



# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра біотехнології і мікробіології  
Освітній ступінь магістр  
Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
(код і назва)  
Освітньо-професійна програма «Фармацевтична біотехнологія»  
(назва)

**ЗАТВЕРДЖУЮ**  
Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Пирог Т.П.  
“ 28 ” жовтня 2020 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Ярош Марини Борисівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Особливості синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші олієвмісних та C<sub>2</sub>-субстратів

керівник роботи Пирог Тетяна Павлівна, к.б.н., професор,  
( прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “27”жовтня2020 року № 874-кв

2. Строк подання здобувачем роботи \_\_\_\_\_

3. Вихідні дані до роботи *Acinetobacter* sp. IMB B-7005

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ; Розділ 1. та Розділ 2. – Літературний огляд; Розділ 3. Матеріали та методи досліджень; Розділ 4. Інтенсифікація синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші C<sub>2</sub> субстратів та соняшникової олії; Висновки; Список використаної літератури; Додатки.

5. Перелік графічного матеріалу

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв



## РЕФЕРАТ

Дипломна робота присвячена інтенсифікації синтезу мікробного екзополісахариду (ЕПС) етаполану за умов росту *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на суміші С<sub>2</sub> субстратів (ацетат, етанол) та рафінованої і відпрацьованої соняшникової олії.

Встановлено, що заміна останньої порції ацетату натрію у процесі дробного його внесення на еквімолярну за вуглецем кількість оцтової кислоти супроводжувалася підтриманням рН на рівні 7,0-7,5 і підвищенням концентрації синтезованого полісахариду у 1,25 рази (до 17,5 г/л). Подальша заміна рафінованої олії на змішану відпрацьовану у суміші з ацетатом для біосинтезу етаполану супроводжувалася підвищенням ЕПС-синтезувальної здатності у 1,13 рази.

На основі теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу екзополісахариду (ЕПС) етаполану та біомаси *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на суміші енергетично надлишкових субстратів (етанол та соняшникова олія) і відповідних експериментальних досліджень встановлено, що молярне співвідношення концентрацій субстратів у суміші, за якого досягається максимальний синтез ЕПС, становить 1:0,056.

Показано, що підвищення концентрації  $Mg^{2+}$  у середовищі культивування з наступним дробним внесенням субстратів у суміші п'ятьма порціями до кінцевої концентрації 4,0 % етанолу та 1,2 % відпрацьованої олії супроводжувалось супроводжувалася підвищенням концентрації синтезованого етаполану та ЕПС-синтезувальної здатності (15,9 г ЕПС, 3,11 г ЕПС/ г біомаси).

Робота складається з вступу, 4 розділів та списку використаної літератури (102 найменування). Загальний обсяг роботи – 83 сторінки, містить 14 таблиць та 2 малюнки.

**Ключові слова:** *екзополісахариди, біосинтез, етаполан, Acinetobacter* sp. IMB B-7005, *розрахунок співвідношення субстратів, суміш ацетату та соняшникової олії.*

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП.....</b>	<b>5</b>
<b>ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....</b>	<b>8</b>
<b>РОЗДІЛ 1. БІОСИНТЕЗ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ НА ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДАХ .....</b>	<b>8</b>
1.1. Відходи виробництва біодизелю.....	8
1.2. Відходи агро-промислового комплексу .....	10
<b>РОЗДІЛ 2. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ МІКРОБНИХ ПОЛІСАХАРИДІВ.....</b>	<b>19</b>
2.1. Противірусна активність. ....	19
2.2. Імуномодуюча дія. ....	22
2.3. Інгібітори формування біоплівки. ....	24
2.4. Протипухлинна активність. ....	27
<b>РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ .....</b>	<b>33</b>
3.1. Культивування продуцента етаполану .....	33
3.2. Показники росту та синтезу етаполану .....	34
3.3. Визначення оптимального молярного співвідношення концентрацій субстратів .....	35
3.4. Статистична обробка даних .....	36
<b>РОЗДІЛ 4. ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ МІКРОБНОГО ПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ С<sub>2</sub> СУБСТРАТІВ ТА СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ.....</b>	<b>37</b>
4.1. Вплив дробного внесення субстратів на синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші ацетату натрію та олії.....	37
4.2. Енергетичні та біохімічні аспекти біосинтезу етаполану на суміші енергетично надлишкових субстратів .....	43
4.2.1. Розрахунок молярного співвідношення етанолу та рафінованої соняшnikової олії за умов росту <i>Acinetobacter</i> sp. IMB B-7005 на їх суміші.....	43
4.3. Особливості синтезу етаполану на суміші етанолу та рафінованої соняшnikової олії .....	53
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>67</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....</b>	<b>68</b>
<b>ДОДАТКИ (перелік публікацій та нагород) .....</b>	<b>81</b>

## ВСТУП

Мікробні екзополісахариди (ЕПС) – це високомолекулярні полімери вуглеводної природи, які завдяки своїм фізико-хімічним властивостям набули широкого використання в різних галузях промисловості [1, 2].

Від відомих продуцентів ЕПС вигідно відрізняється штам *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005, здатний синтезувати полісахарид етаполан на широкому наборі різноманітних С<sub>2</sub>–С<sub>6</sub>-субстратів (вуглеводи, етанол, ацетат, органічні кислоти), а також на рафінованій та відпрацьованій соняшниковій олії [3, 4, 5].

Зазначимо, що окрім можливості використання різноманітних дешевих субстратів для одержання мікробних ЕПС, їх конкурентоспроможність значною мірою залежить від рівня накопичення цільового продукту, який повинен бути максимально можливим.

Одним зі шляхів вирішення даної проблеми є використання суміші ростових субстратів. Основною перевагою такого підходу є більш раціональне споживання джерел вуглецю та енергії, яке супроводжується підвищенням ефективності їх трансформації у біомасу та вторинні метаболіти [5].

У попередніх дослідженнях успішно продемонстровано можливість інтенсифікації синтезу етаполану на суміші енергетично нерівноцінних (етанол і глюкоза, фумарат і глюкоза) та енергетично дефіцитних (ацетат і глюкоза) ростових субстратах [5]. Подальші дослідження дали змогу замінити глюкозу у змішаних С<sub>2</sub>–С<sub>6</sub>-субстратах на мелясу – побічний продукт цукрового виробництва [3].

Проте за таких умов культивування спостерігалось зниження ЕПС-синтезувальної здатності у 2 рази порівняно з такою на моносубстраті олії.

					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.	Ярош М.Б.				ВСТУП	Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.	Пирог Т.П.						5	3
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.	Пирог Т.П.							
					Кафедра БТМ			

Одним із шляхів вирішення даної проблеми може бути використання у суміші з олією іншого енергетично дефіцитного субстрату, який не містить у своєму складі азоту, зокрема, ацетату. Основним недоліком даної технології був незначний вихід цільового продукту внаслідок підвищення рН культуральної рідини зумовленого споживанням ацетату, який транспортується до клітин продуцента симпортом з протоном [4].

Вирішити дану проблему можливо за рахунок дробного внесення субстратів та регуляції рН у процесі культивування. Зазначимо, що у попередніх дослідженнях такий прийом було з успіхом використано для стабілізації рН та інтенсифікації синтезу етаполану на суміші ацетату та меляси [5, 6].

Основним критерієм ефективності використання змішаних субстратів є забезпечення максимально повної конверсії вуглецю обох моносубстратів в ЕПС. Одним із шляхів до інтенсифікації синтезу етаполану є використання суміші енергетично нерівноцінних субстратів. Це в свою чергу потребує попереднього здійснення відповідних теоретичних розрахунків енергетичних потреб на синтез етаполану та біомаси для визначення оптимального молярного співвідношення субстратів концентрацій моносубстратів у суміші. Варто зазначити, що згідно класичної концепції допоміжного субстрату використання суміші двох енергетично надлишкових субстратів не передбачається [7, 8]. У той же час є відомості про можливість використання обох субстратів суміші як для енергетичних потреб, так і синтезу біомаси [7].

Зважаючи на це, ми припустили можливість використання суміші двох енергетично надлишкових субстратів для інтенсифікації синтезу ЕПС. Як субстрати для проведення досліджень було обрано етанол та соняшникову олію, за умов росту штаму ІМВ В-7005 на яких спостерігали високі показники синтезу етаполану [3, 4, 5].

У зв'язку з викладеним вище метою даної дипломної роботи є:

1. Дослідження синтезу етаполану на суміші ацетату і олії за дробного внесення субстратів і регуляції рН упродовж процесу культивування продуцента.
2. Визначення оптимального молярного співвідношення концентрацій енергетично надлишкових субстратів (етанолу та соняшникової олії) у суміші для максимального синтезу етаполану.
3. Дослідження можливості синтезу етаполану штамом ІМВ В-7005 на суміші етанолу та соняшникової олії.



## ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

### РОЗДІЛ 1. БІОСИНТЕЗ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ НА ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДАХ

Починаючи з відкриття ксантану у 70-х роках мікробні екзополісахариди є об'єктом практичних та теоретичних досліджень. На сьогоднішній день проведено значну кількість експериментальних робіт з метою пошуку шляхів вдосконалення вже існуючих технологій. Проте, суттєвим недоліком отримання мікробних екзополісахаридів є те, що для їх синтезу використовують дорогу вуглецеву сировину. На жаль в літературі обмеженою залишається інформація про альтернативну заміну дорогої сировини на промислові відходи виробництв, які є дешевими та доступними у великій кількості.

#### 1.1. Відходи виробництва біодизелю

У роботах [3 - 7] автори встановлювали можливість синтезу ЕПС використовуючи як субстрат відходи виробництва біодизелю.

Станом на 2019 рік світовий обсяг виробництва біодизелю склав 91,17 млн т [9]. Однак суттєвим недоліком технології отримання біодизелю є значне накопичення 10 % гліцерину (гліцеринова фаза) від загальної кількості палива. Токсичні домішки (метанол, жирні кислоти, ефіри) у гліцериновій фазі унеможливають використання гліцерину в багатьох сферах його застосування [10].

У роботі [11] автори встановили, що під час росту продуцента ксантану *Xanthomonas campestris* ССТСС М2015714 на відходах біодизельного виробництва (40 г/л), найбільша кількість синтезованих ЕПС становить близько 11,0 г/л у порівнянні з очищеним гліцерином (32 г/л).

Інші автори [12] показали можливість використання технічного гліцерину як субстрату для синтезу 33,9 г/л ксантану штамом *X. campestris*

					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ			
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 1. БІОСИНТЕЗ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ НА ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДАХ	Літ.	Арк.	Акрушів
Розроб.		Ярош М.Б.					8	11
Перевір.		Пирог Т.П.						
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						
						Кафедра БТМ		

WXLB-006. Показана ефективність використання саме дробного внесення гліцерину в середовище, оскільки високі концентрації даного субстрату пригнічують життєдіяльність продуцента. Так, початкова концентрація гліцерину становила 40 г/л, після чого внесення гліцерину здійснювалось починаючи з 24 год культивування: з 24 по 34 год - 3 г/г/год; з 34 по 44 год – 2 г/л/год; з 44-54 – по 1 г/л/год, до кінцевої концентрації 100 г/л. Такий підхід дозволив інтенсифікувати синтез ксантану та отримати найвищу концентрацією (33,9 г/л) ЕПС за використання даного відходу.

У роботі [13] повідомляється про можливість отримання 24,9 г/л нового полісахариду PGHX штамом *Agrobacterium sp.* NX1126 на середовищі з технічним гліцерином у концентрації 50 г/л. Варто зазначити, що дана кількість ЕПС досягалась за зниження рН до 5,6 та за умови зниження концентрації азоту в процесі культивування. Оскільки штам продукував полісахарид з низькою гелеутворюючою властивістю, то в наступних дослідженнях вчені встановлювали [14] оптимальні умови культивування, які б забезпечували потрібні реологічні показники. Так, підвищення тиску всередині ферментера на 0,01 МПа вище ніж атмосферний та підтримання концентрації джерела вуглецю в межах 10 г/л концентрація полісахариду становила 22 г/л.

Raghuandan зі співавт. [15] визначали залежність синтезу гелану штамми *Sphingomonas pseudosanguinis* K8 та *Sphingomonas yabuuchiae* K10 за різних концентрацій технічного гліцерину в середовищі (70 - 90 г/л) та рН (6,0-8,0). Показано, що культивування *S. pseudosanguinis* за концентрації гліцерину 70 г/л та рН 7,0 дозволило отримати 51,6 г/л ЕПС, однак подальше підвищення кількості джерела вуглецю супроводжувалось зниженням концентрації гелану до 48,5 г/л, що зумовлено інгібуванням штаму K8 домішками у технічному гліцерині. Проте, культивування штаму *S. yabuuchiae* K10 на середовищі з гліцерином 80 г/л при рН 7,0 дозволило отримати 52,6 г/л ЕПС.

Таким чином, отримані дані засвідчують, що використання штамів *S.*

*pseudosanguinis* K8 та *S. yabuuchiae* K10 дозволить не тільки утилізувати технічний гліцерин у великих кількостях, але й отримання практично цінний продукт з низькою собівартістю.

## 1.2. Відходи агро-промислового комплексу

**Гідролізат цукрової тростини.** Nilares зі співавт. [16] встановили, що використання гідролізату цукрової тростини штамом *Aureobasidium pullulans* LB 83 дозволило отримати 22,13 г/л пулулану на 168 год культивування. Концентрація, яка б забезпечувала синтез такої кількості полісахариду становить 36,23 г/л глюкози та 19,90 г/л ксилоси з гідролізату.

Подальші дослідження [17] показали, що культивування штаму *A. pullulans* LB 83 на середовищі з гідролізатом цукрової тростини (концентрація глюкози та ксилоси становить 37,3 г/л та 22,5 г/л відповідно) супроводжувалось підвищенням кількості пулулану до 25,19 г/л на 96 год культивування.

**Жом маніюки.** У роботі [18] автори зазначили, що за твердофазного культивування штаму *A. pullulans* МТСС 2670 на середовищі з 5 % (за манозою) жому маніюки вихід пулулану від субстрату становив 49 мг/г. Перед використанням жом маніюки (розмір частинок 4,76 мм) зневоднювали, та висушували при температурі 80°C упродовж 24 год.

**Панцирі креветок.** Станом на 2018 рік світове виробництво креветок в аквакультурних господарствах становить 35 тис т. Так, в результаті промислової переробки креветок в середньому 45 % складають відходи отримані після очищення ракоподібних від панцера [19]. Оскільки утилізації піддаються ті відходи, які є токсичними або накопичуються у великій кількості, то переробка панцирів креветок дозволить значно очистити навколишнє середовище від даного відходу. На сьогоднішній день панцирі ракоподібних використовують як сировину для отримання каротиноїда астаксантину, або переробляють на креветочну муку, насичену вітаміном D [20].

За останні 5 років з'явилися поодинокі повідомлення [20] про можливість синтезу полісахариду ксантану штамми *X. campestris* 1182, *X. campestris* 254, *X. campestris* 629 за різних концентрацій 2 – 10 % (об'ємна частка) екстракту панцирів креветок. Встановлено, що найвищі показники (кількість синтезованого полісахариду 4,6 г/л) досягались штамом 1182 за використання 10 % (об'ємна частка) екстракту панцирів.

**Побутові відходи** - фракція твердих відходів з високим вмістом органіки та вологи [21]. Оскільки галузь громадського харчування невпинно росте, то й відповідно збільшується кількість вторинної сировини, яка становить серйозну проблему. Наприклад, прогнозується, що до 2025 року обсяг відходів в азіатських країнах буде становити 416 млн т. Варто зазначити, що неконтрольована деградація сміття на звалищах супроводжується забрудненням ґрунтів та підземних вод, а також утворенням парникового ефекту [21].

На сьогоднішній день вченими з Китаю [21] встановлено можливість синтезу мікробного полісахариду велану бактеріями *Sphingomonas* sp. ATCC 31555 на середовищі з побутовими відходами. Найвища концентрація велану 5,6 г/л утворювалась за внесення в середовище культивування 15 г/л подрібнених побутових відходів.

У цьому дослідженні вченими використовувалась вторинна сировина студентської їдальні університету Сичуань після відокремлення паперу, скла, пластику та перикарпи насінневих рослин. Побутові відходи, які використовувались в експерименті містили 3,3 % білку, 3,5% ліпідів, 1,5 % золи, 0,56 % клітковини, загальна кількість твердих речовин становила 30,5 %, вологовміст – 69,5 %.

У праці [22] повідомляється про можливість використання кухонних побутових відходів зібраних з гуртожитку штату Пенджаб, Чандігарх, Індія для синтезу пулулану бактеріями *A. pullulans* MTCC2013. Попередньо суміш відходів гідролізували (350 г) ферментативною сумішшю (CMCase, FPase,  $\beta$ -глюкозидаза, ксиланаза, маннаназа, пектиназа,  $\alpha$ -амілаза та глюкоамілаза)

упродовж 5 днів поки значення вільних цукрів та глюкози не були постійними (46 г/л та 31 г/л). У процесі культивування продуцента на даному субстраті максимальна кількість синтезованого полісахариду становила 24,77 г/л на 5-ту добу культивування.

Інші дослідники [23] встановили можливість отримання 11,73 г/л ксантану штамом *X. campestris* LRELP-1 на середовищі з гідролізатом побутових відходів, отриманих з їдальні університету провінції Сичуань, Китай. Гідроліз 500 г подрібненого субстрату здійснювали 1,5 % сульфатною кислотою за температури 121°C упродовж 60 хв. Відфільтрований гідролізат розбавляли дистильованою водою у співвідношенні 1:2 та вносили у середовище в кількості 1 л.

**Рисові висівки.** Sirajunnisa зі співавт [24] встановили, що використання 5 % (масова частка) рисових висівок дозволило отримати максимальну концентрацію полісахариду (2,14 г/л), синтезованого *Bacillus subtilis* (штам не визначено). На думку авторів низька кількість ЕПС зумовлена високою концентрацією целюлози у висівках, яку погано асимілює продуцент.

**Гідролізат рисових висівок.** У роботі [25] встановлено, здатність штаму *A. pullulans* ССТСС М 2012259 синтезувати 15,6 г/л пулулану за використання 15 % (масова частка) гідролізованих рисових висівок. Гідроліз відходу проводили 1 % (об'ємна частка) сульфатною кислотою. Показано, що в результаті гідролізу лігноцелюлози виділяється оцтова кислота, яка є інгібітором синтезу пулулану. Як альтернативу дорогавартісним методам очистки вчені отримали модифікований штам *A. pullulans* ARH-1, який асимілював неочищений гідролізат рисових висівок та дозволив отримати 22,2 г/л пулулану.

**Екстракт фініків.** Станом на 2019 рік у Саудівській Аравії налічується понад 23 мільйонів фінікових пальм, які виробляють близько 1 млн т фініків на рік. Загалом за рік 10 % плодів опадає у процесі дозрівання. Зазвичай

відходи фінікової пальми спалюються на фермах або утилізуються на звалищах, які викликають забруднення навколишнього середовища [26].

