быстрова Ж.В., Витовская Г.А. Влияние условий биосинтеза на физико-химические свойства экзополисахаридов *Bullera alba* // Прикл. биохимия и микробиология. - 1995. - 31, N 4. - С. 417-421.
147. Pat. 7915872 Japan, IC³ C 12 D 13/04. Polysaccharide und verfahren zu ihrer herstellung / Takemoto H., Igarashi I., Shnanyo Y. - Publ. 31.01.79.
148. Madi N.S., McNeil B., Harvey L.M. Influence of culture pH and aeration on ethanol production and pullulan molecular weight by *Aureobasidium pullulans* // J. Chem. Technol. Biotechnol. - 1996. - 65, N 4. - P. 343-350.
149. Kaplan D.L., Arcidiacono S., Wiley B.J. Fermentation and processing requirements for the production of high molecular weight pullulan from *Aureobasidium pullulans* and chitosan from *Mucor rouxii* // Abstr. 87th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. (Atlanta, 1-6 March, 1987). - Washington, D.C., 1987. - P. 264.
150. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Пинчук Г.Э., Буклова В.Н., Малашенко Ю.Р. Изменение состава и свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter sp.* в процессе периодического культивирования // Микробиология . - 1994. - 63, N 6. - С. 1015-1019.
151. Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Буклова В.Н., Воцелко С.К., Малашенко Ю.Р. Образование экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter sp.* на средах с различным содержанием K⁺ // Микробиология. - 1995. - 64, N 1. - С.51-54.
152. Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Воцелко С.К. Двухстадийный способ получения микробного экзополисахариды етаполана с улучшенными реологическими свойствами // Прикл. биохимия и микробиология. – 2001. - 37, № 4.- С. 429-435.
153. Gross M., Rudolph K. Studies of the extracellular polysaccharides (EPS) produced in vitro by *Pseudomonas phaseolicola*. 1. Indications for a polysaccharide resembling alginate acid in seven *P. syringae* pathovars // Phytopatol. Z. - 1987. - 118, N 3. - P. 276-287.
154. Singh S., Fett W. Stimulation of exopolysaccharide production by fluorescent pseudomonads in sucrose media due to dehydration and increased osmolarity // FEMS Microbiol. Lett. - 1995. - 130, N 2-3. - P. 301-306.
155. Navarini L., Cesaro A., Ross-Murphy S.B. Exopolysaccharides from *Rhizobium meliloti* YE-2 grown under different osmolarity conditions: viscoelastic properties // Carbohydr. Res. - 1992. - N 223. - P. 227-234.
156. Astete S.G., Leigh J.A. MucS, a gene involved in activation of galactoglucan (EPS II) synthesis gene expression in *Rhizobium meliloti* // Mol. Plant Microbe Interact. - 1996. - 9, N 5. - P. 395-400.
157. Becker A., Ruberg S., Baumgarth B., Bertram-Drogatz P.A., Quester L., Puhler A. Regulation of succinoglucan and galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – 4, N 3. – P. 187-190.
158. Cerantola S., Montrozier H. Production in vitro, on different solid culture media, of two distinct exopolysachcarides by a mycoid clinical strain of *Burkholderia cepacia* // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – 202, N 1. – P. 129-133.

159. Nicolaus B., Panico A., Manca M.C., Lama I., Gambacorta A., Maugeri T., Gugliandolo C., Caccamo D. A thermophilic *Bacillus* isolated from Eolian shallow hydrothermal vent, able to produce exopolysaccharides // Syst. Appl. Microbiol. – 2000. – 23, N 3. – P. 426-432.

160. Degeest B., De Vuyst L. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – 65, N 7. – P. 2863-2870.

161. Пирог Т.П., Сенченкова С.М., Грінберг Т.О., Малашенко Ю.Р. Структура ацильованого екзополісахариду, синтезованого бактеріями *Acinetobacter sp.* // Український біохімічний журнал 2001.- 73, № 3. - С. 71-79.

162. Пирог Т.П. Образование ацилированных экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter sp.* // Микробиология. - 1996. - 65, N 5. - С.644-648.

163. Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Грінберг Т.О. Стратегія одержання мікробних екзополісахаридів з заданими властивостями // Мікробіол. журнал. – 2002. - Т. 64, № 3. - С. 81-94.

164. Betlach M.R., Capage M.A., Doherty D.H., Hassler R.A., Henderson N.M., Vanderslice R.W., Marrelli J.D., Ward M.B. Genetically engineered polymers: manipulation of xanthan biosynthesis // Proc. Symp. Appl. and Modif. Ind. Polysaccharides. 193th Amer. Chem. Soc. Nat. Meet. (Denver, Colo, 5-10 Apr., 1987). – Amsterdam e.a., 1987. – P. 35-50.

165. Wozniak D.J., Ohman D.E. *Pseudomonas aeruginosa* AlgB, a two-component response regulator of the NtrC family, is required for *algD* transcription // J. Bacteriol. – 1991. – 173, N 4. – P. 1406-1413.

166. Martinezsalazar J.M., Moreno S., Najera R., Boucher J.C., Espin G., Soberonchavez G., Deretic V. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its evaluation of their roles in alginate biosynthesis // J. Bacteriol. – 1996. – 178, N 7. – P. 1800-1808.

167. Yamazaki m., Thorne L., Micolajczak M., Armentrout R.W., Pollock T.J. Lincage of genes essential for synthesis of a polysaccharide capsule in *Sphingomonas* strain S88 // J. Bacteriol. – 1996. – 178, N 9. – P. 2676-2687.

168. Sutherland I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides // Trends Biotechnol. – 1998. – 16. – P. 41-46.

169. Fu J.F., Tseng Y.H. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey // Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – 56. – P. 919-923.

170. Пирог Т.П. Біологічні функції мікробних екзополісахаридів // Мікробіол. журнал. – 2001. – 63, N 5. – С. 80-101.

171. Sanchez-Andujar B., Colorado C., Philip-Hollingsworth S., Dazzo F.B., Palomares A.J. Structure and role in symbiosis of *exoB* gene of *γ Rhizobium leguminosarum* by *trifolii* // Mol. Gen. Genet. – 1997. – 255. – P. 131-140.

172. Metzger M., Bellemann P., Bugert P., Geider K. Genetics of galactose metabolism of *Erwinia amylovora* and its influence on polysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen // J. Bacteriol. – 1994.- 176. – P. 450-459.

173. Boels I.C., Ramos A., Kleerebezem M., W.M. de Vos. Functional analysis of the *Lactococcus lactis galU* and *galE* genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis // Appl. Environ. Microbiol. – 2001.- 67, N 7.- P. 3033-3040.

174. Franklin M.J., Ohman D.E. Identification of *algI* and *algJ* in the *Pseudomonas aeruginosa* alginate biosynthetic gene cluster which are required for alginate O-acetylation // J. Bacteriol. – 1996. – 178, N 8. – P. 2186-2195.

175. M.J. Cieslewicz, D.L.Kasper, Y. Wang, M.R. Wessels. Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci // J. Biol. Chem. – 2001. – 276, N 1. – P. 139-146.

176. Bertram-Drogatz P.A., Quester I., Becker A., Puhler A. The *Sinorhizobium meliloti* MucR protein, which is essential for the production of high-molecular-weight succinoglucan exopolysaccharide, binds to short DNA regions upstream of *exoH* and *exoY* // Mol. Gen. Genet. – 1998. – 257, N 4. – P. 433-441.

177. Mendrygal K. E., Gonzalez J.E. Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* // J. Bacteriol. – 2000. – 182, N 3. – P. 559-606.

178. Lloret J., Martin M., Oruezabal R.I., Bonilla I., Rivilla R. MucR and mucC activate *exp* genes transcription and galactoglucan production in *Sinorhizobium meliloti* EFB1 // Mol. Plant Microbe Interact. – 2002. – 15, N 1. – P. 54-59;

179. Martin M., Lloret J., Sanchez-Contreras M., Bonilla I., Rivilla R. MucR is necessary for galactoglucan production in *Sinorhizobium meliloti* EFB1 // Mol. Plant Microbe Interact. – 2002. – 15, N 1. – P. 129-135.