

УДК 579.841:577.15

ВДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ МІКРОБНОГО ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА ЕТАНОЛІ

Т.П. Пирог, Ю.В. Корж

Інститут мікробіології і вірусології Національної академії наук України, Київ

E-mail: tapirog@usuft.kiev.ua

Ключові слова: екзополісахариди, біосинтез, метаболізм етанолу, регуляція С₂-метаболізму, фізико-хімічні властивості.

Мікробні екзополісахариди (ЕПС) викликають великий інтерес у дослідників завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям цих полімерів, що визначають їхнє використання в нафтодобувній, харчовій, хімічній промисловості, сільському господарстві, медицині.

Acinetobacter sp. В-7005 є продуцентом комплексного екзополісахариду (ЕПС), названого нами «етаполаном» [1]. На основі етаполану розроблено спосіб ізоляції притоку пластових вод, який дає змогу при застосуванні 1 т етаполану видобути додатково до 240 т нафти та знизити її обводнення з 84 до 15 %. З використанням етаполану як головної складової частини розроблено технології виготовлення косметичних кремів під загальною назвою «Екол», технічного мийного засобу «БІМС-1». Показана можливість і доцільність застосування етаполану при виробництві хліба і хлібопродуктів. Завдяки спроможності етаполану адсорбувати та виводити з організму солі важких металів він рекомендований для профілактичного харчування [1].

Етаполан складається з нейтрального (мінорний компонент) і двох кислих полісахаридів, один з яких є ацильованим. Ацильований і неацильований полісахариди ідентичні за молярним співвідношенням D-глюкози, D-манози, D-галактози, L-рамнози, D-глюкуронової і пировиноградної кислот (3:2:1:1:1:1) і структурою повторюваної ланки

вуглеводного ланцюга. Різниця між цими ЕПС полягає у тому, що ацильований полісахарид містить жирні кислоти ($C_{12}-C_{18}$) [1]. Глюкуронова і піровиноградна кислота є боковими замісниками повторюваної ланки вуглеводного ланцюга, з'єднаними з залишками рамнози і манози відповідно. Залежно від умов культивування продуцента у складі етаполану міститься 25-35 % мінеральних компонентів (одновалентних катіонів). Наявність мінеральних компонентів у складі етаполану зумовлена структуруванням цього ЕПС у процесі його біосинтезу катіонами, що містяться у середовищі культивування продуцента [1]. Реологічні властивості розчинів етаполану, що визначають його практичну значущість (здатність до емульгування, підвищення в'язкості за присутності одно- і двохвалентних катіонів, при зниженні рН, за низьких швидкостей зсуву, у системі Cu^{2+} -гліцин), залежать від співвідношення у його складі ацильованих і неацильованих компонентів, а також від співвідношення жирних кислот у ацильованому полісахариді [1]. Слід зазначити, що сукупність таких реологічних властивостей не характерна для жодного з відомих мікробних полісахаридів. Крім того, для синтезу етаполану може бути використаний широкий набір вуглецевих субстратів (у тому числі й неуглеводних), у той час як всі інші відомі полісахариди одержують тільки на основі вуглеводної сировини.

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

Відомо, що у послідовності метаболічних реакцій, пов'язаних з утворенням ключових інтермедіатів, існують лімітувальні реакції, швидкість яких нижча від інших або пов'язані з великою витратою енергії

чи втратою вуглецю субстрату. Виявлення таких сайтів метаболічного лімітування та розробка на основі знань принципів регуляції метаболізму дасть змогу реалізувати біотехнологічні процеси з найвищою ефективністю.

Мета роботи полягала у визначенні шляхів регуляції різних ланок метаболізму при вирощуванні штамів *Acinetobacter* sp. B-7005 і B-7005 (1НГ) на C₂-субстратах для вдосконалення процесу біосинтезу екзополісахариду етаполану.

Матеріали і методи

Об'єкти досліджень. О'єктом досліджень був штам *Acinetobacter* sp.– продуцент комплексного екзополісахаридного препарату етаполану [2], депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером B-7005, а також мутантний штам *Acinetobacter* sp. B-7005 (1НГ), що не утворює ЕПС, який був одержаний з вихідного за допомогою нітрозогуанідинового мутагенезу [3].