Авторами показано, що штам *A. pullulans* 51 синтезує 15 г/л пулулану за використання як джерела вуглецю 12 % (об'ємна частка) екстракту фініків. Показано, що підвищення концентрації екстракту (15 % об'ємна частка) супроводжувалось зниженням синтезу полісахариду, що може бути обумовлено пригніченням ферментативної активності продуцента високими концентраціями джерела вуглецю.

**Відходи виробництва переробки томатів.** У процесі переробки томатів утворюється велика кількість відходів та вторинних продуктів (томати, які не відповідають якісним вимогам, насіння та шкірки), які потребують подальшої екологічно безпечної утилізації. Станом на 2018 рік в Україні перероблюється 850 тис. томатів частина яких (10 – 40 %) становлять відходи [27]. Найбільша кількість томатів перероблюється на томатну пасту, однак в результаті порушень технологічного процесу частина даного продукту не відповідає технічним вимогам та якісним показникам. Знешкоджують відбраковану продукцію шляхом спалювання або утилізації на смітниках, що супроводжується забрудненням навколишнього середовища рідкими та газоподібними викидами. Оскільки томатна паста, яка не відповідає вимогам містить велику кількість крохмалю, то перспективним способом переробки давного відходу є використання у біотехнологічних процесах.

Antunes зі спіавт. [28] встановили здатність *Enterobacter* A47 (DSM 23139) синтезувати 8,77 г/л ЕПС при безперервній подачі томатної паста. Початкова концентрація джерела вуглецю становила 123 г/л пасти, після 9 год культивування подача субстрату становила 11 г/л/год до кінцевої концентрації 250 г/л. Варто зазначити, що зміна режиму подачі томатної пасти (6 г/л/год або 4 г/л/год) супроводжувалась зниженням кількості ЕПС до 4 – 4,5 г/л.

**Подрібнені шкірки манго.** В останні роки [29] з'являються поодинокі повідомлення про виникнення алергічного дерматиту у людей після взаємодії з плодами манго. Встановлено, що підвищення чутливості організму виникає після повторного контакту з компонентом шкірки манго урушиолом, який є токсином рослинного походження. Варто зазначити, що урушиол також міститься в отруйному плющі (*Toxicodendron radicans*) та західному отруйному дубі (*T. Diversilobum*). Одним із способів утилізації даного відходу є його використання як субстрату для синтезу мікробних полісахаридів.

У праці [30] встановлено можливість використання подрібнених шкірок манго (7,5 г) з розміром частинок менше 0,42 мм як субстрату для синтезу ЕПС штамом *B. licheniformis* MS3. У процесі культивування максимальна кількість синтезованого полісахариду становила 15,6 г/л. Автори зазначають, що синтезованим ЕПС притаманна здатність до адсорбції води (103,5 %) та вуглеводневих сполук (86,3 %).

**Подрібнене куряче пір'я.** На сьогоднішній день пір'я є одним з основних відходів птахопереробних заводів, велика кількість якого не утилізується відповідно до вимог, що спричиняє забруднення навколишнього середовища. Цікавим є те, що пір'я на 90 % складається з протеїну, завдяки чому з успіхом може використовуватись у біотехнологічному виробництві як ростовий субстрат для культивування [31].

Ozdał зі співавт. [31] встановили можливість отримання 24,45 г/л ксантану штамом *X. campestris* MO-03 на суміші 40 г/л глюкози та 6 г/л подрібненого курячого пір'я у складі якого міститься 54 г білку, 41,5 г золи та 9 г азоту на 100 г субстрату.

**Екстракт апельсинової шкірки.** Щорічно у світі утворюється 8-20 млн. т відходів під час виробництва апельсинового соку найбільшу частину яких становить шкірка. На сьогоднішній день утилізація даного відходу є дороговартісною та екологічно небезпечною. Альтернативним варіантом

переробки апельсинових шкірок є їх використання як ростового субстрату для синтезу мікробних полісахаридів, зокрема ксантану [32].

Mohsin зі співавт [32] показали, що використання гідролізату апельсинової шкірки бактеріями *X. campestris* (штам не визначено) супроводжувалось синтезом 30,19 г/л ксантану. Попередньо до 500 г субстрату додавали 1 л води та 0,5 – 2,5 %  $H_2SO_4$ . Детоксикацію розчину проводили активованим вугіллям з подальшою фільтрацією для видалення твердих залишків.

**Картопляне лушпиння.** Станом на 2019 р. середня урожайність картоплі в Україні склала 15,46 т/га [33]. Більшість урожаю використовується на харчових підприємствах та піддається механічному очищенню від шкірки, яка потребує подальшої переробки. Зазначимо, що картопляне лушпиння є цінним біотехнологічним ростовим субстратом, так як містить крохмаль (25 %), несахаридний полісахарид (30 %), білок (18 %), кислоторозчинний та нерозчинний лігнін (20 %), ліпіди (1 %) та золу (6 %) [34].

da Silva зі співавт. [35] показали здатність синтезувати 20,9 г/л ксантану штамом *X. campestris* pv. *manihotis* ISBF 1182 за використання як джерела вуглецю 10 г/л картопляного лушпиння, попередньо нарізаного, очищеного та зневодненого.

**Стічні води після виробництва вина.** Виноробство традиційно вважається екологічно чистим процесом, однак на всіх етапах виробництва утворюється велика кількість стічних вод ( до 14 л на л виробленого вина), які характеризуються кислотним рН, високим вмістом органічних речовин, макро- та мікроелементів, важких металів та миючих засобів. Очищення даних стічних вод є багатоетапним та економічно недоцільним процесом. У літературі є кілька повідомлень [36, 37] про синтез ксантану за використання стічних вод винної промисловості.

Rončević зі співавт [36] встановили можливість синтезу ксантану *X. campestris* ATCC 13951 використовуючи чотири фракції стічних вод отриманих з різних етапів виробництва білого вина (подрібнення,



пресування, очищення сусла, бродіння) на виноробному підприємстві розташованому у виноградниках Фрушської гори, Воєводини, Сербія. Найвищі показники синтезу ксантану (10,67 г/л) досягалися при культивуванні бактерій на стічних водах після очищення сусла зі вмістом цукру 25 г/л. За даних умов конверсія цукру у ксантан становила 68,7 %.

У подальших дослідження [37] автори повідомляють про синтез ксантану штамом *X. campestris* ATCC 13951 залежно від технології переробки винограду. У разі використання стічних вод після виготовлення рожевого вина (концентрації цукру 50 г/л) кількість синтезованого полісахариду становила 30,64 г/л, тоді як після отримання білого вина - 20,92 г/л. Зниження концентрації ксантану зумовлено високим вмістом азоту у відходах білого вина, що супроводжувалось зменшенням співвідношення C/N.

Таким чином, використання агропромислових відходів для синтезу полісахаридів є перспективним напрямком утилізації токсичних відходів та тих що накопичуються у великій кількості, однак потрібно зважати на ймовірність у деяких продуцентів низької ферментативної активності щодо целюлозо- та лігніновмісних агровідходів.

## Синтез полісахаридів на альтернативних джерелах вуглецю

Продуцент	Субстрат	Концентрація субстрату, г/л	Концентрація ЕПС, г/л	Література
1	2	3	4	5
<i>Xanthomonas campestris</i> CCTCC M2015714	Гліцерин – як відхід біодизельного виробництва	40	11	[11]
<i>Xanthomonas campestris</i> WXLB-006	Гліцерин	100	33,9	[12]
<i>Agrobacterium</i> HX1126	Гліцерин	50	24,9	[13]
<i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> K8	Гліцерин	70	51,6	[15]
<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> K10	Гліцерин	80	52,6	[15]
<i>Aureobasidium pullulans</i> LB 83	Гідролізат цукрової тростини	8 % (за глюкозою)	22,13	[16]
<i>Aureobasidium pullulans</i> LB 83	Гідролізат цукрової тростини	59,8 (за вуглеводами)	25,19	[17]
<i>Aureobasidium pullulans</i> MTCC 2670	Жом маніюки	5 % (за манозою)	49 мг/г субстрату	[18]
<i>Xanthomonas campestris</i> 1182	Екстракт панцирів креветок	10 % (об'ємна частка)	4,6	[20]
<i>Sphingomonas</i> sp. ATCC 31555	Побутові відходи	15	5,6	[21]
<i>Aureobasidium pullulans</i> MTCC2013	Гідролізат побутових відходів	77 (за вуглеводами)	24,77	[22]

<i>Xanthomonas campestris</i> <i>LRELP-1</i>	500 г побутових відходів + 1 л води		11,73	[23]
<i>Bacillus subtilis</i> (штам не визначено)	Рисові висівки	5 % (масова частка)	2,14	[24]
<i>Aureobasidium pullulans</i> ССТСС М 2012259	Гідролізат рисових висівок	15 % (за ксилозою)	15,6	[25]
<i>Aureobasidium pullulans</i> 51	Екстракт фініків	12 % (за вуглеводами)	15	[26]
<i>Enterobacter</i> A47	Томатна паста	123	8,77	[28]
<i>Bacillus licheniformis</i> MS3	Подрібнені шкірки манго	7,5	15,6	[30]
<i>Xanthomonas campestris</i> МО-03	Подрібнене куряче пір'я	6 г/л + 40 г/л глюкози	24,45	[31]
<i>Xanthomonas campestris</i> (штам не визначено)	Екстракт апельсинової шкірки (500 г відходу + 1 л води)		30,19	[32]
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> ISBF 1182	Картопляне лушпиння	10	20,9	[35]
<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951	Стічні води виробництва білого вина	25 (за вуглеводами)	10,67	[36]
<i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951	Стічні води виробництва рожевого вина	50 (за вуглеводами)	30,64	[37]

## РОЗДІЛ 2. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ МІКРОБНИХ ПОЛІСАХАРИДІВ

Мікробні екзополісахариди (ЕПС) вивчаються близько 50 років. Такі фізико-хімічні властивості ЕПС як суспендування, флокулювання, емульгування та гелеутворення, здатність до зміни реологічних характеристик водних систем широко використовують у різних галузях промисловості – у нафто- та гірничодобувній, харчовій, парфумерній, хімічній і текстильній промисловості, а також у сільському господарстві [38].

Вказані властивості дозволили використовувати ЕПС в медицині та фармацевтичній галузі. Так, перші клінічні випробування були проведені з використанням розчину декстрану, який використовують і до нині як гемодинамічний засіб для відновлення об'єму циркулюючої крові. Пізніше мікробні ЕПС почали використовувати як допоміжні речовини у виробництві лікарських засобів. Наприклад, пулулан – у покритті таблеток, ксантан – для стабілізації різних суспензій, гелан – як дезінтегруюча речовина в таблетках [39].

В останні роки стали з'являтися публікації, присвячені дослідженню біологічних активностей мікробних ЕПС, які дозволяють їх розглядати як потенційні сполуки з лікувальними властивостями.

### 2.1. Протівірусна активність.

Багато вірусних інфекцій призводять до летальних наслідків. Тому надзвичайно актуальним є розробка та пошук ефективних протівірусних сполук. З моменту реєстрації та дозволу на використання першого протівірусного препарату – ідоксуридину у червні 1963 року, розпочалась ера розробки засобів для лікування вірусних інфекцій. Однак, досі не існує ефективних протівірусних препаратів для більш, ніж 200 поширених інфекційних захворювань [40].

					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ					
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 2. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ МІКРОБНИХ ПОЛІСАХАРИДІВ					
Розроб.		Ярош М.Б.						Літ.	Арк.	Акрушів
Перевір.		Пирог Т.П.							19	14
Реценз.								Кафедра БТМ		
Н. Контр.										
Затверд.		Пирог Т.П.								

Низька ефективність вже відомих традиційних методів терапії вірусних інфекцій вказує на необхідність пошуку нових препаратів, які б не тільки активували імунну систему, але й вибірково б діяли на різні етапи внутрішньоклітинної реплікації вірусів. Тому у багатьох країнах проводяться дослідження протівірусних властивостей різних сполук, серед яких важлива роль відводиться саме мікробним полісахаридам [42-47].

Gugliandolo зі співав. з гідротермічних кратерів зниклих вулканів (Еолійський архіпелаг, Тірренське море, Італія) виділили термофільні бактерії *B. licheniformis* B3-15, *Geobacillus thermodenitrificans* B3-72, *B. licheniformis* T14 і встановили їх здатність до синтезу ЕПС з протівірусними та імуномодулюючими властивостями. Автори показали, що при додаванні розчинів полісахаридів (300 мкг/мл) до інфікованих вірусом простого герпесу II типу (HSV-2) мононуклеарних клітин периферичної крові людини спостерігається синтез таких цитокінів, як інтерферони (IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ ), фактор некрозу пухлин (TNF- $\alpha$ ) та інтерлейкінів (IL-12, IL-18), що в подальшому призводить до зупинки реплікації вірусу. Варто зазначити, що найвищий рівень цитокінів та найкраща протівірусна активність спостерігались за використанням полісахариду синтезованого штамом B3-15, що може бути зумовлено манопіранозидною конфігурацією цукрів даного ЕПС [41].

З донних осадів Середземного моря Північного узбережжя Єгипту Awady з колегами виділили бактерії *Streptomyces hirsutus* NRC2018, які синтезували ЕПС з антитівірною активністю проти гепатиту А, Коксакі В-4 та вірусу простого герпесу I типу (HSV-1). Встановлено, що за концентрації ЕПС 125 мкг/мл протівірусна активність *in vitro* до зазначених інфекційних агентів становила 20,3 %, 45,4 % та 84,9 % відповідно. Дослідники припускають, що антитівірусна дія даного полісахариду обумовлена наявністю у його складі глюкуронових та галактурованих груп, які запобігають адсорбції та взаємодії вірусу з глікопротеїнами клітини через імітацію

гепарансульфатних протеогліканів (HSPG) – сигнальних ко-рецепторів клітин [42].

В останні роки, при вивченні взаємозв'язку між мікробіотою людини та хворобами, велику увагу приділяють дослідженню здатності пробіотичних культур бактерій стимулювати імунну систему не лише здорових людей, а й тих, які мають велику кількість різних захворювань. Хоча переваги вакцин та противірусних препаратів для профілактики та лікування інфекційних захворювань очевидні, їх ефективність знижується через високу швидкість мутації вірусів, а також наявність великої кількості їх видів та підтипів. Тому досить перспективним є дослідження можливості використання полісахаридів пробіотичних мікроорганізмів для лікування вірусних захворювань [43].

Нещодавно опубліковано роботу [44], в якій встановлено противірусну активність ЕПС молочнокислих бактерій родів *Leuconostoc*, *Lactobacillus* і *Pediococcus* (штами не вказані) на моделі HSV-1 *in vitro* з використанням перещеплюваної культури клітин ВНК-21 (фібробласти нирок сирійського хом'яка). Полісахариди *Lactobacillus* sp. у концентрації 750 мкг/мл проявляли вірулідидну активність і на 98 % знижували здатність вірусу герпесу до адсорбції на поверхні клітин. При цьому даний показник був на 7 та 12 % нижчим при використанні тієї ж концентрації ЕПС *Leuconostoc* sp. та *Pediococcus* sp. відповідно. Також саме полісахариди лактобактерій виявились ефективнішими при їх внесенні до клітин ВНК-21 на різних етапах репродукції HSV-1.

В подальшому вивчали вплив ЕПС синтезованих бактеріями роду *Lactobacillus* sp. (штам не вказаний) на аденовірус людини п'ятого типу (HAdV-5) *in vitro* з використанням перещеплюваної культури клітин MDBK (епітеліальні клітини нирки великої рогатої худоби). Було встановлено здатність досліджуваного полісахариду повністю блокувати розвиток аденовірусної інфекції при його внесенні до моношару інфікованих клітин у концентрації 20 і 100 мкг/мл. Автори зазначають, що такий ефект

безпосередньо залежить від моменту внесення розчину ЕПС, оскільки в інфікованій клітині блокується перехід від фази мітотичного циклу S до G2, що і слугує сигналом для синтезу вірусної ДНК та вірусних білків [45].

Виявлено противірусну дію екзополісахаридів *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 на моделі ротавірусної інфекції *in vitro* та *in vivo*. ЕПС штаму LRCC5310 показали високу ступінь адгезії до перещеплюваних клітин MA104, що перешкоджало адсорбції на них ротавірусу (HRV). У досліджах *in vivo* з використанням лабораторних мишей, інфікованих HRV, спостерігали зменшення площі враження кишечника та зменшення тривалості гострої діареї, що викликається ротавірусом [46].

## 2.2. Імуномодулююча дія.

Метаболіти молочнокислих бактерій позитивно впливають на клітинну та гуморальну ланку імунітету людини. При цьому встановлено, що метаболіти різних штамів бактерій виявляють різні властивості та мають різні механізми дії. Останнім часом активно досліджують мікробні ЕПС, як потенційні імуномодулюючі природні сполуки [47-52].

Є повідомлення про синтез полісахаридів клітинами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* та *Streptococcus thermophiles* (штами не вказані) з імуномодулюючою активністю. Дослідження, проведені *in vivo* з використанням лабораторних мишей, показали здатність ЕПС підвищувати фагоцитарну активність і здатність до фагоцитозу макрофагів перитоніального ексудату. Автори зазначають, що механізм впливу бактеріальних полісахаридів на клітинну ланку імунітету недостатньо вивчений. Вони припускають що ЕПС розпізнаються специфічними рецепторами, що приймають участь у зв'язуванні антигенів з макрофагами. Саме це і запускає каскад реакцій, які викликають проліферацію імунних клітин, їх диференціювання та міграцію, а також фагоцитоз [47].

Показано імуномодулюючу дію полісахаридів *L. delbureckii* subsp. *Bulgaricus* (штам не вказаний) на моделі індукованої пухлини у мишей. Після інтраабдомінальних ін'єкцій водних розчинів ЕПС в сироватці крові

фіксували зростання рівнів імуноглоблінів IgG, IgA та IgM на 17,32 та 35 % відповідно у порівнянні із контрольними тваринами, яким не вводили розчин екзополісахаридів. Автори пояснюють імуномодулюючу дію ЕПС *in vivo*, тим що вони поглинаються макрофагами, що і запускає каскад реакцій з боку імунної системи [48].

Інші дослідники встановили, що ЕПС *Lactobacillus casei* WXD030 здатні *in vitro* підвищувати проліферацію та фагоцитарну активність, а також індукувати синтез оксиду азоту, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 при використанні клітин RAW264.7 (мишачі макрофаги). Досліджувані полісахариди також сприяли дозріванню дендритних клітин *in vitro* та *in vivo*. Крім того, автори показали здатність ЕПС штаму WXD030 впливати на підвищення титрів специфічних антитіл до овалбуміну (IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b), а також понижувати проліферацію Т-клітин [49].

Вперше виявлено імуномодулюючі властивості екзополісахариду *Lactobacillus fermentum* UCO-979C в досліджах *in vivo* на моделі інфекції, спричиненої *Helicobacter pylori*. ЕПС штаму UCO-979C сприяли зниженню рівнів IL-8 і підвищували рівні IL-10 в слизовій оболонці шлунку інфікованих лабораторних тварин. В досліджах *in vitro* досліджувані полісахариди знижували продукцію TNF- $\alpha$ , IL-6 та IL-8 в клітинах AGS (епітеліальні клітини аденокарциноми шлунку людини), інфікованих *H. pylori* [50].