Культивування *Acinetobacter* sp. B-7005. Культивування бактерій здійснювали в колбах на качалці (220 об/хв) при 30°C, рН 6,8-7,0 упродовж 16-120 год на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л). **Середовище 1:** KH₂PO₄ - 6,8; NaOH – 0,9; NaCl - 1,05; NH₄NO₃ – 0,6; MgSO₄ × 7H₂O – 0,4; CaCl₂ × 2H₂O – 0,1; FeSO₄ × 7H₂O – 0,01. **Середовище 2:** KH₂PO₄ - 6,8; KOH - 1,8; KCl - 1,4; NH₄NO₃ – 0,6; MgSO₄ × 7H₂O – 0,4; CaCl₂ × 2H₂O – 0,1; FeSO₄ × 7H₂O – 0,01. **Середовище 3:** KH₂PO₄ – 3,4; KOH – 0,9; NH₄NO₃ – 0,3; MgSO₄ × 7H₂O – 0,4; CaCl₂ × 2H₂O – 0,1; FeSO₄ × 7H₂O – 0,01. **Середовище 4:** KH₂PO₄ – 3,4; KOH – 0,9; KCl - 4,4; NH₄NO₃ – 0,6; MgSO₄ × 7H₂O – 0,4; CaCl₂ × 2H₂O – 0,1; FeSO₄ × 7H₂O – 0,01. **Середовище 5:** KH₂PO₄ – 1,7; KOH – 0,45; NH₄NO₃ – 0,3; MgSO₄ × 7H₂O – 0,4; CaCl₂ × 2H₂O – 0,1; FeSO₄ × 7H₂O – 0,01. **Середовище 6:** KH₂PO₄ – 2,0; KOH – 0,55; KCl – 5,6; NH₄NO₃ – 0,6; MgSO₄ × 7H₂O – 0,4; CaCl₂ × 2H₂O –

0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01. Середовища різнилися між собою молярністю фосфатного буферу, загальною кількістю солей, наявністю Na^+ , концентрацією одновалентних катіонів. Так, молярність буферу становила (М): середовища 1 і 2 – 0,05; 3 і 4 – 0,025; 5 і 6 – 0,0125. У середовища додатково вносили 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізу та 0,006-0,009 % пантотенату кальцію (вітамін B_5). Штами В-7005 і В-7005 (1НГ) є ауксотрофами за цим вітаміном [2,3], який є попередником коензиму А. Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол у концентрації 1 % (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (16-24 год), вирощену на мінеральних середовищах 1÷6 з різними джерелами вуглецю. Джерелом вуглецю та енергії при одержанні посівного матеріалу і біосинтезі ЕПС були: а) 0,5 % етанолу (об'ємна частка); б) 1 % етанолу (об'ємна частка) за наявності або відсутності ацетату калію (0,1 % або 0,01 %); в) 1,6 % ацетату калію. Кількість посівного матеріалу становила 5 % від об'єму середовища.

Ензиматичні аналізи. Визначення активності ферментів здійснювали в безклітинних екстрактах. Одержання безклітинних екстрактів проводили як описано в роботі [4].

Ключові ферменти C_2 -метаболізму та гліоксилатного циклу. Активність алкогольдегідрогенази (КФ 1.1.1.1), ацетальдегіддегідрогенази (КФ 1.2.1.3 і КФ 1.2.1.4), ацетил-КоА-синтетази (КФ 6.2.1.1) ізоцитратліази (КФ 4.1.3.1) та малатсинтази (КФ 4.1.3.2) визначали як описано в роботі [4].

Ферменти циклу трикарбонових кислот. Активність цитратсинтази (КФ 4.1.3.7) аналізували за зниженням концентрації ацетилфосфату за присутності коензиму А та оксалоацетату як описано в роботі [5]. Активність аконітатгідратази (КФ 4.2.1.3) [6] встановлювали за присутності цис-аконітату за відновленням НАДФ⁺ при 340 нм. Активність ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.41) [7], малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.37)

[8] визначали за відновленням НАД⁺, а ізоцитратдегідрогенази (КФ 1.1.1.42) [5], малатдегідрогенази (КФ 1.1.1.82) [9] – за відновленням НАДФ⁺ при 340 нм за присутності ізоцитрату чи малату, відповідно. Активність 2-оксоглутаратдегідрогенази (КФ 1.2.4.2) [10] встановлювали за відновленням НАД⁺ при 340 нм за присутності 2-оксоглутарату та коензиму А. Активність сукцинатдегідрогенази (КФ 1.3.99.1) [6] визначали за відновленням дихлорфеноліндофенолу за присутності феназинметасульфату при 600 нм. Активність фумарази (КФ 4.2.1.2) аналізували за утворенням фумарату з малату при 250 нм [5].

Активність ключових ферментів глюконеогенезу та деяких біосинтетичних шляхів. Активність фосфоенолпіруватсинтетази (КФ 2.7.9.2) [11] аналізували колориметрично за зниженням концентрації пірувату в реакційній суміші (реакція з динітрофенілгіdraзином) при 445 нм [11]. Активність фосфоенолпіруваткарбоксікінази (КФ 4.1.1.49) [12], оксалоацетатдекарбоксілази (КФ 4.1.1.3) [6] встановлювали за утворенням фосфоенолпірувату (ФЕП) та пірувату при окисненні НАДН, а глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.4) [13] – за утворенням глутамату при окисненні НАДФН при 340 нм. Активність глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2) [14] встановлювали за відновленням НАД⁺ при 340 нм за присутності 2-оксоглутарату.

Активність ферментів в безклітинних екстрактах визначали при температурі 28-30 °С, що є оптимальною для росту даних бактерій, та виражали у нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка. Вміст білка в безклітинних екстрактах визначали за Bradford [15].

Визначення швидкості окиснення субстратів (етанолу, ацетальдегіду й ацетату) інтактними клітинами *Acinetobacter* sp. В-7005 та В-7005 (1НГ) проводили як описано у роботі [4].

Встановлення складу і фізико-хімічних властивостей етаполану.
Комплексний полісахаридний препарат етаполан виділяли з культуральної рідини осадженням ізопропанолом після попереднього відокремлення

клітин продуцента і діалізу [1]. Розділення етаполану на ацильований і неацильований компоненти здійснювали за допомогою розробленого раніше методу [16]. Для дезацилювання здійснювали обробку ЕПС NaOH у присутності NaBH_4 . Вміст вуглеводів в ЕПС визначали колориметричним методом за реакцією з фенолом і сірчаною кислотою [17], пірвіноградної кислоти - за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [18], уронових кислот – за реакцією з карбазолом [19], жирних кислот - ваговим методом після дезацилювання розчинів ЕПС [16]. Для визначення вмісту мінеральних компонентів у складі етаполану здійснювали його обробку катіонітом КУ-2-8 (H^+). Вміст нейтральних моносахаридів визначали за допомогою вуглеводного аналізатора “Biotronik LC-2000” [1]. Молекулярно-масовий склад ЕПС визначали за допомогою методу аналітичного градієнтного центрифугування в розчині хлористого натрію [20]. Як стандарти молекулярних мас використовували декстрини фірми “Fluka” із молекулярною масою 13,5; 20; 40; 70; 110; 500 тис. і 2 млн. Вміст вуглеводів в отриманих після центрифугування фракціях (об’єм 1 мл) встановлювали за реакцією з фенолом і сірчаною кислотою.

Вміст компонентів певної молекулярної маси встановлювали, визначаючи кількість вуглеводів у відповідних фракціях, і виражали в процентах до вихідної (загальної) кількості вуглеводів. Знаючи процентний вміст у складі ЕПС компонентів різної молекулярної маси, розраховували середню молекулярну масу.

Властивості розчинів етаполану оцінювали за відносною зміною їх в’язкості в присутності 0,1 М KCl, за рН 4-4,5 (за умови переведення ЕПС в H^+ -форму), у системі Cu^{2+} -гліцин. Відносну зміну в’язкості визначали за формулою:

$$\text{Відносна зміна в'язкості} = \frac{\eta_1 - \eta_0}{\eta_0} \cdot 100\% ,$$

де: η_1 - в'язкість розчину ЕПС у досліджуваних умовах; η_0 - в'язкість розчину ЕПС у дистильованій воді.

Результати та обговорення

Вивчення особливостей C_2 -метаболізму під час росту штамів *Acinetobacter* sp. В-7005 та В-7005 (1НГ) на етанолі показало, що окиснення етанолу до ацетальдегіду каталізується НАД⁺-залежною алкогольдегідрогеназою. Акцепторами електронів в ацетальдегіддегідрогеназній реакції є НАД⁺ і НАДФ⁺. Показано, що у *Acinetobacter* sp. ацетат залучається до метаболізму за участю ацетил-КоА-синтетази; анаплеротичною послідовністю реакцій, що поповнюють пул C_4 -дикарбонових кислот, є гліюксилатний цикл [21].

Подальші дослідження були спрямовані на визначення активності ферментів циклу трикарбонових кислот (ЦТК) та деяких біосинтетичних шляхів [22]. У безклітинному екстракті *Acinetobacter* sp. В-7005 і В-7005 (1НГ) виявлена висока активність всіх ферментів цього циклу (табл. 1). На нашу думку, наявність обох ключових ферментів гліюксилатного циклу, а також висока активність ізоцитратдегідрогенази, глутаматдегідрогенази і низька активність 2-оксоглутаратдегідрогенази є підтвердженням того, що реакції ЦТК у *Acinetobacter* sp. В-7005 і В-7005 (1НГ) при рості на етанолі спрямовані на задоволення біосинтетичних потреб.