Із ферментованого молока були виділені бактерії *Lactobacillus helveticus* LZ-R-5. ЕПС даного штаму проявили імуномодулюючі властивості. При додаванні розчинів полісахаридів (200 мкг/мл) до клітинної лінії RAW 264.7 спостерігали збільшення синтезу таких цитокінів, як TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  у 1,3, 1,5 та 1,2 рази відповідно у порівнянні з контролем (клітини без ЕПС). При цьому максимальний синтез IL-10 фіксували за концентрацій ЕПС 50 та 100 мкг/мл, а при підвищенні концентрації полісахариду від 100 до 400 мкг/мл синтез даного цитокіну зменшувався. Вчені зазначають, що



біологічна активність ЕПС зумовлена моносахаридним складом (глюкоза та галактоза) та високою молекулярною масою [51].

Кок з співавт. показали здатність ЕПС *B. licheniformis* BioE-BL11 і *Leuconostoc mesenteroides* BioE-LMD18 до імуномодулюючої дії, шляхом впливу на синтез різних цитокінів макрофагами RAW 264.7, що були стимульовані ендотоксинами (LPS). Так, секреція прозапального ІЛ-6 була значно знижена, а продукція протизапального ІЛ-10 значно збільшена. При цьому ЕПС штаму BioE-BL11 були ефективніші у значно нижчих концентраціях (50-200 мкг/мл), ніж ЕПС штаму BioE-LMD18 (1-3 мг/мл) [52].

### 2.3. Інгібітори формування біоплівки.

Бактерії, які формують біоплівки в організмі людини можуть викликати інфекційні захворювання. При цьому такі збудники характеризуються стійкістю до антибіотиків та уникають дії імунної системи людини. Варто зазначити, що бактерії біоплівки є причиною понад 80 % мікробних інфекцій в організмі людини. Традиційним підходом до запобігання утворення біоплівки *in vitro* є використання біоцидів. Однак, бактеріальні біоплівки характеризуються високою стійкістю до підвищених доз традиційних протимікробних засобів. Тому актуальним є пошук альтернативних нетоксичних для людини інгібіторів формування біоплівки [53].

Встановлено, що ЕПС *L. plantarum* WLPL04 за концентрації 500 мкг/мл знижує утворення біоплівки мультирезистентними штамами *Escherichia coli* O1576H7, *Salmonella typhimurium* ATCC13311, *Pseudomonas aeruginosa* CMCC10104 і *Staphylococcus aureus* CMCC26003 на 26, 37, 69 і 57 % відповідно. Дослідники припускають, що наявність у структурі ЕПС *L. plantarum* WLPL04 великої кількості галактози, глюкози та N-ацетилгалактозаміну зумовлює антибіоплівкову активність [54].

Показано, що полісахариди *L. plantarum* (штам не вказано) мають властивість інгібувати бактеріальні біоплівки, що формуються патогенними штамами *S. aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *P. aeruginosa* ATCC 33787 та *S. typhimurium* ATCC 901402. Найбільш

інгібуючий вплив на біоплівки (50 % руйнування) встановлено при використанні ЕПС у концентрації 512 мкг/мл [55].

Нещодавно вийшла публікація, в якій показано здатність екзополісахаридів *Lactobacillus coryniformis* NA-3 руйнувати сформовані біоплівки як грампозитивних (*Bacillus cereus* СІСС 21261), так і грамнегативних (*S. typhimurium* СІСС 22956/АТСС 14028) бактерій. Незалежно від концентрації ЕПС (30-500 мкг/мл) диспергування біоплівки *B. cereus* склало 90 %, а *S. typhimurium* – 20 % [56].

Виявлено, що ЕПС синтезовані *Bacillus* spp. (штам не вказано) мають здатність пригнічувати утворення біоплівки *E. coli* АТСС 20835218 на 50 % за концентрації 512 мкг/мл. Можливо інгібуюча властивість даного полісахариду зумовлена його впливом на рівень гідрофобності бактеріальної клітини [57].

Є повідомлення про синтез ЕПС ціанобактеріями *Oscillatoria* sp. і *Phormidium* sp. (штами не вказані) з антибіоплівковою активністю щодо *P. aeruginosa* РА14. Показано, що за концентрацій ЕПС 100 мкг/мл та 75 мкг/мл деструкція біоплівки становила 31 % та 40 % відповідно. Варто зазначити, що полісахарид синтезований *Oscillatoria* sp. зменшує утворення рамноліпідів *P. aeruginosa* РА14, які відповідають за патогенність та синтез біоплівки [58].

Цікавим є дослідження сумісного впливу ЕПС *B. licheniformis* Dahb1 з наночастинками оксиду цинку на деструкцію біоплівок *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *P. aeruginosa*, *Proteus vulgaris* та *Candida albicans*. Дослідження антибіоплівкової активності показало, що найбільш ефективна концентрація полісахариду, за якої спостерігався найнижчий ступінь адгезії, становить 75 мкг/мл [59].

З дна Східно-Китайського моря були виділені бактерії *Pseudomonas stutzeri* 273. Показано, що очищені ЕПС даного штаму здатні інгібувати утворення біоплівки *P. aeruginosa* РА01 та на 80 % диспергувати попередньо сформовану у концентрації 0,5 мкг/мл. Досліджувані ЕПС у концентрації 0,1

мкг/мл пригнічували синтез піоціаніну, який індукує утворення біоплівки. У хворих на муковісцидоз *P. aeruginosa* викликає хронічне запалення легень.

Тому було вивчено вплив даного ЕПС на інфіковану псевдомонадами перещеплювану культуру клітин A549 (карцинома легеневого епітелію). Встановлено, що бактерицидна дія ЕПС становила 60-80 % незалежно від періоду обробки (після або одночасно з інфікуванням *P. aeruginosa*) та не мала токсичного впливу на епітеліальні клітини [60].

У табл. 2.1. наведена узагальнена інформація щодо протівірусних, імуномодулюючих та антибіоплівкових властивостей мікробних екзополісахаридів.

Таблиця 2.1.

### Біологічні властивості мікробних екзополісахаридів

Продуцент	Ефективна концентрація ЕПС, мкг/мл	Біологічна дія	Джерело
<i>Bacillus licheniformis</i> B3-15	300	Протигерпетична активність (HSV-2) та стимулювання синтезу цитокінів (IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 та IL-18),	[41]
<i>Streptomyces hirsutus</i> NRC2018	125	Антигерпетична дія (HSV-1)	[42]
<i>Lactobacillus</i> sp.	150		[44]
<i>Lactobacillus</i> sp.	100	Протиаденовірусна активність (HAdV-5)	[45]
<i>Lactobacillus plantarum</i> LRCC5310	1,95 мг/мл	Протиротавірусна дія (HRV)	[46]
<i>S. thermophiles</i>	300	Підвищення фагоцитарної активності	[47]
<i>Bacillus licheniformis</i> BioE-BL11	200	Стимуляція синтезу протизапальних та зниження рівнів прозапальних цитокінів	[52]

<i>Lactobacillus casei</i> WXD030	500	Індукція синтезу TNF- $\alpha$ та протизапальних інтерлейкінів IL-1 $\beta$ , IL-6	[49]
<i>Lactobacillus helveticus</i> LZ-R-5	200	Підвищення синтезу цитокінів (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10)	[51]
<i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C	100	Зниження рівнів прозапального цитокіну IL-8; підвищення рівнів протизапального цитокіну IL-10	[50]
<i>Lactobacillus plantarum</i> WLPL04	500	Антибіоплівкова активність ( <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> )	[54]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	512	Інгібування біоплівки ( <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. typhimurium</i> )	[55]
<i>Lactobacillus coryniformis</i> NA-3	30	Руйнування біоплівок ( <i>B. cereus</i> , <i>S. typhimurium</i> )	[56]
<i>Bacillus licheniformis</i> Dahb1	75	Антибіоплівкова активність ( <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>C. albicans</i> )	[59]
<i>Bacillus</i> spp.	512	Пригнічення росту біоплівки <i>E. coli</i>	[57]
<i>Oscillatoria</i> sp.	100	Антибіоплівкова активність по відношенню до <i>P. aeruginosa</i>	[58]
<i>Pseudomonas stutzeri</i> 273	0,5	Інгібування біоплівки <i>P. aeruginosa</i>	[60]

#### 2.4. Протипухлинна активність.

На сьогоднішній день в усьому світі невпинно зростає кількість людей хворих на рак. Так, за підрахунками Всесвітньої організації охорони здоров'я до 2035 року кількість нових випадків захворювання на рак зростатиме до 24 мільйонів щороку. Тому, актуальним є питання пошуку нових протипухлинних препаратів з мінімальними побічними ефектами. В останні

роки в літературі з'явилися повідомлення про антипроліферативну активність екзополісахаридів лактобактерій [61-65], ендofітних грибів [66-67], одноклітинних водоростей [68-69], базидіоміцетних грибів [70], морських [71] та галотолерантних бактерій [72].

Показано значну антипроліферативну дію мікробного полісахариду *L. helveticus* MB2-1 *in vitro* на моделі раку шлунку людини з використанням клітинної лінії BGC-823. Встановлено, що найбільша протиракова активність досягалась за концентрації ЕПС 600 мкг/мл та збільшувалась з тривалістю інкубації, і через 72 год становила 58 %. Необхідно зазначити, що автори працювали із неочищеною та трьома очищеними фракціями ЕПС. При цьому найбільшу протипухлинну дію було виявлено при використанні однієї із очищених фракцій полісахаридів [61].

Нещодавно Tukenmez зі співавт. встановили антипухлинну дію ЕПС лактобактерій *in vitro* на моделі раку товстого кишечника людини, працюючи з перещеплюваною лінією клітин HT-29 (колоректальна аденокарцинома людини). Автори дослідили полісахариди чотирьох штамів *Lactobacillus*: *L. plantarum* GD2, *L. rhamnosus* E9, *L. brevis* LB63, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B3. Досліджувані ЕПС у концентрації 400 мкг/мл виявили протиракову активність на моделі HT-29 (71-80 %) упродовж 72 год інкубації. При цьому найвищий відсоток індукованого апоптозу (43 %) спостерігали при використанні ЕПС штаму B3. Автори відмітили, що антипроліферативні властивості даних екзополісахаридів можуть бути пов'язаними із високим вмістом в них манози (більш ніж 50 %), а також їх здатністю запускати реакції апоптозу у пухлинних клітинах [62].

Екзополісахариди *Lactobacillus kefir* MSR101 мають протиракову активність *in vitro*. При використанні клітин HT-29 виявлено дозозалежний ефект: при використанні полісахаридів у діапазоні концентрацій 50-400 мкг/мл спостерігали 10-56 % інгібування росту пухлинних клітин. Також автори показали, що ЕПС підвищували рівні експресії генів каспазозалежних шляхів апоптозу, що і призводило до лізису ракових клітин [63].

Встановлено здатність ЕПС пробіотичних культур *Lactobacillus paracasei* TD3 та *L. brevis* TD4 впливати на ракові клітини HT-29. При цьому екзополісахариди *L. brevis* проявили більшу антипроліферативну активність, апоптичну індукцію та протиракову активність. Так, при дії ЕПС *L. brevis* на 72 год спостерігали загибель 90 % моношару клітин HT-29, а при дії ЕПС *L. paracasei* – 80 %. З іншого боку, антипроліферативний та інгібуючий вплив досліджуваних ЕПС на фібробластні клітини L-929 був набагато нижчим, ніж на ракові, що говорить про різний механізм дії даних екзополісахаридів на пухлинні та нормальні клітини [64].

Nguyen з колегами із рослини *Phyllanthus urinaria* виділили ЕПС-синтезувальні бактерії *Lactobacillus lactis* NCR112. У ході вивчення ЕПС лактобактерій було встановлено їх протиракову активність *in vitro* при використанні перещеплюваних ліній клітин HeLa (рак шийки матки) та HepG2 (гепатоцелюлярна карцинома). Залежно від типу клітин відсоток цитотоксичності при дії екзополісахаридів був різним: для клітин HeLa – 87 %, а для HepG2 – 50 % [65].

На сьогоднішній день є невелика кількість повідомлень про протипухлинну активність екзополісахаридів ендоефітних грибів. Zhang зі співавтор. вперше з листя ліани *Gynostemma pentaphyllum* виділили ендоефітні гриби *Chaetomium* sp. JY25. Автори показали антипроліферативну дію ЕПС штаму JY25 на моделі карциноми легеневого епітелію *in vitro*. При дії полісахаридів у концентрації 5 мг/мл через 48 год спостерігали 90 % інгібування росту клітин лінії A549 [66].

У іншому дослідженні виявили протипухлинну дію ЕПС *Fusarium* sp. A14, що були виділені з трав'янистої рослини *Fritillaria unibracteata*. Антипроліферативні властивості полісахаридів даних ендоефітів досліджували на моделі гепатоцелюлярної карциноми людини з використанням клітин HepG2. При використанні ЕПС у концентрації 1 мг/мл через 24 год спостерігали зменшення проліферації клітин HepG2 на 75 % [67].

Trabelsi зі співавт. встановили здатність термофільних мікроводоростей *Graesiella* sp. (штам не вказано) до синтезу позаклітинних полісахаридів з антипроліферативною активністю. Для дослідження були використані дві лінії перещеплюваних клітин – HepG2 та Caco-2 (аденокарцинома товстого кишечника). При цьому за використання ЕПС у концентрації 2,5 мг/мл через 72 год спостерігали інгібування росту клітин Caco-2 на 91 %, а для клітин HepG2 цей показник був на 21 % меншим. Варто зазначити, що синтезовані *Graesiella* sp. ЕПС за своєю структурою є гетеросульфатованими аніонними полісахаридами, які містять вуглеводи (52 %), уронові кислоти (23 %), сульфати складних ефірів (11 %) та білки (12 %). Автори зазначають, що висока протиракова дія притаманна саме сульфатованим полісахаридам, що може бути пов'язано з їх імуномодуючою активністю [68].

Інші автори виявили протипухлинну активність ЕПС, що синтезуються одноклітинними водоростями *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124. У концентрації 0,5 мг/мл досліджувані полісахариди на 95 % інгібували життєздатність пухлинних клітин MDA-MB-231 (рак молочної залози). Автори виявили, що ЕПС *C. reinhardtii* CC-124 індукують структурні пошкодження клітинних мікротрубочок, що може бути одним із можливих механізмів протипухлинної активності [69].

Показано вплив джерела вуглецю при глибинному культивуванні *Scleroderma areolatum* Ehrenb на антипроліферативну активність синтезованих ЕПС на перещеплюваних лініях клітин HepG2 та A549. Встановлено, що максимальне пригнічення росту ракових клітин спостерігалось за використання ЕПС (0,5 мг/мл), отриманих при культивуванні *S. areolatum* на середовищі із фруктозою. При цьому антипроліферативна активність полісахаридів склала 42 і 24 % на культурах клітин HepG2 і A549 відповідно. Автори зазначають, що при використанні фруктози як джерела вуглецю синтезуються ЕПС з низькою молекулярною масою та високим вмістом ксилози, що і зумовлює їх антиракову активність [70].

Із донних відкладень узбережжя Червоного моря (Єгипет) були виділені бактерії *Bacillus velezensis* МНМЗ, які синтезують екзополісахариди. Досліджено протиракову дію даних ЕПС на моделі аденокарциноми протоків молочної залози людини *in vitro* з використанням лінії клітин MCF-7. Автори пов'язують протипухлинну активність ЕПС із їх здатністю індукувати пошкодження мітохондрій та впливати на рівні проапоптичних білків у ракових клітинах [71].

У 2018 р. Insulkar зі співавт. першими виявили протипухлинну активність ЕПС галотолерантних бактерій *B. licheniformis* PASS26 на моделі аденокарциноми молочної залози *in vitro*. При використанні клітин MCF-7 спостерігали зростання цитотоксичності від 6,5 до 67,8 % при використанні ЕПС штаму PASS26 у діапазоні концентрацій 0,1-1 мг/мл [72].

Узагальнену інформацію по мікробним екзополісахаридам, що проявили протипухлинну активність наведено у *табл. 2.2*.

*Таблиця 2.2.*

**Протипухлинна активність мікробних екзополісахаридів *in vitro***

Продуцент	Ефективна концентрація ЕПС, мг/мл	Модель пухлини <i>in vitro</i>	Джерело
<i>Lactobacillus helveticus</i> MB2-1	0,6	Рак шлунку (BGC-823)	[61]
<i>Chaetomium</i> sp. JY25	0,282*	Карцинома легеневого епітелію (A549)	[66]
<i>Scleroderma areolatum</i> Ehrenb	0,5	Гепатоцелюлярна карцинома (HepG2) та карцинома легеневого епітелію (A549)	[70]
<i>Fusarium</i> sp. A14	0,62*	Гепатоцелюлярна карцинома (HepG2)	[67]
<i>Graesiella</i> sp.	1,06*	Гепатоцелюлярна карцинома (HepG2)	[68]
	0,3*	Аденокарцинома товстого кишечника (Caco-2)	



<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	0,17*	Рак молочної залози (MDA-MB-231)	[69]
<i>Bacillus velezensis</i> MHM3	0,026*	Аденокарцинома протоків молочної залози (MCF-7)	[71]
<i>Bacillus licheniformis</i> PASS26	0,84*	Аденокарцинома протоків молочної залози (MCF-7)	[72]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> B3	0,4	Колоректальна аденокарцинома (HT-29)	[62]
<i>Lactobacillus brevis</i> TD4	8,75*	Колоректальна аденокарцинома (HT-29)	[64]
<i>L. kefir</i> MSR101	0,4	Колоректальна аденокарцинома (HT-29)	[63]
<i>L. lactis</i> NCR112	20	Рак шийки матки (HeLa)	[65]

**Примітка:** \* – наведена концентрація ЕПС, що викликає 50 % лізису моношару ракових клітин (індекс цитотоксичності IC<sub>50</sub>).

Фізико-хімічні властивості мікробних екзополісахаридів дозволяють їх використовувати у різних галузях промисловості. В останні роки розпочались дослідження по вивченню біологічних властивостей даних сполук. Зокрема, встановлено, що ряд екзополісахаридів проявляють противірусну та імуномодулюючу дію, інгібують утворення бактеріальних біоплівки, а також можуть пригнічувати ріст пухлинних клітин. Разом із тим механізми біологічної активності мікробних екзополісахаридів повністю не встановлені. Біологічна дія даних сполук залежить від їх складу та молекулярної маси, а також від умов культивування продуцента та складу поживного середовища для його вирощування.

## РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 3.1. Культивування продуцента етаполану

Склад середовищ та умови культивування. Штам ІМВ В-7005 вирощували у рідких мінеральних середовищах наступного складу (г/л):

*середовище 1 (базове):*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 6,8;  $\text{KOH}$  – 0,9;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,4;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 0,6;  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,001; *середовище 2:*  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3,4;  $\text{KOH}$  – 0;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,4;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 0,8;  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,001; *середовище 3:* аналогічне середовищу 1, в якому як джерело азоту використовували еквімолярну за нітрогеном концентрацію  $\text{KNO}_3$ ; *середовище 4:* аналогічне середовищу 3, в якому концентрація  $\text{Mg}^{2+}$  становила 5 Мм;

Таблиця 3.1.