У процесі асиміляції мікроорганізмами двох- або трьохвуглецевих субстратів або субстратів, катаболізм яких проходить через ацетил-КоА чи інтермедіати ЦТК, виникає необхідність синтезу молекул вуглеводів. Ці перетворення здійснюються шляхом глюконеогенезу. Ензиматичні дослідження показали, що під час росту на етанолі у *Acinetobacter* sp. В-7005 і В-7005 (1НГ), утворення пірувату здійснюється з оксалоацетату в оксалоацетатдекарбоксилазній реакції, а в утворенні фосфоенолпірувату беруть участь обидва ключові ферменти глюконеогенезу – ФЕП-карбоксикіназа і ФЕП-синтетаза (табл. 1).

Аналіз активності ключових ферментів метаболізму етанолу під час культивування *Acinetobacter* sp. B-7005 на середовищах 1 і 2 показав, що активність ацетил-КоА-синтетази в безклітинному екстракті була в 2,7-5 разів нижчою, ніж активність алкоголь- і ацетальдегіддегідрогеназ (табл. 2). У процесі дослідження швидкості окиснення С₂-субстратів інтактними клітинами *Acinetobacter* sp. B-7005 (1НГ), вирощеними на середовищах 1 та 2, було встановлено, що після голодування клітин упродовж 20 год швидкість дихання за присутності етанолу й ацетальдегіду не змінювалася і становила 152,6-157,8 та 153,5-159,4 нмоль О₂·хв⁻¹·мг⁻¹ клітин відповідно, а за присутності ацетату знижувалася в 2 і 4 рази на середовищі 2 і середовищі 1 відповідно порівняно зі швидкістю окиснення ацетату клітинами, що не голодували.

Отже, під час росту на етанолі в клітинах *Acinetobacter* sp. B-7005 і B-7005 (1НГ) ацетат утворюється з вищою швидкістю, ніж залучається до метаболізму. Тому наші наступні дослідження були спрямовані на пошук факторів, що забезпечують однакову швидкість утворення і подальшого метаболізму ацетату в клітинах бактерій у процесі культивування на етанолі.

У результаті ензиматичних і полярографічних досліджень встановлено, що інгібіторами ацетил-КоА-синтетази є іони натрію, а також продукти окиснення етанолу й ацетальдегіду – НАДН і НАДФН; активаторами ферменту є катіони калію і магнію [23].

На основі отриманих результатів ми припустили, що одним із можливих шляхів регуляції метаболізму ацетату в клітинах штамів B-7005 і B-7005 (1НГ) під час росту на етанолі може бути вилучення Na⁺ з середовища культивування і підвищення в ньому концентрації K⁺ і Mg²⁺. Для усунення інгібувальної дії інтермедіатів окиснення етанолу й ацетальдегіду на активність ацетил-КоА-синтетази було знижено початкову концентрацію етанолу в середовищі з подальшою його дробною подачею в процесі культивування бактерій. Показано, що при зниженні у

два рази концентрації етанолу (до 0,5 %) спостерігали підвищення швидкості дихання клітин за присутності ацетату, причому її величина практично не відрізнялася від швидкості окиснення етанолу й ацетальдегіду. Крім того, швидкість окиснення ацетату істотно не змінювалася у процесі тривалого голодування клітин. Слід зазначити, що за початкової концентрації етанолу 0,5 % у середовищі вміст пантотенату кальцію можна було знизити до 0,0006 %, при цьому не було необхідності у підвищенні концентрації Mg^{2+} .

У табл. 3 наведено активність ключових ферментів метаболізму етанолу у штаму *Acinetobacter* sp. B-7005, вирощеного за різних умов культивування. Встановлено, що при зниженні початкової концентрації етанолу у середовищі, відсутності сполук натрію і наявності 100 мМ K^+ активність ацетил-КоА-синтетази підвищувалася більш, ніж у два рази. За таких умов стала можливою реалізація процесу біосинтезу етаполану на незабуферених середовищах 4 і 6 (0,025-0,125 М). Отримання аналогічного результату за початкової концентрації етанолу 1,0 % забезпечувалось підвищенням вмісту вітаміну B_5 в середовищі до 0,0009 %, концентрації Mg^{2+} до 5 мМ і катіонів калію до 100 мМ.

Таким чином, у результаті досліджень регуляції активності ацетил-КоА-синтетази нам вдалося істотно знизити молярність буферу із збереженням вмісту солей у середовищі культивування, що тільки частково усувало лімітування C_2 -метаболізму у продуцента етаполану.

Відомо, що ацетил-КоА-синтетаза є індукцибельним ферментом, індуктором якого є ацетат [24]. У зв'язку з цим ми припустили, що можна повністю зняти лімітування C_2 -метаболізму шляхом внесення екзогенного ацетату у середовище з етанолом або при використанні посівного матеріалу, вирощеного на ацетаті чи етанолі за присутності ацетату. Встановлено, що додавання екзогенного ацетату при одержанні інокуляту і біосинтезі ЕПС дало змогу збільшити у 2,5-3 рази активність ацетил-КоА-синтетази та швидкість дихання за присутності ацетату і реалізувати

процес синтезу етаполану на незабуферених середовищах 3 і 5, в яких загальний вміст солей був знижений у 2 і 4 рази (до 5,1 - 2,95 г/л) [25].

Відомо, що умови культивування продуцента впливають не тільки на синтез ЕПС, а й на фізико-хімічні властивості кінцевого продукту [26]. У різних умовах культивування може змінюватися хімічний склад ЕПС, їхня молекулярна маса, співвідношення декількох полісахаридів, що впливає на реологічні властивості ЕПС, які визначають практичну значущість цих полімерів. Раніше було показано, що необхідною умовою для синтезу ацильованого полісахариду є наявність у середовищі культивування продуцента етаполану 100 мМ K^+ [1]. Встановлено, що тільки етаполан з високим вмістом ацильованого компоненту (>50%) характеризувався сукупністю реологічних властивостей, необхідних для практичного використання. Оскільки вміст K^+ у середовищах 3 і 5 становить 40 та 20 мМ відповідно, на наступному етапі досліджували реологічні властивості синтезованого за таких умов етаполану. Згідно з попередніми дослідженнями, такої концентрації K^+ недостатньо для синтезу ацильованого ЕПС з необхідними реологічними властивостями.

Результати, наведені в табл. 4, показали, що ЕПС, синтезовані на середовищах з різним вмістом K^+ , характеризувалися практично однаковими реологічними характеристиками. Отже, культивування продуцента на незабуференому середовищі з низьким вмістом солей (і катіонів калію) не впливало на властивості синтезованого етаполану. Щоб з'ясувати причини, що зумовлюють це явище, ми детальніше дослідили хімічний склад одержаних полісахаридів.

Встановлено, що незалежно від умов культивування продуцента (вміст мінеральних компонентів, співвідношення C/N та молярність буферу в середовищі культивування), нативні ЕПС характеризувалися практично однаковим вмістом вуглеводів (44,5-46,7 %) і пірвіноградної кислоти (3,2-3,7 %) (табл. 5). Співвідношення глюкози, манози, галактози та рамнози у складі всіх ЕПС було однаковим і становило 3:2:1:1.

Проте полісахариди різнилися за кількістю уронових (7,5-13,8 %), жирних (5,9-8,8 %) кислот, мінеральних компонентів (6,2-28,6 %), а також за вмістом ацильованого компоненту (70-100 %). Ми припускаємо, що зниження вмісту мінеральних компонентів у складі етаполану, синтезованого на середовищах 3 і 5, зумовлене зменшенням кількості одновалентних катіонів (зокрема, катіонів калію) у цих середовищах. Так, раніше нами було показано, що у процесі культивування продуцента етаполану відбувається структурування синтезованих ЕПС катіонами, що містяться у поживному середовищі [1].

Після дезацилювання нативних ЕПС вміст уронових кислот збільшувався у 2-3 рази та становив 20-22 % для всіх досліджуваних полісахаридів (табл. 5). У попередніх працях було встановлено, що реальний вміст уронових кислот у складі нативних ЕПС вдається виявити тільки після їх дезацилювання [1]. Підвищення вмісту уронових кислот у цьому разі можна пояснити тим, що під час дезацилювання відбувається дисоціація високомолекулярних конгломератів ЕПС, змінюється конформація полісахаридних молекул і просторова структура ЕПС, внаслідок чого уронові кислоти стають доступнішими для взаємодії з різними реагентами. Цікаво зазначити, що після дезацилювання у складі етаполану суттєво знижувався вміст мінеральних компонентів. На теперішній час причини, що зумовлюють це явище, залишаються невідомими. З'ясуванню цих причин будуть присвячені наші подальші дослідження.

Дослідження молекулярної маси етаполану, синтезованого за різних умов культивування, показало, що середня молекулярна маса полісахаридів, одержаних на середовищах 3 та 5, практично не змінювалася в процесі виділення й очистки і становила 1,5 млн (табл. 6). Це можна пояснити тим, що отримані полісахариди є високоацильованими, а в результаті ацилювання вуглеводного ланцюга формується міцна структура ЕПС, яка залишається без змін у процесі

обробки розчинів етаполану органічними розчинниками. Слід зазначити, що аналіз молекулярно-масового складу етаполану, синтезованого в різних умовах культивування, показав наявність компонентів з молекулярною масою від 13,5 тис. до 2 млн., причому основну масу препарату складали фракції з молекулярною масою понад 2 млн. Попередні дослідження показали, що тільки високомолекулярному етаполану, у складі якого виявлено не більше 35 % фракцій з молекулярною масою до 2 млн., притаманні необхідні для практичного використання реологічні властивості [1].