#### Характеристика середовищ для вирощування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005

Номер середовища	Концентрація, г/л				
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	$\text{KOH}$	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	$\text{KNO}_3$
1	6,8	0,9	0,4	0,6	-
2	3,4	-	0,4	-	1,5
3	6,8	0,9	0,4	-	1,5
4	6,8	0,9	1,25	-	1,5

У середовище додатково вносили 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізу, а також мультивітамінний комплекс «Комплевіт» в концентрації 0,00085 % (масова частка в перерахунку на пантотенат).

Під час дослідження синтезу етаполану за дробного внесення ацетату на олії початкова концентрація ацетату становила 0,5, 1,0 і 1,5 %, а олії 0,25,

					НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ		
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Ярош М.Б.			Літ.	Арк.	Акрюшів
Перевір.		Пирог Т.П.				33	4
Реценз.					Кафедра БТМ		
Н. Контр.							
Затверд.		Пирог Т.П.					
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ							

0,5 і 0,75 %. Через 24 та 48 год здійснювали повторне внесення субстратів. Якщо значення рН перед підживленням перевищувало 8,0-8,5, то замість ацетату вносили оцтову кислоту (об'ємна частка 0,35 %) та олію (0,25 %). Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (18-24 год), вирощену на середовищі, що містило як джерело вуглецю й енергії рафіновану соняшникову олію (0,5%), ацетат натрію (0,5 %) або суміш ацетату (0,25 %) та олії (0,25 %).

Під час росту продуцента етаполану на суміші енергетично надлишкових субстратів як джерело вуглецю та енергії використовували суміш етанолу (об'ємною часткою 1,0-4,0 %) та рафіновану соняшникову олію (об'ємною часткою 0,2-1,2 %). Під час дослідження синтезу за дробного внесення етанолу на олії початкова концентрація етанолу становила 0,65 -1,0 %, а олії 0,2-0,3 %. Через 24, 48, 72 та 96 год культивування здійснювали повторне внесення субстратів відповідними порціями. Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (18-24 год), вирощену на середовищі, що містило як джерело вуглецю й енергії етанол (0,5 %).

У деяких варіантах дослідів рафіновану олію замінювали на змішану відпрацьовану (після смаження м'яса, картоплі, цибулі, сиру; «RockerPub», Київ).

Концентрація посівного матеріалу становила 10 % від загального об'єму середовища. Культивування штаму ІМВ В-7005 здійснювали в колбах (750 мл) із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при температурі 30 °С упродовж 120 год.

### **3.2. Показники росту та синтезу етаполану**

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу у відповідності з калібрувальним графіком. Кількість синтезованого етаполану визначали ваговим методом. Для цього до певного об'єму культуральної рідини

(зазвичай 10–15 мл) додавали 1,5–2 об'єми ізопропанолу, осад ЕПС промивали чистим ізопропанолом і висушували при кімнатній температурі упродовж 24 год. ЕПС-синтезувальну здатність розраховували як відношення концентрації ЕПС до концентрації біомаси та виражали у г ЕПС/ г біомаси. ЕПС–синтезувальну здатність розраховували як відношення концентрації ЕПС до концентрації АСБ та виражали у г ЕПС/ г АСБ:

$$\text{ЕПС – синт.здатність} = \frac{\text{ЕПС}}{\text{АСБ}} \quad (3.1)$$

Теоретичний вихід ЕПС від субстрату розраховували з урахуванням таких припущень: 1) 50% вуглецю субстратів окислюється з метою одержання енергії («холосте окислення»); 2) до складу біомаси та етаполану входить по 50% вуглецю [7]; 3) рафінована соняшникова олія містить 50% лінолевої та 50% олеїнової вищих жирних кислот [73]; 4) вміст азоту у біомасі становить 10%.

Так, наприклад, з 1% (10 г/л) етанолу (вміст вуглецю 4,1 г/л) та 0,4% (4 г/л) олії (вміст вуглецю 2,8 г/л) з урахуванням «холостого окислення» та вмісту вуглецю в ЕПС можна отримати сумарно 6,9 г/л ЕПС та біомаси. Враховуючи, що за використання 0,6 г/л  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (вміст азоту 0,21 г) рівень біомаси становить 2,1 г/л, максимальна концентрація ЕПС дорівнює 4,8 г/л.

### **3.3. Визначення оптимального молярного співвідношення концентрацій субстратів**

Теоретичною основою для виконання роботи була концепція допоміжного субстрату Бабеля [8]. Енергетичні витрати на синтез етаполану з етанолу та олії визначали аналогічно як описано у роботі [7]. Генерацію енергії при катаболізмі лінолевої та олеїнової кислот розраховували на основі інформації про  $\beta$ -окиснення жирних кислот [73], а також на основі даних про активність ферментів циклу Кребса, гліоксилатного циклу та глюконеогенезу у штаму *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 [7].

### 3.4. Статистична обробка даних

Статистичну обробку даних проводили за Лакінім [74]. Достовірність результатів досліджень оцінювали у відповідності з  $t$ -критерієм Стьюдента. Визначення проводили наступним чином:

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

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{l=1}^n x_l, \quad (3.1)$$

де  $x_l$  – значення варіанту,  $\sum_{l=1}^n$  – знак суми варіантів у межах від першого ( $x_1$ ) до  $n$ -

го варіанту,  $n$  – загальне число варіантів або об'єм даної сукупності.

2. Визначали різницю між середніми значеннями вибірок:

$$d = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2|, \quad (3.2)$$

3. Для встановлення, вірогідна чи випадкова дана різниця, розраховували помилку різниці середніх за формулою:

$$S_d = \sqrt{\frac{\sum(x_1 - \bar{x}_1)^2 + \sum(x_2 - \bar{x}_2)^2}{(n-1) \times n}}, \quad (3.3)$$

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

$$t_\phi = \frac{d}{S_d}, \quad (3.4)$$

5. Визначали число ступенів свободи:

$$k = n_1 + n_2 - 2, \quad (3.5)$$

6. З таблиці [стр. 323] вибирали значення стандартного  $t$ -критерію ( $t_{st}$ ) для прийнятого рівня значимості  $\alpha$ .

При умові, що  $t_\phi \geq t_{st}$  нульова гіпотеза спростовується на високому рівні значимості ( $P < 0,05$ ). Отримані в ході досліджень результати відповідно  $t$ -критерія Стьюдента виявилися статистично достовірними при 5 %-му рівні значимості.

## РОЗДІЛ 4. ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ МІКРОБНОГО ПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ С<sub>2</sub> СУБСТРАТИВ ТА СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ

### 4.1. Вплив дробного внесення субстратів на синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші ацетату натрію та олії

Нещодавно [4] встановлено можливість синтезу мікробного екзополісахариду (ЕПС) етаполану (продуцент *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005) на суміші ацетату та соняшникової олії.

На основі теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ЕПС і біомаси *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на енергетично дефіцитному субстраті (ацетат) встановлено, що молярне співвідношення концентрацій ацетату натрію та олії у суміші, за якого досягається максимальний синтез ЕПС, повинно становити 1:0,13. Експериментально підтверджено, що при даному співвідношенні концентрацій моносубстратів та використанні інокуляту, вирощеного на рафінованій олії, показники синтезу етаполану були вищими, ніж за інших співвідношень концентрацій ацетату та олії у суміші [75].

За концентрацій ацетату натрію 1,0 % та олії 0,5 % спостерігалось підвищення рН культуральної рідини з 7,0 до 9,5, внаслідок симпорту з протоном, що є неоптимальним для синтезу етаполану.

Заміна NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> у середовищі для культивування на еквімолярну за нітрогеном концентрацію NH<sub>4</sub>Cl, зниження вмісту КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> у два рази (до 3,4 г/л) при виключенні зі складу середовища КОН дало змогу знизити рН всього на 0,2-0,3 одиниці. У той же час зменшення концентрації ацетату натрію та олії у суміші до 0,5 % та 0,25 % або зниження у середовищі для біосинтезу концентрації КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (до 3,4 г/л) з одночасним виключенням з його складу КОН супроводжувалося підтриманням рН культуральної рідини на рівні 7,7-7,9. Очевидно, що для подальшого підвищення концентрації ЕПС

НУХТ БТЕК 02.02.13 КР ПЗ								
Змн.	Лист	№ докум.	Підпис	Дата	РОЗДІЛ 4. ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ МІКРОБНОГО ПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ С <sub>2</sub> СУБСТРАТИВ ТА СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ	Літ.	Арк.	Акрюшів
Розроб.		Ярош М.Б.				37	30	
Перевір.		Пирог Т.П.				Кафедра БТМ		
Реценз.								
Н. Контр.								
Затверд.		Пирог Т.П.						

необхідно збільшувати вміст ацетату натрію і олії у суміші, але при цьому підтримувати рН на оптимальному рівні. Одним зі шляхів вирішення даної проблеми є дробне внесення субстратів у процесі культивування.

Встановлено, що внаслідок наявності у суміші достатньо високої концентрації ацетату натрію (1,0 %), який транспортується у клітини продуцента симпортом з протоном призводить до підвищення рН культуральної рідини до неоптимального для синтезу ЕПС рівня. Одним зі шляхів вирішення даної проблеми є зниження початкової концентрації субстратів з наступним дробним внесенням у процесі культивування.

Так, наприклад, використання такого підходу разом з підтриманням значень культуральної рідини на рівні 7,5 при вирощуванні штаму ІМВ В-7005 на суміші ацетату та меляси супроводжувалось підвищенням показників синтезу етаполану на 10-45 % порівняно з вихідною технологією [5].

Встановлено, що зниження початкової концентрації моносубстратів у суміші до 1/3 від їхнього загального вмісту з наступним дробним внесенням у процесі вирощування продуцента до кінцевої концентрації ацетату 1,5-3,0 % та олії 0,75-1,5 % дало змогу підтримати рН культуральної рідини впродовж культивування на рівні 6,4-7,8 (табл. 4.1). За таких умов культивування концентрація синтезованого етаполану досягала 13,8 г/л, а ЕПС-синтезувальна здатність – 4,5 г ЕПС / г біомаси.

*Таблиця 4.1*

**Вплив дробного внесення субстратів на біосинтез етаполану на суміші ацетату та олії**

<b>Концентрація моносубстратів у суміші, %</b>	<b>Режим дробного внесення субстратів, %</b>	<b>рН<sub>кін</sub></b>	<b>ЕПС, г/л</b>	<b>ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г біомаси</b>

Ацетат, 1,5 + рафінована олія, 0,75	Без дробного внесення (контроль)	8,7	4,02±0,20	1,07±0,05
	Тричі порціями по 0,5 % ацетату і 0,25 % олії	6,4*	5,67±0,28**	2,00±0,10***
Ацетат, 3,0 + рафінована олія, 1,5	Без дробного внесення (контроль)	9,5	2,84±0,14	0,68±0,03
	Тричі порціями по 1,0 % ацетату і 0,5 % олії	7,8*	13,82±0,69* *	4,53±0,23***
	Двічі порціями по 1,0 % ацетату і 0,5 % олії, третя порція: 0,35 % оцтової кислоти і 0,5 % олії	7,9*	17,27±0,86* *	6,47±0,32***
Ацетат, 3,0 + відпрацьована олія, 1,5	Без дробного внесення (контроль)	9,6	2,31±0,12	0,55±0,03
	Двічі порціями по 1,0 % ацетату і 0,5% олії, третя порція: 0,35 % оцтової кислоти і 0,5% олії	7,7*	16,36±0,82* *	7,34±0,37***

**Примітки:** Культивування здійснювали на модифікованому середовищі 2. Посівний матеріал вирощували на рафінованій олії. Молярне співвідношення моносубстратів у суміші 1:0,13. \* – контроль без дробного внесення субстратів. \*\* – вносили оцтову кислоту (0,35 %) та олію (0,25 %). \*\*\* –  $P \leq 0,05$  відносно контролю (концентрація ЕПС без дробного внесення субстратів). \*\*\*\* –  $P \leq 0,05$  відносно контролю (ЕПС-синтезувальна здатність без дробного внесення субстратів).

Варто зазначити, що при підвищенні початкової концентрації ацетату у суміші до 1,5 % рН культуральної рідини після другого внесення субстратів підвищувалось до 8,0. Для його зниження замість останньої порції моносубстратів вносили суміш оцтової кислоти (0,35 %) та олії (0,25 %).



Такий підхід дав змогу не лише стабілізувати рН середовища культивування на оптимальному для синтезу ЕПС рівні, але й супроводжувався додатковим підвищенням кількості синтезованого етаполану у 1,25 рази.

У наших попередніх роботах [3] неодноразово продемонстровано можливість заміни рафінованої олії у моно- та змішаних субстратах на різні типи відпрацьованої. При цьому показано, що оптимальним для синтезу етаполану є використання змішаної відпрацьованої соняшникової олії, яка зазвичай утворюється під час змішування різної пересмаженої олії перед відправкою на утилізацію. Однією з актуальних проблем сьогодення є утилізація невпинно зростаючої кількості відпрацьованої олії. Основним постачальником даного відходу є ресторани, а також заклади громадського харчування.

Так, за даними Агентства управління енергетичною інформацією США станом на 2019 рік в Сполучених Штатах Америки щодня збирають декілька мільйонів галонів відпрацьованої олії з закладів громадського харчування. У Європі ця кількість становить близько 0,49–0,7 мільйона галонів на день [76]. Відповідно до даних Державної служби статистики у 2018 р. в Україні було виготовлено 5,1 млн. т рафінованої соняшникової олії [[http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2006/pr/prm\\_ric/prm\\_ric\\_u/vov2005\\_u.html](http://www.ukrstat.gov.ua/operativ/operativ2006/pr/prm_ric/prm_ric_u/vov2005_u.html)], переважна частина якої потрапить в навколишнє середовище у вигляді пересмаженої відпрацьованої після смаження їжі. Зазначимо, що в Україні викиди відпрацьованої соняшникової олії в навколишнє середовище не регламентуються.

Власне накопичення таких великих обсягів токсичного відходу й зумовило необхідність пошуку ефективних способів їх переробки та утилізації.

Наразі основні обсяги відпрацьованої олії використовуються для виробництва біодизелю та відгодівлі худоби, але на цьому варіанти її утилізації не вичерпуються. Так, одним з перспективних способів переробки даного відходу є його використання як субстрату для одержання практично

цінних продуктів мікробного синтезу: поверхнево-активних речовин, полігідроксиалканоатів, органічних кислот, ферментів, вітамінів тощо [77].

Нами у даній роботі (табл. 4.1) встановлено, що заміна рафінованої олії у суміші з ацетатом на змішану відпрацьовану супроводжувалось лише незначним зниженням концентрації синтезованого етаполану (16,36 г/л) порівняно з використанням рафінованого субстрату, що може бути зумовлене наявністю у ній токсичних сполук (альдегіди, гетероциклічні аміни, вільні радикали тощо) [78, 79]. У той же час ЕПС-синтезувальна здатність навпаки підвищувалась у 1,13 рази і досягала 7,34 г ЕПС / г біомаси. Варто зазначити, що схожі закономірності при переході на пересмажену олію спостерігалися при дослідженні особливостей синтезу етаполану на суміші меляси та відпрацьованої олії [80].

Варто зазначити, що у доступній літературі наявні вкрай обмежені відомості про синтез мікробних ЕПС на суміші змішаних субстратах [81, 82, 83].

Так, у роботі [83] показано, що додавання до середовища культивування штаму *P. stutzeri* AS22, яке містить 50 г/л крохмалю, незначних кількостей манози (1 г/л), яка входить до складу ЕПС, призводить до підвищення концентрації синтезованих ЕПС на 32 % (до 10,2 г/л), ніж під час росту продуцента тільки на сахарозі. Варто зазначити, що при вирощуванні штаму AS22 на середовищі з манозою концентрація ЕПС була у майже 38 разів меншою ніж при використанні сахарози.

Аналогічний підхід було використано An зі співавт. [80] при оптимізації технології одержання пулулану штамом *Aureobasidium pullulans* 201253. Дослідження показали, що використання для культивування грибів суміші гідролізованого картопляного крохмалю (ГКП) (80 г/л) та сахарози (20 г/л) дозволяє отримати 54,57 г/л ЕПС, що лише незначною мірою нижче за отриману при використанні сахарози кількість, але вище ніж за використання ГКП або суміші ГКП з глюкозою та фруктозою (80:10:10). Автори припускають, що незначна кількість сахарози у суміші може

стимулювати активність ферментів, відповідальних за синтез ЕПС і підсилювати ефективність конверсії ГКП.

Варто зазначити, що в наведених вище роботах йде мова про використання ко-субстратів ніж про класичну міксотрофію.

Інші дослідники [81] показали, що використання ультрапастеризованого молока для приготування поживного середовища на основі MRS і 80 г/л сахарози, дозволяє отримати при культивуванні молочнокислих бактерій (штам PP15) 9,0 г/л декстрину. Варто зазначити, що у разі приготування середовища на дистильованій воді концентрація ЕПС становила 5,05 г/л. Автори припускають, що позитивний вплив молока на синтезу декстрину обумовлений наявністю у його складі сферичних казеїнових агрегатів, які з'єднанні між собою кальцій фосфатними зв'язками. При руйнуванні таких міцел ферментами молочнокислих бактерій відбувається вивільнення в поживне середовище кальцію, який використовується в якості кофактору або залучається до метаболізму продуценту з метою підвищення синтезу ЕПС.

У роботах [84, 85] проводилися дослідження з можливості інтенсифікації синтезу ЕПС ціанобактеріями в умовах мікотрофного росту. Так, *Nostoc flegelliforme* при культивуванні у фотоавтотрофних умовах (60 мкмоль фотонів  $\text{м}^{-2} \text{сек}^{-1}$ ) з додаванням суміші глюкози (4 г/л) і ацетату (2 г/л) здатні накопичувати 879,6 мг/л ЕПС [85]. Варто зазначити, що показники синтезу ЕПС за таких умов культивування є у 1,27 та 4,16 рази вищими ніж при вирощуванні штаму на монособстратах глюкозі або ацетаті відповідно. Інші ціанобактерії, *Arthrospira platensis* штам *compère* 1968/3786, в міксотрофних умовах (100 мкмоль фотонів  $\text{м}^{-2} \text{сек}^{-1}$  і 1,5 г/л глюкози) здатні накопичувати 290,5 мг/л ЕПС, що є у 1,3 і 9,6 рази вищим ніж за фотоавтотрофних і гетеротрофних умов відповідно [84]. Подальша статистична обробка отриманих результатів показала, що максимальна концентрація ЕПС (369,32 мг/мл) і ЕПС-синтезувальна здатність (364,3 мг

ЕПС/ г біомаси) можуть бути досягнуті при інтенсивності світла 150 і 115 мкмоль фотонів м<sup>-2</sup> сек<sup>-1</sup> і концентрації глюкози 2,4 і 1,8 г/л відповідно.