Дослідження реологічних властивостей ЕПС показало, що розчини етаполану, синтезованого на середовищі 5 з 20 мМ K^+ , на всіх етапах його виділення й очистки характеризувалися вищою в'язкістю в присутності 0,1 М КСІ і в системі Cu^{2+} -гліцин (1200 та 1500-2000 % відповідно) порівняно з ЕПС, синтезованими на середовищі зі 100 мМ K^+ (1000 та 800-1000 % відповідно).

Таким чином, на основі дослідження особливостей метаболізму у штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 визначено шляхи регуляції C_2 -метаболізму, що дало змогу вдосконалити технологію біосинтезу етаполану на етанолі. Ключовими елементами цієї технології є: відсутність у середовищі культивування катіонів натрію, підвищення у ньому концентрації пантотенату кальцію до 0,0009 %, а також наявність 0,1 % ацетату калію при одержанні інокуляту і біосинтезі полісахариду. Це дало змогу здійснити без зниження показників синтезу процес одержання етаполану на незабуференому середовищі, в якому вміст солей знижено у 4 рази (з 11 до 2,95 г/л). За умов усунення лімітування C_2 -метаболізму, молекулярна маса етаполану становила 1,5 млн і не знижувалася у процесі його виділення й очистки, а вміст жирних кислот в ацильованому полісахариді досягав 15 %. Підвищений вміст жирних кислот у складі етаполану і висока молекулярна маса зумовлюють покращення

реологічних властивостей, що визначають практичну цінність цього полісахариду.

Список літератури

1. *Пирог Т.П.* Принципы регуляции состава и физико-химических свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp.: Дисс..... докт. биол. наук. 03.00.20. – К., 1999. – 450 с.
2. *Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э.* Микробный синтез экзополисахаридов на C₁-C₂-соединениях. – К.: Наукова думка, 1992. – 212 с.
3. *Пирог Т.П., Столяр С.М., Малашенко Ю.Р.* Получение и исследование мутантных штаммов *Acinetobacter* sp., не образующих экзополисахариды // Микробиология. – 2000. – Т.60, № 5. – С. 674-680.
4. *Пирог Т.П., Кузьмінська Ю.В., Коваленко М.О.* Метаболізм C₂-C₆-субстратів в умовах міксотрофного росту штамів *Acinetobacter* sp. В-7005 та в-7005 (ІНГ) // Укр. біохім. журн. – 2004. – Т.76, № 1. – С. 33-38.
5. *O'Brien R.W., Stern J.R.* Requirement for sodium in the anaerobic growth of *Aerobacter aerogenes* on citrate // J. Bacteriol. 1969. – V.98, № 2. – P. 388-393.
6. *O'Brien R.W., Geisler J.* Citrate metabolism in *Aerobacter cloacae* // J. Bacteriol. – 1974. – V.119, № 3. – P. 661-665.
7. *Kornberg A.* Isocitric dehydrogenase of yeast (DPN) // In: Methods in enzymology (Ed. Colowick S.P. and Kaplan N.O.). New York: Acad. Press, 1955. – V. 1. – P. 707-709.
8. *Kitto G.B.* Intra- and extramitochondrial malate dehydrogenase from chicken and tuna heart // In: Methods in enzymology (Ed. Lowenstein J.M.). New York and London: Acad. Press, 1969. – V. 13. – P. 106-116.
9. *Johnson H.S., Hatch M.D.* Properties and regulation of leaf nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-malate dehydrogenase

and “malic” enzyme in plants with the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis // *Biochem. J.* 1970. – V.119, № 2. – P. 273-280.

10. *Mukherjee B. B., Matthews J., Horney D. L., Reed L.J.* Resolution and reconstitution of the *Escherichia coli* α -ketoglutarate dehydrogenase complex // *J. Biol. Chem.* – 1965. – V.240, № 5. – P. 2268-2269.
11. *Cooper R.A., Cornberg H.L.* Phosphoenolpyruvate synthetase // In: *Methods in enzymology* (Ed. Lowenstein J.M.). New York: Acad. Press, 1969. – V. 13. – P. 309-314.
12. *Huei-Che Chang, Lane M.D.* The enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate. II. Purification and properties of liver mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase // *J. Biol. Chem.* – 1966. – V.241, № 10. – P. 2413-2420.
13. *Martinez-Bilbao M., Martinez A., Urkijo I., Llama M.J., Serra J.L.* Induction, isolation and some properties of the NADPH-dependent glutamate dehydrogenase from the nonheterocystous cyanobacterium *Phormidium laminosum* // *J. Bacteriol.* 1988. – V.170, № 10. – P. 4897-4902.
14. *Nakamura I., Ohmura Y., Kamihara T.* Effect of thiamin-induced vitamin B₆ deficiency on NAD- and NADP-linked glutamate dehydrogenases in Yeast // *J. Gen. Microbiol.* – 1983. V. 129, №4. – P. 945-952.
15. *Bredford M.* A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – 72, № 3. – P. 248-254.
16. *Пирог Т.П., Гринберг Т.А., Пинчук Г.Э., Сенченкова С.Н., Малашенко Ю.Р.* Разделение экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp., на ацилированный и неацилированный компоненты // *Микробиология.* – 1994. – Т.63, № 5. – С.840-846.