## **4.2. Енергетичні та біохімічні аспекти біосинтезу етаполану на суміші енергетично надлишкових субстратів**

### **4.2.1. Розрахунок молярного співвідношення етанолу та рафінованої соняшникової олії за умов росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на їх суміші**

Теоретичною основою для виконання роботи була концепція допоміжного субстрату, розроблена Бабелем у 80-х роках ХХ ст. [8]. Згідно з даною концепцією усі субстрати можна поділити на енергетично надлишкові та дефіцитні, залежно від кількості енергії, що генерується при їх катаболізмі до центрального вуглецевого попередника – фосфогліцеринової кислоти (ФГК).

Якщо кількість АТФ і відновлювальних еквівалентів, що утворюються під час метаболізму субстрату до ФГК, є достатньою для синтезу клітинних компонентів, такий субстрат називається енергетично надлишковим. Енергетично дефіцитними є субстрати, частина яких має бути окиснена до СО<sub>2</sub> з метою одержання енергії, необхідної для процесів конструктивного метаболізму [7, 8].

Згідно з енергетичною класифікацією Бабеля [8] етанол та олія, що містить вищі жирні кислоти, є енергетично надлишковими субстратами.

Для визначення оптимального співвідношення субстратів у суміші необхідно: 1) визначити скільки кожен субстрат окремо генерує енергії, необхідної для процесів конструктивного метаболізму. Крім того, потрібно знати шляхи метаболізму ростових субстратів, структуру повторюваної ланки вуглеводного ланцюга ЕПС, а також співвідношення Р/О; 2) розрахувати загальне значення генерації енергії під час синтезу етаполану та біомаси; 3) розрахувати скільки кожен субстрат окремо генерує енергії від загального обсягу [7].

Для розрахунку оптимального молярного співвідношення концентрацій етанолу та соняшникової олії за умов росту *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на їх суміші приймали такі припущення:

- етанол та олія використовуються для синтезу біомаси та ЕПС, а також на енергетичні потреби;
- з етанолу та олії генерується однакова кількість енергії;
- рафінована соняшникова олія містить 50 % лінолевої та 50 % олеїнової вищих жирних кислот [73], інші жирні кислоти є мінорними компонентами;
- ЕПС містить 50 % ацильованого (АП) і 50 % неацильованого полісахариду (НАП);
- до складу АП входить два залишки жирних кислот (лауринової та пальмітинової);
- при синтезі етаполану з олії жирні кислоти утворюються в результаті  $\beta$ -окиснення лінолевої та олеїнової вищих жирних кислот;
- НАДФН, що утворюється у процесі катаболізму сахарози та жирних кислот, є джерелом відновлюваних еквівалентів, які окислюються до води через дихальний ланцюг;
- співвідношення Р/О становить 2.

### **Генерація енергії під час синтезу етаполану з етанолу**

Повторювана ланка АП складається з нейтральних моносахаридів, деякі з яких, на відміну від НАП, є ацильованими, залишків глюкуронової та піровиноградної кислот. Зі схеми, наведеної на *рис. 4.1*, видно, що синтез даних компонентів з етанолу нерозривно пов'язаний з генерацією енергії (синтез моносахаридів, жирних кислот, утворення глюкуронової і піровиноградної кислот).

### **Синтез моносахаридів**

Синтез вуглеводної частини етаполану можна умовно поділити на 3 етапи:

1) Утворення фосфорильованих вуглеводів. Глюкозо-6-фосфат (фруктозо-6-фосфат) синтезуються у процесі глюконеогенезу.

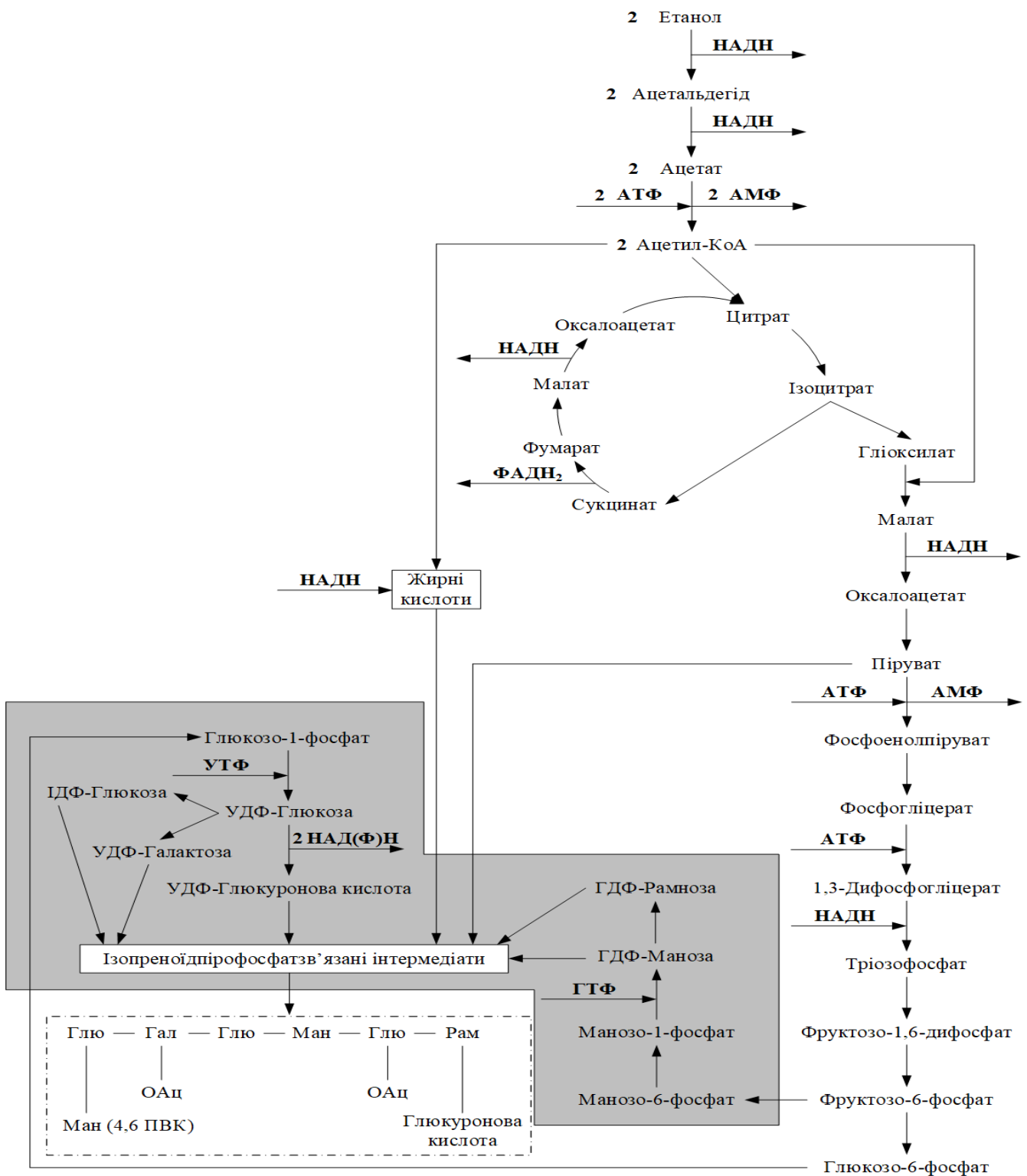
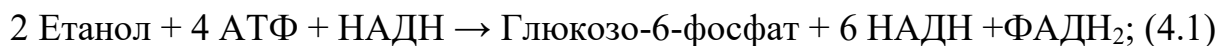
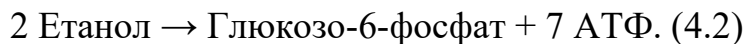


Рис. 4.1. Схема синтезу повторювальної ланки етаполану у процесі катаболізму етанолу (сірим кольором виділено літературні дані).

Сумарне рівняння одержання 1 моль глюкозо-6-фосфату з етанолу можна виразити наступним чином:



При Р/О 2 рівняння набуває вигляду:



2) **Синтез попередників ЕПС.** На наступному етапі відбувається синтез відповідних нуклеозиддифосфатсахаридів (наприклад, УДФ-глюкози з глюкозо-1-фосфату чи ГДФ-манози з манозо-1-фосфату тощо). Утворення кожного попередника супроводжується витратою 1 моль ГТФ або УТФ.

3) **Полімеризація ЕПС.** На останньому етапі повторювана ланка приєднується до молекули полісахариду. Під час даного процесу витрачається енергія одного макроергічного зв'язку.

До складу повторюваної ланки ЕПС входять залишки 7 нейтральних моносахаридів і залишок глюкуронової кислоти. Для їх синтезу необхідно 8 моль глюкозо-6-фосфату (фруктозо-6-фосфату), які синтезуються з 16 моль етанолу. Таким чином, загальна генерація АТФ на синтез моносахаридів, які входять до складу повторювальної ланки АП, і приєднання цієї ланки до молекули ЕПС становить  $7 \times 8 - 8 - 1 = 47$  моль АТФ.

Варто зазначити, що на даному етапі відбувається додаткова генерація 2 моль НАД(Ф)Н під час утворення глюкуронової кислоти. Зважаючи на це загальна генерація енергії становить 51 моль АТФ.

### **Синтез жирних кислот**

Попередником для біосинтезу жирних кислот є ацетил-КоА. Подальше нарощування вуглецевого скелету відбувається за рахунок взаємодії активованого ацетил-КоА з малоніл-КоА, який утворюється внаслідок АТФ-залежної конденсації ацетил-КоА з  $\text{CO}_2$ . Далі в результаті трьох наступних реакцій утворюється бутирил-КоА ( $\text{C}_4$ ). Він взаємодіє з наступною молекулою малоніл-КоА і цикл повторюється до утворення необхідної жирної кислоти. Таким чином, послідовним нарощуванням ацил-КоА на двовуглецевий фрагмент (взаємодією з малоніл-КоА і наступним

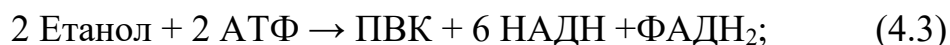
декарбоксілюванням) синтезуються вищі жирні кислоти у вигляді відповідних ацил-КоА.

Отже, для синтезу лауринової кислоти (C<sub>12</sub>) потрібно 5 циклів, для пальмітинової (C<sub>16</sub>) – 7 циклів. В одному циклі витрачається 1 моль АТФ. З рис. 1 видно, що додатково 3 моль АТФ генеруються при перетворенні етанолу на ацетил-КоА. Усього для синтезу лауринової кислоти потрібно 6, а для утворення моль пальмітинової кислоти – 8 моль ацетил-КоА.

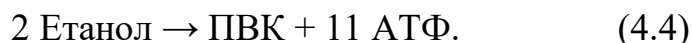
Таким чином, генерація енергії під час синтез жирних кислот, що входять до складу повторюваної ланки АП, становить  $6 \times 3 + 8 \times 3 - 5 - 7 = 29$  моль АТФ.

### Синтез пірувату

Сумарну реакцію утворення ПВК з етанолу можна виразити таким рівнянням:



Таким чином, генерація АТФ становить:



Таблиця 4.2.

### Генерація енергії при утворенні повторюваної ланки ацильованого та неацильованого ЕПС з етанолу

ЕПС	Генерація енергії під час утворення ланки ЕПС, моль АТФ		
	Синтез моносахаридів і глюкоуронової кислоти	Синтез жирних кислот	Синтез ПВК
АП	51	29	11
НАП	51	0	11

Примітка: при Р/О рівне 2.

Дані щодо генерації енергії АТФ під час синтезу ланки АП і НАП (рівняння 1-4) можна представити у вигляді таблиці (табл. 4.2.).

На утворення повторюваної ланки АП витрачається 32 моль етанолу (16 моль – на синтез моносахаридів і глюкоуронової кислоти; 14 моль – на утворення жирних кислот і 2 моль – на утворення ПВК), на синтез ланки НАП – 18 моль етанолу (16 моль – на синтез моносахаридів і глюкоуронової



кислоти і 2 моль – на утворення ПВК). Енергетичні потреби мікробного синтезу АП і НАП у перерахунку на моль використаного етанолу наведено в *табл. 4.3.*

*Таблиця 4.3.*

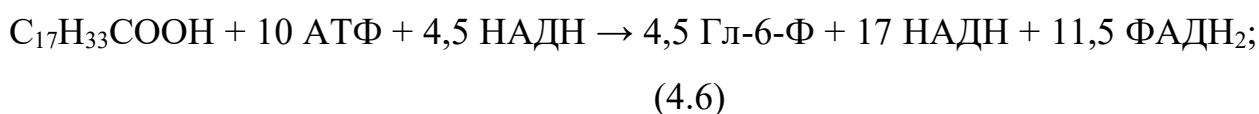
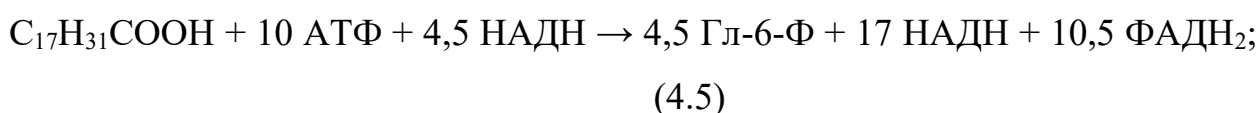
**Енергетичні потреби синтезу ацильованого та неацильованого  
полісахаридів з етанолу**

ЕПС	Витрата етанолу на синтез ланки ЕПС, моль	Генерація енергії, моль АТФ	
		На синтез ланки ЕПС	На моль використаного етанолу
АП	32	91	2,84
НАП	18	62	3,40
АП+НАП	50	152	<b>3,04</b>

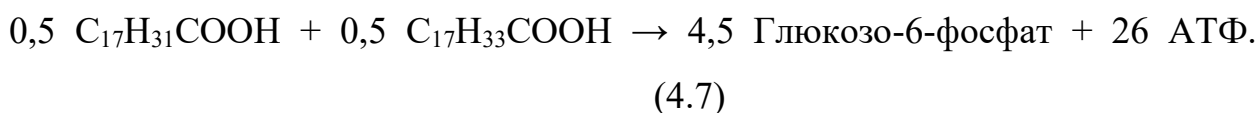
Таким чином, генерація енергії під час синтезу повторюваної ланки АП і НАП (АП + НАП) становить 3,04 моль АТФ / моль використаного етанолу.

**Генерація енергії під час синтезу етаполану з соняшникової олії  
Синтез моносахаридів**

З *рис. 4.2.* сумарне рівняння одержання 1 моль глюкозо-6-фосфату з лінолевої та олеїнової жирних кислот можна виразити наступним чином:



При Р/О 2 рівняння 5 та 6 набувають вигляду:



Для синтезу 7 нейтральних моносахаридів і залишок глюкуронової кислоти необхідно сумарно 1,78 моль жирних кислот. При цьому генерація енергії становить  $1,78 \times 26 - 8 - 1 = 37,28$  моль АТФ.

З урахуванням генерації енергії під час синтезу глюкуронової кислоти загальна кількість АТФ становить 41,28 моль АТФ.

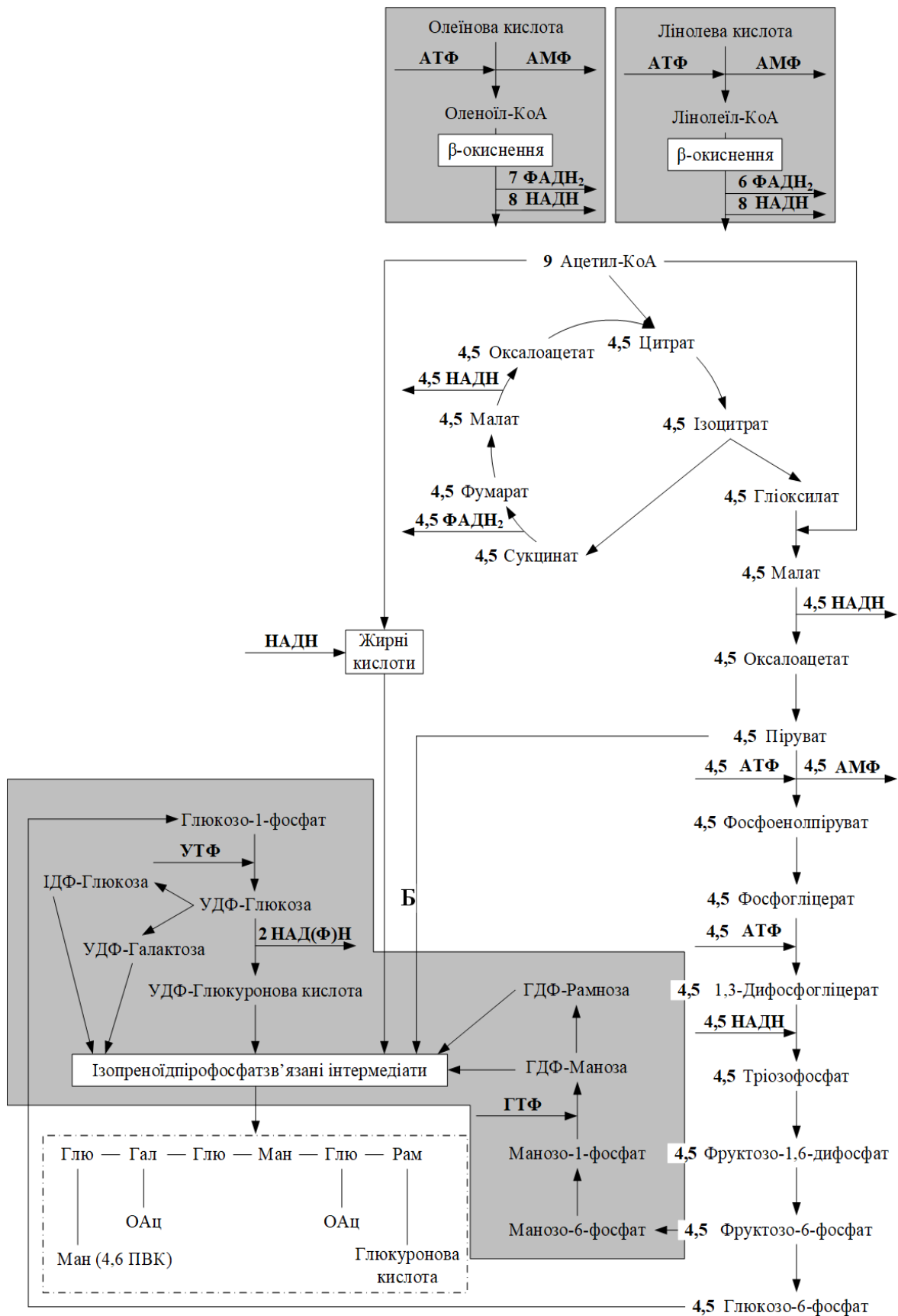
### **Синтез жирних кислот**

Синтез лауринової та пальмітинової кислоти, які входять до складу етаполану, відбувається під час  $\beta$ -окиснення жирних кислот олії.

Для цього:

1) Жирна кислота активується і перетворюється її на відповідний ефір коферменту А за допомогою ферменту ацил-КоА-синтетази.