17. *Dubois M., Gilles K., Hamilton J. et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem.* – 1956. – V.28, № 3. – P. 350-356.
18. *Sloneker J.N., Orentas D.G.* Pyruvic acid – a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide // *Nature.* – 1962. – V.194, № 4827. – P. 478-479.
19. *Dische Z.* A new specific color reaction of hexuronic acids // *J. Biol. Chem.* – 1947. – V.167, № 1. – P. 189-198.
20. *Votselko S.K., Pirog T.P., Malashenko Y.R., Grinberg T.A.* A method for determining the mass-molecular composition of microbial exopolysaccharides // *Microbiol. Methods.* 1993. V. 18. – P. 349-356.
21. *Пирог Т.П., Соколов И.Г., Кузьминская Ю.В., Малащенко Ю.Р.* Некоторые особенности метаболизма этанола у мутантного штамма *Acinetobacter* sp., не образующего экзополисахариды // *Микробиология.* – 2002. – Т.71, № 2. – С 222-229.
22. *Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В.* Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter* sp, растущего на этаноле // *Микробиология.* – 2003. – 72, № 4. – С. 459-465.
23. *Пирог Т.П., Кузьминская Ю.В.* Регуляция метаболизма ацетата у штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 2003. – 39, № 2. – С. 180-188.
24. *Kumari S., Beatty C.M., Browning D.F., Busby S.J.W., Simel E.J., Hovel-Miner G., Wolfe A.J.* Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli* // *J.Bacteriol.* – 2000. – V.182, № 15. – P. 4173-4179.
25. *Пирог Т.П., Корж Ю.В.* Влияние ацетата на синтез экзополисахарида этаполана при культивировании *Acinetobacter* sp. В-7005 на среде с этанолом // *Мікробіол.журн.* – 2006. – 68, № 5. – С. 12-19.

26. *Пирог Т.П., Кузьмінська Ю.В.* Вплив умов культивування мікроорганізмів-продуцентів екзополісахаридів на їхній синтез та фізико-хімічні властивості // Біополімери і клітина. – 2003. - 19, № 5. - С. 393-413.

Активність ферментів циклу трикарбонних кислот та деяких біосинтетичних шляхів у *Acinetobacter* sp. В-7005 та В-7005 (1НГ)

Фермент	Активність, нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка	
	В-7005	В-7005 (1НГ)
Цитратсинтаза	421,3±25,1	405,6±21,6
Аконітаза	340,8±18,0	349,0±19,4
НАД ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа	0	0
НАДФ ⁺ -залежна ізоцитратдегідрогеназа	729,7±38,5	717,8±33,8
2-Оксоглутаратдегідрогеназа	96,2±4,8	93,4±5,3
Сукцинатдегідрогеназа	183,4±13,9	197,5±15,8
Фумараза	192,1±9,6	186,8±9,9
НАД ⁺ -залежна малатдегідрогеназа	654,2±32,7	643,1±32,1
НАДФ ⁺ -залежна малатдегідрогеназа	81,9±5,1	79,8±4,3
НАД ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа	653,9±33,5	642,6±31,8
НАДФ ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа	247,3±15,6	257,2±16,3
Оксалоацетатдекарбоксилаза	457,3±28,6	446,6±23,3
Фосфоенолпіруваткарбоксикіназа	58,5±2,9	48,7±3,5
Фосфоенолпіруватсинтетаза	584,4±32,9	487,0±35,4

**Активність ключових ферментів метаболізму етанолу в процесі
культивування *Acinetobacter* sp. B-7005**

Ферменти	Активність (нмоль · хв ⁻¹ · мг ⁻¹ білка) при культивуванні бактерій упродовж (год):	
	24	48
НАД ⁺ -залежна алкогольдегідрогеназа	365,7±19,6	289,5±17,5
НАД ⁺ -залежна ацетальдегіддегідрогеназа	119,5±7,6	93,7±6,5
НАДФ ⁺ -залежна ацетальдегіддегідрогеназа	253,7±15,7	197,3±11,3
Ацетил-КоА-синтетаза	135,7±8,7 (74,5±5,2)	134,1±8,7
Ізоцитратліаза	130,0±7,8 (50,5±2,9)	144,9±9,4 (7,4±0,4)
Малатсинтаза	58,2±3,7	67,4±3,7

Примітки: 1. Культивування бактерій здійснювали на середовищі 1 з 0,0006 % B₅.