2) Відбувається окиснення КоА-ефіру по  $\beta$ -положенню і розщеплення з утворенням ацетил-КоА та скороченого на два вуглецевих атоми КоА-ефіру жирної кислоти. У ході даного ряду реакцій відновлюється по 1 моль НАД і ФАД. Варто зазначити, що на ділянках з ненасиченими зв'язками ФАД не відновлюється, оскільки немає необхідності в утворенні подвійного зв'язку.

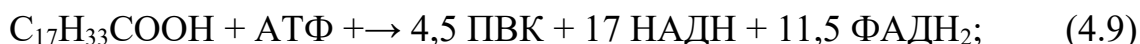
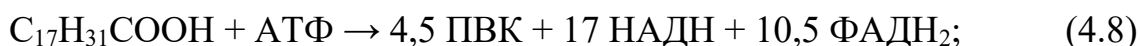


**Рис. 4.2.** Схема синтезу повторювальної ланки етаполану у процесі катаболізму олії (сірим кольором виділено літературні дані)

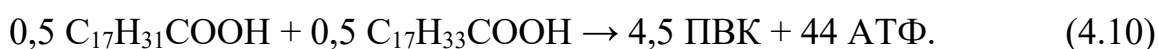
Беручи до уваги наведену вище інформацію для утворення C<sub>16</sub> і C<sub>12</sub> жирних кислот необхідно 1 і 3 цикли відповідно. При цьому генерується  $1 \times (2+1) + 3 \times (2+1) = 12$  моль АТФ.

### Синтез пірувату

Сумарну реакцію утворення ПВК з етанолу можна виразити такими рівняннями:



При Р/О 2 рівняння 2.8 та 2.9 набувають вигляду:



Для синтезу 1 моль ПВК рівняння 4.10 можна виразити наступним чином:



*Таблиця 4.4.*

### Енергетичні потреби синтезу ацильованого та неацильованого полісахаридів з олії

ЕПС	Витрата олії на синтез ланки ЕПС, моль	Генерація енергії, моль АТФ	
		На синтез ланки ЕПС	На моль використаної олії
АП	3	63,06	21,02
НАП	2	51,06	25,53
АП+НАП	2,5	114,12	<b>45,65</b>

Таким чином, генерація енергії під час синтезу повторюваної ланки АП і НАП (АП + НАП) становить 38,95 моль АТФ / моль використаної олії.

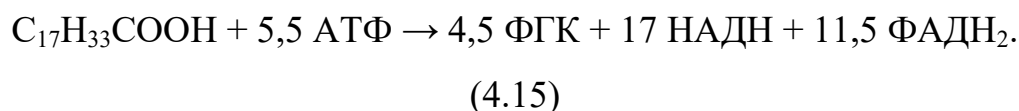
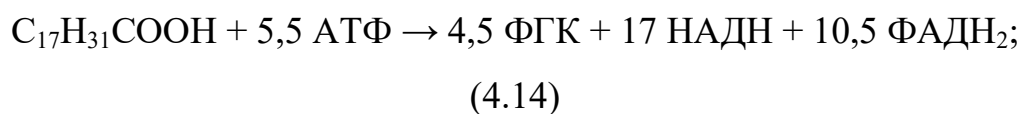
### Енергетичні витрати на синтез біомаси

Синтез біомаси з ФГК (за використання амонійного джерела азотного живлення) можна представити рівнянням:

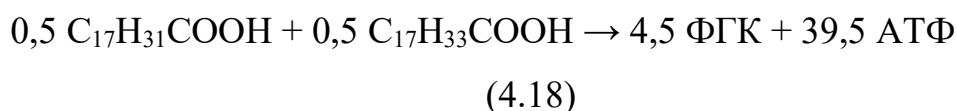
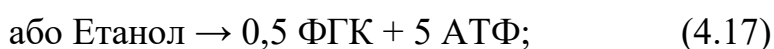
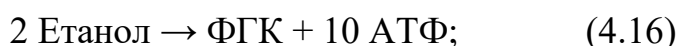


де  $(C_4H_8O_2N_1)_3$  – формула моля біомаси.

Сумарна реакції перетворення етанолу та олії на ФГК можна виразити такими рівняннями:



Для Р/О 2 рівняння набуває вигляду:



Виходячи з рівняння синтезу біомаси з ФГК (рівняння 4.12) та рівнянь катаболізму етанолу та олії до ФГК (рівняння 4.13), можна розрахувати, що у процесі росту на даних субстратах після синтезу біомаси (у розрахунку на моль субстрату) залишається 3,04 та 40,15 моль АТФ відповідно, або 43,19 моль АТФ сумарно.

Враховуючи припущення, що з етанолу та олії генерується однакова кількість енергії, для її синтезу необхідно 7,1 та 0,54 моль етанолу та олії відповідно.

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

Таким чином, співвідношення етанолу (об'ємна частка) та рафінованої соняшникової олії (об'ємна частка) в середовищі культивування продуцента має становити 1:0,076.

### **4.3. Особливості синтезу етаполану на суміші етанолу та рафінованої соняшникової олії**

У наших попередній роботах з успіхом продемонстровано можливість отримання високих концентрацій ЕПС штамом ІМВ В-7005 за використання етанолу та соняшникової олії [7]. У зв'язку з цим, ми припустили, що використання суміші даних субстратів як енергетично надлишкових дозволить забезпечити максимальні показники синтезу етаполану.

Згідно проведених теоретичних розрахунків оптимальне молярне співвідношення етанолу та олії у суміші становить 1:0,076.

Зважаючи на те, що всі розрахунки повинні супроводжуватися проведенням відповідних експериментів, на першому етапі роботи досліджували принципову можливість використання суміші етанолу та олії для отримання полісахариду етаполану при теоретично розрахованому молярному співвідношенні їх концентрацій.

Ефект від використання змішаних субстратів має сенс тільки тоді коли концентрація цільового продукту на суміші субстратів є вищою порівняно з використанням еквімолярних за вуглецем концентрацій моносубстратів.

Оскільки показники синтезу етаполану залежать від способу підготовки інокуляту, на першому етапі досліджували вплив природи джерела вуглецю у середовищі для одержання посівного матеріалу на синтез ЕПС (див. *табл 4.5*).

Раніше показано [5], що метаболізм етанолу у продуцента етаполану здійснюється шляхом окиснення через ацетальдегід до ацетату НАД<sup>+</sup> і НАДФ<sup>+</sup> - залежними дегідрогеназами, асиміляція якого відбувається повільніше ніж накопичення, тому ми припустили, що попереднє використання високих концентрацій субстратів у суміші буде супроводжуватись пригніченням синтезу ЕПС. Зважаючи на це на даному етапі культивування доцільно почати з невисоких концентрацій етанолу та олії 1,0 % та 0,4 % відповідно.

**Синтез етаполану на суміші етанолу (1,0 %) та рафінованої соняшникової олії (0,4 %) залежно від способу підготовки інокуляту**

Субстрат для одержання інокуляту, %	pH	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г біомаси
Етанол, 0,5	7,2	3,18±0,16	1,85±0,09
Олія, 0,5	5,6	2,14±0,11	1,39±0,07
Етанол, 0,25 та олія, 0,25	5,6	2,00±0,10	0,84±0,04
Етанол, 0,5	6,0	1,49±0,07	0,93±0,05
Олія, 0,5	7,4	1,56±0,08	1,20±0,06

**Примітки:** Теоретично розраховане оптимальне молярне співвідношення концентрації моносубстратів у суміші – 1:0,076. Культивування здійснювали на базовому середовищі 1. Концентрація моносубстратів еквімолярна за вуглецем і становить 1,66 % (об'ємна частка) етанолу та 1,00% (об'ємна частка) олії.

Встановлено, що незалежно від способу підготовки посівного матеріалу показники синтезу ЕПС були у 1,3-2,1 рази вищими за отримані на відповідних моносубстратах (див. *табл. 4.5*). При цьому максимальна концентрація етаполану (3,18 г/л) спостерігалася у разі використання інокуляту, вирощеного на етанолі. Варто зазначити, що за таких умов культивування кількість синтезованого етаполану була максимально можливою для даних концентрацій моносубстратів у суміші.

Тому в подальших експериментах досліджували синтез полісахариду при різних молярних співвідношеннях концентрацій етанолу та олії у суміші.

Експерименти показали (див. *табл. 4.6*), що найвищі показники синтезу етаполану (кількість синтезованих ЕПС – 4,2 г/л, ЕПС-синтезувальна здатність 2,0 г ЕПС/г біомаси) спостерігалися за молярного співвідношення моносубстратів у суміші 1:0,056, максимально наближеного до теоретично розрахованого (1:0,076). На нашу думку, відхилення від теоретичного співвідношення зумовлено нерівномірним залученням кожного субстрату до метаболізму та біосинтетичних процесів.

**Вплив молярного співвідношення концентрацій етанолу та олії у суміші на синтез етаполану**

<b>Концентрація олії у суміші з етанолом (1 %)</b>	<b>Молярне співвідношення етанолу та олії</b>	<b>pH</b>	<b>ЕПС, г/л</b>	<b>ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г біомаси</b>
<b>Олія</b>				
0,2	1:0,036	7,2	2,10±0,11	0,49±0,02
0,3	1:0,056	7,2	4,23±0,21	2,00±0,10
0,4	1:0,076*	7,1	3,18±0,16	1,85±0,09
0,5	1:0,096	5,8	2,94±0,15	1,20±0,06
0,6	1:0,116	7,2	2,67±0,13	0,79±0,04

**Примітки:** \* – теоретично розраховане оптимальне молярне співвідношення концентрації монособстратів у суміші – 1:0,076; Посівний матеріал вирощували на етанолі (0,5 %). Культивування здійснювали на базовому середовищі 1.

Оскільки ефективність технології значною мірою залежить від кількості цільового продукту, то на наступному етапі необхідно збільшувати вміст етанолу та олії у суміші.

Експерименти показали, що підвищення концентрації субстратів у суміші з 1,0 до 2,0 % супроводжувалось збільшенням кількості синтезованого ЕПС в 1,2 рази (див. *табл. 4.7*), однак подальше підвищення вмісту етанолу та олії у середовищі призводило до зниження синтезу етаполану до 1,90 г/л та pH культуральної рідини до 4,8 (оптимум pH для синтезу ЕПС 7,0-8,0).

**Синтез етаполану залежно від концентрації етанолу та олії в суміші**

<b>Концентрація субстратів у суміші, %</b>		<b>pH</b>	<b>ЕПС, г/л</b>	<b>ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г біомаси</b>
<b>Етанол</b>	<b>Олія</b>			
1,0	0,3	7,2	4,23±0,21	2,00±0,1
2,0	0,6	5,5	5,01±0,25	1,95±0,10
3,0	0,9	5,2	2,38±0,12	0,99±0,05
4,0	1,2	4,8	1,90±0,09	0,97±0,05



**Примітки:** Молярне співвідношення концентрації монособстратів у суміші – 1:0,056; Посівний матеріал вирощували на етанолі (0,5 %). Культивування здійснювали на базовому середовищі 1.

Раніше було показано [7], що «вузьким» місцем метаболізму етанолу при культивуванні штаму IBM B-7005 є асиміляція ацетату, яка обумовлена низькою активністю ацетил-КоА-синтетази, що супроводжується зниженням рН до значення, при якому транспорт ацетату в клітини сповільнюється або стає неможливим. В цьому випадку поступове накопичення ацетату призводить або до подальшого зниження рН до рівня, при якому культура не може рости, або до пригнічення росту бактерій високими концентраціями ацетату [86].

Так, ацетат за високих концентрацій може пригнічувати ріст бактерій за допомогою різних механізмів: неспецифічного гальмування ферментативних реакцій внаслідок підкислення цитоплазми, впливу на енергетику бактеріальної клітини і перш за все на такий важливий її компонент, як електрохімічний градієнт протонів  $\Delta\mu\text{H}^+$ . Цей ефект пов'язаний з властивостями ацетату як проникаючої слабкої кислоти [86].

Вирішити дану проблему можливо шляхом зниження початкової концентрації субстратів з наступним дробним внесенням у процесі культивування.

У зв'язку з цим було висловлене припущення, що зниження початкової концентрації суміші етанолу і масла у середовищі з  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  дасть змогу уникнути надлишкового закислення культуральної рідини.

Результати показали, що у разі внесення субстратів у суміші двома та трьома порціями до кінцевої концентрації 2,0 % етанолу та 0,6 % олії супроводжувалось підвищенням синтезованого етаполану і ЕПС-синтезувальної здатності до максимально можливого рівня ( 8,0-8,8 г/л ЕПС, 1,8-2,6 г ЕПС/г біомаси) для такої концентрації субстратів. Проте рН культуральної рідини до кінця процесу було низьким (5,4-5,6), хоча при

цьому спостерігали незначне підвищення показників синтезу полісахариду у порівнянні з одноразовим внесенням аналогічних концентрацій субстратів.

Оскільки у попередніх дослідженнях [7] було показано, що реологічні властивості розчинів етаполану залежать від значення рН то на наступному етапі роботи досліджували можливість підтримання рН культуральної рідини у процесі вирощування штаму ІМВ В-7005 на суміші етанолу і олії на рівні, оптимальному для синтезу ЕПС.

Ми припустили, що заміна джерела азотного живлення у середовищі культивування продуцента етаполану на еквімолярну за нітрогеном концентрацію  $KNO_3$ , асиміляція якого відбувається симпортом з протоном та супроводжується підлужненням культуральної рідини, дасть змогу уникнути надлишкового закислення середовища.

Таблиця 4.8.

**Синтез етаполану на суміші етанолу та олії залежно від режиму  
внесення субстратів і природи джерела азоту**

Джерело азоту при одержанні інокуляту та культивуванні	Режим дробного внесення етанолу (2,0 %) та олії (0,6 %)	рН	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г біомаси
$NH_4NO_3$	Без дробного внесення (контроль)	5,5	5,01±0,25	1,95±0,10
	Двічі порціями по 1,0 % етанолу і 0,3 % олії	5,6	8,02±0,40	1,81±0,09
	Тричі порціями по 0,65 % етанолу і 0,2 % олії	5,4	8,82±0,44	2,65±0,13
$KNO_3$	Без дробного внесення (контроль)	7,0	5,16±0,26	1,52±0,07
	Двічі порціями по 1,0 % етанолу і 0,3 % олії	6,8	9,45±0,47	2,06±0,10
	Тричі порціями по 0,65 % етанолу і 0,2 % олії	6,9	10,06±0,50	2,08±0,10

**Примітки:** Молярне співвідношення концентрації монособстратів у суміші – 1:0,056; Посівний матеріал вирощували на етанолі (0,5 %). Культивування здійснювали на модифікованому середовищі 3.

Дійсно, заміна джерела азоту з наступним дробним внесенням субстратів двічі та тричі (див. *табл. 4.8*) до кінцевої концентрації етанолу та олії 2,0 % і 0,6 % відповідно у процесі вирощування продуцента дозволила не тільки стабілізувати рН на оптимальному для синтезу рівні (6,8-6,9), але й супроводжувалася підвищенням кількості синтезованого етаполану та ЕПС-синтезувальної здатності до 9,5-10,0 г/л ЕПС та 2 г ЕПС/г біомаси відповідно.

Зазначимо, що згідно теоретичного виходу ЕПС від субстрату за даних концентрацій монособстратів у суміші спостерігали максимально можливий рівень етаполану (10 г/л).

Очевидно, що для подальшого підвищення концентрації ЕПС необхідно збільшувати вміст етанолу і олії у суміші, але при цьому підтримувати рН на оптимальному рівні. На нашу думку, досягти цього можна способом реалізованим раніше методом у процесі вирощування продуцента на суміші етанолу та глюкози [87]. За умов підвищення концентрації катіонів магнію у середовищі, які є активаторами індубельного ферменту ацетил-КоА, швидкість окиснення етанолу, ацетальдегіду і ацетату була практично однаковою.

Тому, ми припустили, що підвищення концентрації  $Mg^{2+}$  у середовищі культивування з 1,6 до 5 Мм з одночасним дробним внесенням суміші субстратів дозволить підвищити кінцеву концентрацію етанолу та олії до 4,0 % та 1,2 % відповідно зі збереженням оптимального для синтезу рівня рН.

Як видно з наведених у *табл. 4.9* даних, у процесі культивування продуцента етаполану на суміші етанолу (4,0 %) та олії (1,2 %) при дробному внесенні субстратів чотирма та п'ятьма порціями спостерігали підвищення кількості синтезованого ЕПС до 9,8-13,5 г/л. Збільшення концентрації  $Mg^{2+}$  практично не впливало на синтез полісахариду.

**Залежність синтезу етаполану на суміші етанолу та олії від  
концентрації  $Mg^{2+}$  у середовищі культивування**

<b>Концентрація <math>Mg^{2+}</math>, мМ</b>	<b>Режим дробного внесення субстратів</b>	<b>pH</b>	<b>ЕПС, г/л</b>	<b>ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г біомаси</b>
1,6	Двічі порціями по 1,0 %* етанолу і 0,3 % олії	6,1	8,79±0,44	2,68±0,13
	Тричі порціями по 0,65 % етанолу і 0,2 % олії*	6,3	7,87±0,39	2,29±0,11
	Чотирма порціями по 1,0 % етанолу і 0,3 % олії**	5,9	11,88±0,59	3,08±0,15
	П'ятьма порціями по 0,8 % етанолу і 0,24 % олії**	6,1	13,51±0,67	3,65±0,18
5,0	Двічі порціями по 1,0 % етанолу і 0,3 % олії*	6,3	8,45±0,42	2,50±0,13
	Тричі порціями по 0,65 % етанолу і 0,2 % олії*	6,6	5,63±0,28	1,52±0,08
	Чотирма порціями по 1,0 % етанолу і 0,3 % олії**	6,1	10,37±0,52	2,58±0,13
	П'ятьма порціями по 0,8 % етанолу і 0,24 % олії**	6,2	9,86±0,49	2,19±0,11

**Примітки:** \* - режим дробного внесення етанолу та олії до кінцевої концентрації 2,0 % + 0,6 %. \*\* - режим дробного внесення етанолу та олії до кінцевої концентрації 4,0 % + 1,2 %. Молярне співвідношення концентрації моносубстратів у суміші –1:0,056; Посівний матеріал вирощували на етанолі (0,5 %). Культивування здійснювали на модифікованому середовищі 4.

Оскільки у попередніх дослідженнях [3] продемонстровано ефективність використання змішаної відпрацьованої олії замість рафінованої, то на наступному етапі роботи досліджували можливість синтезу етаполана штамом ІМВ В-7005 на змішаній відпрацьованій олії у суміші з етанолом.

Експерименти показали, що використання суміші з пересмаженою олією при підвищенні катіонів магнію призводило до зростання кількості синтезованого ЕПС у 1,1-1,5 рази (табл. 4.10). При цьому максимальні показники синтезу (15,6-15,9 г ЕПС, 3,1-3,3 г ЕПС/ г біомаси) досягались при режимі культивування, який передбачає додаткове внесення чотирьох та п'ятьох порцій субстратів, що є у 1,2 рази вищим порівняно з використанням рафінованого субстрату. Ми припускаємо, що отримані результати можуть бути пов'язані з додатковим впливом катіонів магнію впливають на ферментативну активність процесу транспортування токсичних сполук, які утворюються при смаженні олії.

Таблиця 4.10.

**Синтез етаполану залежно від концентрації  $Mg^{2+}$  та типу соняшникової олії у середовищі культивування штаму ІМВ В-7005**

<b>Концентрація <math>Mg^{2+}</math>, мМ</b>	<b>Режим дробного внесення субстратів</b>	<b>pH</b>	<b>ЕПС, г/л</b>	<b>ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г біомаси</b>
1,6	Двічі порціями по 1,0 %* етанолу і 0,3 % олії	6,7	9,12±0,46	3,11±0,15
	Тричі порціями по 0,65 % етанолу і 0,2 % олії*	6,8	8,21±0,41	2,29±0,11
	Чотирма порціями по 1,0 % етанолу і 0,3 % олії**	6,2	12,02±0,60	3,24±0,16

	П'ятьма порціями по 0,8 % етанолу і 0,24 % олії**	6,1	10,10±0,50	2,73±0,14
	П'ятьма порціями по 0,8 % етанолу і 0,24 % олії (контроль)***	5,9	10,56±0,53	3,64±0,18
5,0	Двічі порціями по 1,0 % етанолу і 0,3 % олії*	6,0	8,78±0,44	3,31±0,17
	Тричі порціями по 0,65 % етанолу і 0,2 % олії*	6,3	9,80±0,49	3,68±0,18
	Чотирма порціями по 1,0 % етанолу і 0,3 % олії**	6,0	15,63±0,78	3,33±0,16
	П'ятьма порціями по 0,8 % етанолу і 0,24 % олії**	5,9	15,95±0,80	3,11±0,15

**Примітки:** \* - режим дробного внесення етанолу та відпрацьованої олії до кінцевої концентрації 2,0 % + 0,6 %. \*\* - режим дробного внесення етанолу та відпрацьованої олії до кінцевої концентрації 4,0 % + 1,2 %. \*\*\*- режим дробного внесення етанолу та рафінованої олії до кінцевої концентрації 4,0 % + 1,2 % (контроль). Молярне співвідношення концентрації монособстратів у суміші – 1:0,056; Посівний матеріал вирощували на етанолі (0,5 %). Культивування здійснювали на модифікованому середовищі 4.

Варто зазначити, що на сьогоднішній день у доступній літературі наявні вкрай обмежені відомості про синтез мікробних ЕПС на суміші субстратів разом з промисловими відходами, зокрема олієвмісними.

Так, Sengupta зі співавт. [88] показали можливість синтезу термостабільних ЕПС штамом *Ochrobactrum pseudintermedium* C1 на середовищах з відпрацьованими рослинними оліями (гірчична та пальмова) або суміші мінеральних олій (шпиндельні, гідравлічні, різальні та компресорні) у концентрації 5 % (об'ємна частка). Встановлено, що продуцент синтезував на середовищі з пальмовою олією 1082 мг/л, тоді як на мастильні оліві - 849 мг/л. ЕПС синтезовані на пальмовій олії

характеризувалися емульгувальною здатністю щодо сирової нафти (індекс емульгування ~ 45 %), дизелю (~ 37 %), гасу (~ 34 %) та н-гексадекану (~ 33 %).

У роботі [89] показана можливість синтезу ЕПС штамом *Pseudozyma* sp. SY16 на суміші глюкози (10 г/л) та різних типів олії (оливкова, соєва, пальмова, 50 %, об'ємна частка). Максимальна кількість полісахариду (5,9 г/л) досягалась за використання оливкової олії у суміші в глюкозою.

При вирощуванні штаму *X. campestris* ATCC 13951 [90] в середовищі зі стічними водами після виробництва рослинних олій (загальний вміст азоту 0,018 /л, фосфору – 0,0037 г/л) у суміші з глюкозою (30 г/л) концентрація ксантану становила 16,2 г/л. Варто зазначити, що біоконверсія джерела вуглецю у ксантан зменшується зі збільшенням концентрації глюкози. Так, при використанні 10 г/л субстрату, конверсія становить 81,8-88,9 %, тоді як збільшення кількості глюкози до 20,0 г/л та 30 г/л - 61,7 % та 51,9 % відповідно.

Nwosu зі співавт. [91] встановили можливість вирощування штаму *Shewanella chilikensis* WAS11 у середовищі, що містило 20 г/л картопляного лушпиння та 5 г/л шкірок насіння бобів. Попередньо картопляне лушпиння гідролізували 1 % сульфатною кислотою при температурі 121°C упродовж 40 хв, після чого фільтрували. Аналогічний підхід використовували для обробки насінневих шкірок бобів, однак замість кислоти використовували 0,5 М розчин сульфату калію. Показано, що максимальна концентрація полісахариду (38,14 г/л) досягалась при рН 5 після 144 год культивування.

У роботі авторами [92] показано можливість синтезу полісахариду ксантану *X. campestris* ATCC 15206 на суміші гідролізату жому (відхід цукрового виробництва) та лимонної кислоти. Перед використанням жому здійснювали його гідроліз 1 % HCl, після фільтрації рН доводили до 7,0 та стерилізували при 121 °С. Для культивування штаму одержаний розчин розбавляли до концентрації 2 % (за глюкозою). У середовище вносили 2,2–5

г/л лимонної кислоти як хелатуючий агент та додаткове джерело вуглецю. За додавання у середовище з гідролізатом жому 4,4 г/л лимонної кислоти штам АТСС 15206 синтезував 20,82 г/л ксантану

У праці [93] встановлено, що у процесі вирощування *L. mesenteroides* DSM 20343 на середовищі, що містило суміш соєвого борошна (або борошна фави) з сахарозою суттєво підвищувалася в'язкість культуральної рідини, що засвідчує підвищення рівня синтезу екзополісахаридів (глюкану та фруктану) порівняно з іншими метаболітами (манітол, молочна та оцтова кислота).

Ventorino зі співавт. [94] визначали залежність синтезу ЕПС штамом *A. chroococcum* 76А за різних концентрацій гідролізату цукрової тростини (1, 5, 10 % об'ємна частка) та сахарози (0,5-5 % об'ємна частка) у середовищі. Показано, що культивування штаму 76А за концентрації субстратів у суміші 1,0 % (гідролізат цукрової тростини) та 5,0 % (сахароза) дозволило отримати 25,3 мг ЕПС/30 мл середовища. Автори зазначають, що використання гідролізату цукрової тростини як моносубстрату супроводжувалось зниженням кількості ЕПС, що зумовлено наявністю в гідролізаті токсичних речовин (фурфурол, гідроксиметилфурфурол, бензальдегід та ванілін), які інгібують ферментативну активність продуцента.

Sellami зі співавт. [95] показали можливість синтезу ЕПС штамом *R. leguminosarum* АТСС 10004 за використання декількох типів стічних вод (після рибопереробки та нафтовидобування). Встановлено, що найвищі показники (кількість синтезованих ЕПС 42,2 г/л) досягались штамом АТСС 10004 на 96 год культивування за використання суміші стічних вод (50:50 об'ємна частка) у порівнянні з використання одного типу стічних вод (10-11 г/л ЕПС).

Castellanezi зі співавт. [96] встановили здатність штамів *R. tropici* MUTZC3 та SEMIA 4080 до синтезу 5,3-5,5 г/л ЕПС на суміші сахарози (3,0 % масова частка) та дизельного масла (1,0 % об'ємна частка). Дослідження властивостей синтезованих полісахаридів показало, що найвищу



емульгувальну здатність спостерігали у ЕПС штаму MUTZC3 щодо н-гексану (індекс емульгування 89,6 %) та парафінової олії (60,8 %).

Zohra зі співавт. [97] виділили зі зразків їжі штам *L. mesenteroides* X21 та встановили його здатність до синтезу 550 мг/мл декстрану на суміші 2,0 % сахарози (масова частка) та 5,0 % меляси (об'ємна частка). Автори зазначають, що підвищення концентрацій суміші субстратів супроводжувалось інгібуванням синтезу цільового продукту.

У роботі [98] встановлено можливість грибів *Pleurotus pulmonarius* до синтезу ЕПС на суміші глюкози та агропромислових відходів (шкірки ананасу, манго, шкарлупи арахісу та волоського горіху). Попередньо всі субстрати висушувались при температурі 29°C упродовж 21 дня та подрібнювались за допомогою фрезерної установки. Найбільша кількість ЕПС (5,6 г/л) спостерігалась за використання у суміші з глюкозою шкарлупи арахісу (20 г/л). Дослідники зазначають, що синтезовані ЕПС проявляють антимікробний ефект щодо широкого спектру грамполозитивних та грамнегативних бактерій, а також дріжджів. Так, мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) синтезованих ЕПС щодо *Shigella dysenteriae*, *S. typhi*, *S. aureus* (MRSA), *C. albicans* та *C. tropicalis* становила 0,25 мг/мл. МІК полісахаридів щодо *B. subtilis* становила 0,5 мг/мл, а для *E. coli* – 1,0 мг/мл.

Zarei зі співавт. [99] показали можливість синтезу пулулану штамом *A. pullulans* KY767024 на суміші меляси та кукурудзяного екстракту. Встановлено, що найвища кількість ЕПС (18,3 г/л) досягалась за концентрації меляси 165 г/л (концентрація цукрів ~ 81 г/л), а кукурудзяного екстракту – 43 мл/л за оптимального рН 5,3. Зазначимо, що синтезований пулулан характеризувався високим рівнем розчинності (78,8 %), однак отримане значення було нижчим ніж у комерційного пулулану (100 %). Автори зазначають, що отримана різниця у розчинності залежить від методів сушіння полісахариду. Дійсно, комерційний пулулан переважно сушать за допомогою сублімаційного сушіння, в той час як експериментально отриманий – у печі. У той же час показники гігроскопічності ЕПС не

показали збільшення ваги після тижневого зберігання полісахариду в насиченому розчині NaCl.

У роботі [100] показано можливість отримання курдлану штамом *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 за використання суміші сахарози (50 г/л) та соку підземної та нижньої частини спису спаржі (15 % об'ємна частка). Максимальна концентрація полісахариду на суміші субстратів становила 40,2 г/л після 168 год культивування. Зазначимо, що у результаті перерахунку синтезованого курдлану до асимільованої сахарози показано, що кількість сахарози необхідної для отримання 1,0 г ЕПС в контрольному середовищі (без соку спаржі) перевищує масу сахарози необхідної для синтезу 1,0 г курдлану у середовищі з відходом агро-промислового виробництва.

Інші дослідники [101] показали можливість отримання 23,2 г/л курдлану бактеріями *A. faecalis* на суміші сахарози (6,5 г/л), кукурудзяного екстракту (10 мл, об'ємна частка) та гідролізату апельсинових шкірок (загальний вміст цукрів 72,3 г/л). Варто зазначити, що апельсинова шкірка є цінним біотехнологічним ростовим субстратом, так як містить 78 % води, 35 % целюлози, 15 % пектину та 10 % розчинних цукрів. Однак, високий вологовміст шкірок може бути причиною мікробної контамінації субстрату при зберіганні, що збільшує витрати на заморожування та транспортування. Тому, попередньо апельсинові шкірки висушували при температурі 120 °C. Після цього шкірки гідролізували 2 % сульфатною кислотою при 121 °C упродовж 60 хв, проводили детоксикацію гідролізату апельсинової шкірки активованим вугіллям для видалення інгібіторів синтезу та фільтрували.

Нап зі співавт. [102] повідомили про можливість штаму *Sporidiobolus pararoseus* JD-2 до синтезу ЕПС (13,0 г/л) та ліпідів (41,6 г/л) у середовищі з глюкозою та кукурудзяним екстрактом (20 г/л). Оскільки, високі концентрації глюкози інгібують життєдіяльність продуцента внесення субстрату здійснювалось дробно. Так, початкова концентрація глюкози становила 80 г/л, після чого внесення здійснювалось починаючи з 16 год культивування кожні 12 год порціями по 30 г/л до кінцевої концентрації 230

г/л. Подальший аналіз хімічного складу ЕПС показав, що головними компонентами полісахариду є галактоза, глюкоза та маноза у молярному співвідношенні 16:8:1. Дослідники наголошують, що наведений моносахаридний склад з відсутністю уронових кислот зумовлює практичну цінність синтезованого ЕПС. Також, цікаво зазначити, що синтезовані ліпіди на 79 % склалися з ненасичених жирних кислот та містили 505 мг/кг ліпідів каротиноїдів (торулародин, торулен, g- каротин та b- каротин). Варто відмітити, що кількість основного типу каротиноїдів – торулену (294 мг/кг ліпідів ) була вищою ніж у ліпідах рослинного насіння.

У роботах [88-102] співвідношення концентрацій субстратів у суміші підбирали емпірично, що не завжди супроводжується встановленням оптимальних для біосинтезу ЕПС умов культивування продуцента. У той же час наші попередні дослідження [3, 4, 7, 79, 85] з інтенсифікації синтезу етаполану та результати даної роботи засвідчують доцільність попереднього проведення теоретичних розрахунків, які дозволяють зменшити обсяг експериментальних робіт та дають змогу практично точно встановити оптимальне співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші, що забезпечує максимальну біоконверсію джерел вуглецю у цільовий продукт.

У даній роботі з метою інтенсифікації синтезу етаполану на суміші енергетично надлишкових субстратів, по-перше, теоретично розраховували та експериментально встановили оптимальне молярне співвідношення концентрацій етанолу та олії у суміші (1:0,056), яке максимально наближене до теоретично розрахованого (1:0,076); по-друге, модифікували склад поживного середовища (замінили джерело азотного живлення на еквімолярну за азотом концентрацію  $KNO_3$  та збільшили концентрація катіонів магнію); по-третє, здійснювали дробне внесення субстратів. Загалом за таких умов культивування максимальна концентрація етаполану та ЕПС-синтезувальна здатність становила 15,9 г/л і 3,1 г ЕПС/г біомаси відповідно, що у 1,5 рази вище порівняно з показниками на середовищі 3 (10,5 г/л ЕПС, 3,3 г ЕПС/г біомаси, див. *табл. 4.10.*).

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що підвищення початкової концентрації ацетату натрію у суміші з рафінованою відпрацьованою олією з наступним дробним внесенням моносубстратів супроводжувалось підвищення рН культуральної рідини до неоптимального для синтезу етаполану рівня (8,0). Заміна останньої порції ацетату натрію у процесі дробного його внесення на еквімолярну за вуглецем кількість оцтової кислоти супроводжувалася підтриманням рН на рівні 7,0-7,5 і підвищенням концентрації синтезованого полісахариду у 1,25 рази (до 17,5 г/л).
2. Показано, що заміна рафінованої олії на змішану відпрацьовану у суміші з ацетатом для біосинтезу етаполану супроводжувалася підвищенням ЕПС-синтезувальної здатності у 1,13 рази.
3. Встановлено принципову можливість використання суміші енергетично надлишкових субстратів для синтезу етаполану, а також оптимальне молярне співвідношення етанолу та олії у суміші (1:0,056) при якому показники синтезу ЕПС є максимальними.
4. Показано, що заміна  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  у середовищі культивування на еквімолярну за нітрогеном концентрацію  $\text{KNO}_3$ , збільшення концентрації  $\text{Mg}^{2+}$  у середовищі культивування, зниження початкового вмісту етанолу та олії у суміші до 0,80 % та 0,24 % відповідно з наступним дробним внесенням до кінцевої концентрації 4,0 % етанолу і 1,2 % олії дало змогу запобігти надмірному закисленню культуральної рідини. За таких умов культивування (4,0 % етанолу і 1,2 % олії) спостерігали підвищення концентрації синтезованого етаполану і ЕПС-синтезувальної здатності до 15,6-15,9 г/л і 3,1-3,3 г ЕПС/г біомаси відповідно).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Mayara C. S. Barcelos, Kele A. C. Vespermann, Franciele M. Pelissari, Gustavo Molina.* Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critic. Rev. Food Sci Nutr.* 2019, 1-21.
2. *Shukla A., Mehta K., Parmar J., Pandya J., Saraf M.* Depicting the exemplary knowledge of microbial exopolysaccharides in a nutshell. *Europ. Pol. J.* 2019, 119, 298–310.
3. *Pirog T.P., Voronenko A.A., Ivakhniuk M.O.* Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan biosynthesis on mixture of molasses and sunflower oil. *Biotechnol. acta.* 2017, 10(4), 25–33.
4. *Вороненко А.А., Ярош М.Б., Пирог Т.П.* Особливості синтезу етаполану на суміші ацетату натрію та рафінованої соняшникової олії // *Харчова промисловість.* 2019, 25, 14-21.
5. *Пирог Т.П., Савчук О.М., Мучник Ф.В.* Інтенсифікація синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші ацетату і меляси // *Харчова промисловість.* 2010, 9, 52-54.
6. *Пирог Т.П. Гарбарчук С.О., Савчук О.М.* Вплив органічних кислот на синтез мікробного полісахариду етаполану на суміші C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів // *Харчова промисловість.* 2012, 13, 61–65.
7. *Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П.* Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. – К.: Наук. думка, 2010. – 327 с.
8. *Babel W., Müller R.H.* Mixed substrate utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics. *J. Gen. Microbiol.* 1985, 131(1), 39–45.
9. Global biofuel production 2010-24 vs. SDS biofuel consumption in 2025 and 2030: [Електронний ресурс] - <https://www.iea.org/tcep/transport/biofuels/> - режим доступу.
10. *Паламаренко Я.В.* Економічна ефективність діяльності сільськогосподарських кооперативів з виробництва біодизеля.