2. При визначенні активності ацетил-КоА-синтетази, ізоцитратліази і малатсинтази бактерії вирощували на середовищі 2 з 0,0009 % B₅. У дужках наведено дані культивування штаму на середовищі 1 з 0,0006 % B₅.

**Вплив умов культивування *Acinetobacter* sp. B-7005
на активність ключових ферментів метаболізму етанолу**

Умови культивування			Активність, нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка			
концентрація B ₅ , %	концентрація Mg ²⁺ , мМ	початкова концентрація етанолу, %	НАД ⁺ -залежна алкогольдегідро- геназа	НАД ⁺ +НАДФ ⁺ - залежна альдегід- дегідрогеназа	ацетил-КоА- синтетаза	ізоцитратліаза
0,0006	1,6	1,0	354,8±17,7	367,3±21,2	95,0±5,6	98,4±6,3
0,0009	1,6	1,0	349,9±22,9	356,7±24,4	130,9±7,6	130,0±7,9
0,0009	5,0	1,0	359,6±17,9	349,7±24,0	180,9±9,6	185,4±11,8
0,0009	1,6	0,5	265,9±16,1	277,9±15,4	219,8±11,0	225,4±13,8
0,0006	1,6	0,5	279,4±13,9	285,7±19,0	225,3±15,2	230,7±15,5

Примітка: Культивування бактерій здійснювали на середовищі 2 (в середовищі відсутні сполуки Na⁺, вміст K⁺ - 100 мМ).

Реологічні властивості 0,03 %-них розчинів етаполану, синтезованого за різних умов культивування

Середовище	Концентрація K ⁺ у середовищі, мМ	Відносне збільшення в'язкості, %	
		за присутності 0,1 М КСІ	у системі Cu ²⁺ -гліцин
2	100	325,7±21,0	1400,3±78,0
3	40	480,3±35,2	1865,0±93,2
5	20	315,6±18,8	1700,5±100,5

Примітка: Концентрація етанолу 1 %, у середовища 3 і 5 додатково вносили 0,1 %ацетату калію при одержанні інокуляту і біосинтезі ЕПС.

Таблиця 5

Хімічний склад нативного і дезацильованого етаполану, синтезованого на середовищах різного складу

Компонентний склад ЕПС	ЕПС	Вміст складових компонентів (%) в ЕПС, синтезованих на середовищах			
		1	2	3	5
Вуглеводи	нативний	44,5±2,2	45,0±2,2	46,7±2,3	45,9±2,2
	після дезацилювання	60,0±2,7	59,1±2,8	58,6±2,9	55,7±2,6
Піровиноградна кислота	нативний	3,3±0,1	3,7±0,1	3,4±0,1	3,2±0,1
	після дезацилювання	4,8±0,2	4,4±0,2	4,7±0,2	4,8±0,2
Уронові кислоти	нативний	7,5±0,3	7,7±0,3	11,4±0,5	13,8±0,6
	після дезацилювання	20,0±1,0	22,0±1,0	20,6±1,0	–
Жирні кислоти	нативний	6,5±0,3	6,8±0,3	8,8±0,4	5,9±0,3
	після дезацилювання	0	0	0	0
Мінеральні компоненти	нативний	24,3±1,2	28,6±1,4	7,2±0,3	6,2±0,3
	після дезацилювання	3,5±0,1	3,9±0,1	–	–

Примітки: 1. Концентрація етанолу 1 %, у середовище 5 додатково вносили 0,1% ацетату калію при одержанні інокуляту і біосинтезі ЕПС.

2., – ” - не визначали.

3. Дезацильований ЕПС одержано в результаті лужної обробки нативного препарату.

Молекулярна маса етаполану, синтезованого за різних умов культивування

Середовище	Випарений концентрат ЕПС		ЕПС після осадження і висушування	
	середня молекулярна маса, млн	фракції з молекулярною масою до 2 млн, %	середня молекулярна маса, млн	фракції з молекулярною масою до 2 млн, %
1	1,44	31,7±2,19	0,48	82,7±4,89
2	1,44	29,9±1,92	0,50	71,2±3,56
3	1,61	23,7±1,59	1,54	25,7±1,80
5	1,57	25,4±1,27	1,48	27,8±1,39

Примітка: Концентрація етанолу 1 %, у середовище 5 додатково вносили 0,1% ацетату калію при одержанні інокуляту і біосинтезі ЕПС.