- Економіка і суспільство*. 2018, 17, 138-147. doi.org/10.32782/2524-0072/2018-17-20.
11. Wang Z, Wu J, Zhu L, Zhan X. Activation of glycerol metabolism in *Xanthomonas campestris* by adaptive evolution to produce a high-transparency and low-viscosity xanthan gum from glycerol. *Bioresour Technol*. 2016, 211, 390-7. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.096
  12. Wang Z., Wu J., Gao M., Zhu L., Zhan X. High production of xanthan gum by a glycerol tolerant strain *Xanthomonas Campestris* WXLB-006. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2017, 47(5), 468-472. doi: 10.1080/10826068.2017.1292288
  13. Liu Y., Gu Q., Ofosu F.K., Yu X. Production, structural characterization and gelforming property of a new exopolysaccharide produced by *Agrobacterium* HX1126 using glycerol or d-mannitol as substrate. *Carbohydr. Polym.* 2016, 20(136), 917-22. doi:10.1016/j.carbpol.2015.09.107
  14. Liu Y., Wang Z., Zhao J., Zong C., Liu M., Niu Y. Effects of glycerol concentrations on the bioproduction of PGHX by *Agrobacterium* HX1126. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2019, 49(6), 584-589. doi: 10.1080/10826068.2019.1591989
  15. Raghunandan K, Kumar A, Kumar S, Permaul K, Singh S. Production of gellan gum, an exopolysaccharide, from biodiesel-derived waste glycerol by *Sphingomonas spp.* *Biotech.* 2018, 8(1), 71. doi: 10.1007/s13205-018-1096-3
  16. Terán H.R., Orsi C.A., Ahmed M.A., Marcelino P.F. Low-melanin containing pullulan production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Aureobasidium pullulans* in fermentations assisted by light-emitting diode. *Bioresour Technol*. 2017, 230, 76-81. doi:10.1016/j.biortech.2017.01.052
  17. Terán H.R., Orsi C.A., Ahmed M.A., Lacerda T.M. Exopolysaccharide (Pullulan) production from sugarcane bagasse hydrolysate aiming to favor

- the development of biorefineries. *Int J Biol Macromol.* 2019, 127, 169-177. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.038
18. *Sugumaran K. R., Jothi P., Ponnusami V.* Bioconversion of industrial solid waste - cassava bagasse for pullulan production in solid state fermentation. *Carbohydr. Polym.* 2014, 99, 22–30. doi:10.1016/j.carbpol.2013.08.039
  19. Обзор ситуации на рынке креветки. : [Электронный ресурс] - <http://fishkamchatka.ru/articles/world/24744/> - режим доступа
  20. *de Sousa Costa L.A., Campos M.I., Druzian J.I., de Oliveira A.M., de Oliveira.* Biosynthesis of xanthan gum from fermenting shrimp shell: yield and apparent viscosity. *Int. J. Polym. Sci.* 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/273650>
  21. *Li P., Xie Y., Zeng Y., Hu W., Kang Y., Li X., Wang Y., Xie T., Zhang Y.* Bioconversion of welan gum from kitchen waste by a two-step enzymatic hydrolysis pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017, 183(3), 820-832. doi: 10.1007/s12010-017-2466-8
  22. *Rishi V., Sandhu A.K., Kaur A., Kaur J., Sharma S., Soni S.K.* Utilization of kitchen waste for production of pullulan to develop biodegradable plastic. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2020, 104(3), 1307-1317. doi: 10.1007/s00253-019-10167-9
  23. *Li P., Li T., Zeng Y., Li X., Jiang X., Wang Y., Zhang Y.* Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* LREL-1 using kitchen waste as the sole substrate. *Carbohydr. Polym.* 2016, 151, 684–691. doi:10.1016/j.carbpol.2016.06.017
  24. *Sirajunnisa A., Vijayagopal V., Viruthagiri T.* Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. *Turkish J. of Biol.* 2013, 37, 280–288. doi: 10.3906/biy-1206-50
  25. *Wang D., Ju X., Zhou D., Wei G.* Efficient production of pullulan using rice hull hydrolysate by adaptive laboratory evolution of *Aureobasidium*

- pullulans*. *Bioresour Technol.* 2014, 164, 9-12. doi: 10.1016/j.biortech.2014.04.036.
26. Monjazeб M.L., Abdolshahi A., Hedayati S., Sharifi-Rad M., Iriti M., Salehi B., Sharifi-Rad J. Pullulan gum production from low-quality fig syrup using *Aureobasidium pullulans*. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2018, 64(8), 22-26. PMID: 29981680.
27. Фінансовий директор Agrofusion: Смакові уподобання європейців будуть схилитися в бік продуктів з України/[Електронний ресурс] - <https://agravery.com/uk/posts/show/finansovij-direktor-agrofusion-smakovi-upodobanna-evropejci-v-bik-produktiv-z-ukraini> режим доступу
28. Antunes S., Freitas F., Sevrin C., Grandfils C., Reis M.A. Production of FucoPol by *Enterobacter* A47 using waste tomato paste by-product as sole carbon source. *Bioresour Technol.* 2017, 227, 66-73. doi: 10.1016/j.biortech.2016.12.018
29. Yoo M. J., Carius B. M. Mango dermatitis after urushiol sensitization. *Clin. Pract. Cases. Emerg. Med.* 2019, 3(4), 361-363. doi: 10.5811/cpcem.2019.6.43196.
30. Asgher M., Urooj Y., Qamar S. A., Khalid N. Improved exopolysaccharide production from *Bacillus licheniformis* MS3: Optimization and structural/functional characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 151, 984-992. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.094.
31. Ozdal, M., Kurbanoglu, E. B. Valorisation of chicken feathers for xanthan gum production using *Xanthomonas campestris* MO-03. *Genet. Eng. Biotechn.* 2018. doi:10.1016/j.jgeb.2018.07.005.
32. Mohsin A., Zhang K., Hu J., Salim-ur-Rehman Tariq M., Zaman W.Q., Guo M. Optimized biosynthesis of xanthan via effective valorization of orange peels using response surface methodology: A kinetic model approach. *Carbohydr. Polym.* 2018, 181, 793–800. doi:10.1016/j.carbpol.2017.11.076.



33. Урожай картоплі у 2019 році: [Електронний ресурс] - <http://agro-yug.com.ua/archives/31147> - режим доступу.
34. *Javed A., Ahmad A., Tahir A., Shabbir U., Nouman M., Hameed A.* Potato peel waste—its nutraceutical, industrial and biotechnological applications. *Agric. Food.* 2019, 4(3), 807–823. doi: 10.3934/agrfood.2019.3.807.
35. *da Silva A.S., dos Santos F.P., de Souza Abud A. K.* Xanthan gum production by semisolid and submerged processes using potato peel as substrate. *Braz. J. of Develop. Curitiba.* 2020, 6(5), 25202-25207.
36. *Rončević B.B., Puškaš B.Z., Miljić U., Dodić S., Grahovac J., Dodić J.* White wine production effluents used for biotechnological production of xanthan. *Process. Energy in Agric.* 2015, 19(1), 52-55.
37. *Rončević Z. Z., Bajić B. Z., Vučurović D. G., Dodić S. N., Grahovac J. A., Dodić J. M.* Xanthan production on wastewaters from wine industry. *Hem. Ind.* 2017, 71(2), 145–153.
38. *Pirog T.P., Voronenko A.A., Ivakhniuk M.O.* Non-traditional producers of microbial exopolysaccharides. *Biotechnol. Acta.* 2018, 11(4), 5-27. doi: 10.15407/biotech11.04.005.
39. *Moscovici M.* Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Front. Microbiol.* 2015, 6, 1012. doi: 10.3389/fmicb.2015.01012.
40. *de Clercq E., Li G.* Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016, 29(3), 695-747. doi: 10.1128/CMR.00102-15.
41. *Gugliandolo C., Spano A., Maugeri T.L., Poli A., Arena A., Nicolaus B.* Role of bacterial exopolysaccharides as agents in counteracting immune disorders induced by herpes virus. *Microorg.* 2015, 3(3), 464-483. doi: 10.3390/microorganisms3030464.
42. *Awady M.E., Eldin M.A.N., Ibrahim H.M., Bahnasy M.E., Aziz S.H.A.* *In vitro* evaluation of antioxidant, anticancer, and antiviral activities of

- exopolysaccharide from *Streptomyces hirsutus* NRC2018. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2019, 9(11), 10-18. doi: 10.7324/JAPS.2019.91102.
43. Kanauchi O., Andoh A., AbuBakar S., Yamamoto N. Probiotics and paraprobiotics in viral infection: clinical application and effects on the innate and acquired immune systems. *Curr Pharm Des.* 2018, 24(6), 710-717. doi: 10.2174/1381612824666180116163411.
44. Naumenko K., Biliavska L., Pankivska Y., Povnitsa O., Vasyliuk O., Garmasheva I., Zagorodnya S. Anti-herpetic activity exopolysaccharides produced by different species of lactic acid bacteria. *JAB.* 2019, 12, 2307-2315. doi: 10.24297/jab.v12i0.8058.
45. Biliavska L., Pankivska Y., Povnitsa O., Zagorodnya S. Antiviral activity of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of the genera *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* against human adenovirus type 5. *Medicina (Kaunas).* 2019, 55(9), 519. doi: 10.3390/medicina55090519.
46. Kim K., Lee G., Thanh H.D., Kim J.H., Konkitt M., Yoon S., Park M., Yang S., Park E., Kim W. Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 offers protection against rotavirus-induced diarrhea and regulates inflammatory response. *J. Dairy Sci.* 2018, 101(7), 5702-5712. doi: 10.3168/jds.2017-14151.
47. Kusmiati, Kukihi F.E, Afiati F. Exopolysaccharide (EPS) activity test of lactic acid bacteria (LAB) as immunomodulatory. *JITV.* 2016, 21(3), 182-189. doi: 10.14334/jitv.v21i3.1414.
48. Adebayo-Tayo B., Fashogbon R. *In vitro* antioxidant, antibacterial, *in vivo* immunomodulatory, antitumor and hematological potential of exopolysaccharide produced by wild type and mutant *Lactobacillus delbureckii* subsp. *bulgaricus*. *Heliyon.* 2020, 6(2), 32-68. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e03268.
49. Xiu L., Zhang H., Hu Z., Liang Y., Guo S., Yang M., Du R., Wang X. Immunostimulatory activity of exopolysaccharides from probiotic

- Lactobacillus casei* WXD030 strain as a novel adjuvant *in vitro* and *in vivo*. *Food Agr. Immunol.* 2018, 29(1), 1086-1105, doi: 10.1080/09540105.2018.1513994.
50. Garcia-Castillo V., Marcial G., Albarracín L., Tomokiyo M., Clua P., Takahashi H., Kitazawa H., Garcia-Cancino A., Villena J. The exopolysaccharide of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C is partially involved in its immunomodulatory effect and its ability to improve the resistance against *Helicobacter pylori* infection. *Microorg.* 2020, 8(4), 479. doi: 10.3390/microorganisms8040479.
51. You X., Li Z., Ma K., Zhang C., Chen X., Wang G., Yang L., Dong M., Rui X., Zhang Q., Li W. Structural characterization and immunomodulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* LZ-R-5. *Carbohydr. Polym.* 2020, 235. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.115977.
52. Kook S.-Y., Lee Y., Jeong E.-C., Kim S. Immunomodulatory effects of exopolysaccharides produced by *Bacillus licheniformis* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Korean kimchi. *J. Funct. Foods.* 2019, 54, 211-219. doi: 10.1016/j.jff.2019.01.003.
53. Jiang P., Li J., Han F., Duan G., Lu X., Gu Y., Yu W. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS One.* 2011, 6(4). doi: 10.1371/journal.pone.0018514.
54. Liu Z., Zhang Z., Qiu L., Zhang F., Xu X., Wei H., Tao X. Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *J. Dairy Sci.* 2017, 100(9), 6895-6905. doi: 10.3168/jds.2016-11944.
55. Mahdhi A., Leban N., Chakroun I., Chaouch M.A., Hafsa J., Fdhila K., Mahdouani K., Majdoub H. Extracellular polysaccharide derived from potential probiotic strain with antioxidant and antibacterial activities as a prebiotic agent to control pathogenic bacterial biofilm formation. *Microb. Pathog.* 2017, 109, 214-220. doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.046.

56. Xu X., Peng Q., Zhang Y., Tian D., Zhang P., Huang Y., Ma L., Qiao Y., Shi B. A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties *in vitro*. *Food. Nutr. Res.* 2020, 64, 3744 doi: 10.29219/fnr.v64.3744.
57. Mahdhi A., Leban N., Chakroun I., Bayar S., Mahdouani K., Majdoub H., Kouidhi B. Use of extracellular polysaccharides, secreted by *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* spp., as reducing indole production agents to control biofilm formation and efflux pumps inhibitor in *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 2018, 125, 448-453. doi: 10.1016/j.micpath.2018.10.010.
58. Kumar M.A., Divya S., Oscar F.L., Thajuddin N., Nithya C. Cyanobacterial exopolysaccharides: a potent antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa*. *IJRAR.* 2018, 5(4), 31-38.
59. Abinaya M., Vaseeharan B., Divya M., Sharmili A., Govindarajan M., Alharbi N.S., Kadaikunnan S., Khaled J.M., Benelli G. Bacterial exopolysaccharide (EPS)-coated ZnO nanoparticles showed high antibiofilm activity and larvicidal toxicity against malaria and Zika virus vectors. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2018, 45, 93-103. doi: 10.1016/j.jtemb.2017.10.002.
60. Wu S., Liu G., Jin W., Xiu P., Sun C. Antibiofilm and anti-infection of a marine bacterial exopolysaccharide against *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 102. doi: 10.3389/fmicb.2016.00102.
61. Li W., Ji J., Tang W., Rui X., Chen X., Jiang M., Dong M. Characterization of an antiproliferative exopolysaccharide (LHEPS-2) from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *Carbohydr. Polym.* 2014, 105, 334-340. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.01.093.
62. Tukenmez U., Aktas B., Aslim B., Yavuz S. The relationship between the structural characteristics of lactobacilli-EPS and its ability to induce apoptosis in colon cancer cells *in vitro*. *Sci. Rep.* 2019, 9(1), 82-68. doi: 10.1038/s41598-019-44753-8.

63. Rajoka M.S.R., Mehwish H.M., Fang H., Padhiar A.A., Zeng X., Khurshid M., Zhao L. Characterization and anti-tumor activity of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefir* isolated from Chinese kefir grains. *J. Func. Foods*. 2019, 63. doi:10.1016/j.jff.2019.103588.
64. Mojibi P., Tafvizi F., Bikhof Torbati M. Cell-bound exopolysaccharide extract from indigenous probiotic bacteria induce apoptosis in HT-29 cell-line. *Iran. J. Pathol*. 2019, 14(1), 41-51. doi: 10.30699/IJP.14.1.41.
65. Nguyen D.T.A., Nguyen T.H.K. Detection on antioxidant and cytotoxicity activities of exopolysaccharides isolated in plant-originated *Lactococcus lactis*. *Biomed. Pharmacol. J*. 2014, 7(1), 33-38. doi: 10.13005/bpj/449.
66. Zhang H., Wang X., Li R., Sun X., Sun S., Li Q., Xu C. Preparation and bioactivity of exopolysaccharide from an endophytic fungus *Chaetomium* sp. of the medicinal plant *Gynostemma pentaphylla*. *Pharmacogn. Mag*. 2017, 13(51), 477-482. doi: 10.4103/0973-1296.211033.
67. Pan F., Hou K., Li D.D., Su T.J., Wu W. Exopolysaccharides from the fungal endophytic *Fusarium* sp. A14 isolated from *Fritillaria unibracteata* Hsiao et KC Hsia and their antioxidant and antiproliferation effects. *J. Biosci. Bioeng*. 2019, 127(2), 231-240. doi: 10.1016/j.jbiosc.2018.07.023.
68. Trabelsi L., Chaieb O., Mnari A., Abid-Essafi S., Aleya L. Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella* sp. *BMC Complement. Altern. Med*. 2016, 16, 210. doi: 10.1186/s12906-016-1198-6.
69. Kamble P., Cheriyaundath S., Lopus M., Sirisha V.L. Chemical characteristics, antioxidant and anticancer potential of sulfated polysaccharides from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol*. 2018, 30, 1641-1653. doi: 10.1007/s10811-018 -1397-2.
70. Wu Y., Jia X., Huang D., Zheng J., Hu Z., Xu C. Production, structural characterization, and antiproliferative activity of exopolysaccharide

- produced by *Scleroderma areolatum* Ehrenb with different carbon source. *Braz. J. Microbiol.* 2019, 50(3), 625-632. doi: 10.1007/s42770-019-00071-9.
71. Mahgoub A.M., Mahmoud M.G., Selim M.S., Awady M.E. Exopolysaccharide from marine *Bacillus velezensis* MHM3 induces apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells through a mitochondrial pathway. *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* 2018, 19(7), 1957-1963. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.7.1957.
72. Insulkar P., Kerkar S., Lele S.S. Purification and structural-functional characterization of an exopolysaccharide from *Bacillus licheniformis* PASS26 with in-vitro antitumor and wound healing activities. *Int. J. Biol Macromol.* 2018, 120, 1441-1450. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.147.
73. Ratledge C. Biodegradation of oils, fats and fatty acids. In: Biochem. microbial degradation / C. Ratledge — Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994, 590.
74. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: «Высшая школа», 1990. – 352 с.
75. Pirog T.P., Voronenko A.A., Yarosh M.B. Production of exopolysaccharide ethapolan under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on the mixture of acetate and sunflower oil. *Biotechnol. acta.* 2020, 13(4), 71-81.
76. Araujo J., Celis Ariza O.J., De Lima L. A study on production of biodiesel from waste frying oil. *Chem. Engineer. Trans.* 2019, 74, 157-162 doi:10.3303/CET1974027.
77. Panadare D.C., Rathod V.K. Applications of waste cooking oil other than biodiesel: a review // *Iran. J. Chem. Eng.* 2015, 12(3), 55–76.
78. Zhang Q., Saleh A.S., Chen J., Shen Q. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: a review. *Chem. Phys. Lipids.* 2012, 165(6), 662-681.
79. Brühl L. Fatty acid alterations in oils and fats during heating and frying. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2014. 116(6), 707-715.

80. Вороненко А.А. Івахнюк М.О., Пирог Т.П. Синтез екзополісахариду етаполану на суміші меляси та соняшникової олії залежно від способу підготовки меляси // *Наукові праці НУХТ*. 2019, 25(3), С. 42–48.
81. Petrovici A.R., Rosca I., Dodi G., Nicolescu A., Avadanei M., Varganici C.D., Ciolacu D. Effects of culture medium composition on biosynthesis of exopolysaccharide. *Cellulose Chem. Technol.* 2017, 51 (9-10), 821-830.
82. An C., Ma S., Chang F., Xue W. Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose. *Braz. J. Microbiol.* 2017, 48(1), 180-185. doi: 10.1016/j.bjm.2016.11.001.
83. Maalej H., Hmidet N., Boisset C., Buon L., Heyraud A., Nasri M. Optimization of exopolysaccharide production from *Pseudomonas stutzeri* AS22 and examination of its metal-binding abilities. *J. Appl. Microbiol.* 2015, 118 (2), 356-67. doi: 10.1111/jam.12688.
84. Trabelsi L., Ben Ouada H., Zili F., Mazhoud N., Ammar J. Evaluation of *Arthrospira platensis* extracellular polymeric substances production in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2013, 58 (1), 39-45. doi: 10.1007/s12223-012-0170-1.
85. Yu H. Effect of mixed carbon substrate on exopolysaccharide production of cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* in mixotrophic cultures. *J. Appl. Phycol.* 2012, 24, 669–673. doi: 10.1007/s10811-011-9684-1.
86. Пирог Т.П., Корж Ю.В. Етаполан — мікробний екзополісахарид мультифункціонального призначення // *Біополімери і клітина*. 2006. 22(3), С. 171-185.
87. Пирог Т. П., Лащук Н.В., Корж Ю.В. Регуляція С<sub>2</sub>-метаболізму в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на суміші етанолу і глюкози // *Мікроб. ж.* 2006. 68(1), С. 21-32.
88. Sengupta B., Datta S., Biswas D. Exploring two contrasting surface-active exopolysaccharides from a single strain of *Ochrobactrum*

- utilizing different hydrocarbon substrates. *J Basic Microbiol.* 2019. doi: 10.1002/jobm.201900080.
89. Kim, K. N., Lee, Y. J., Cho, D.-H., Ahn, K.-H., Hong, J.-E., Park, Y.-I., Kim, H.-S. A novel galactoglucomannan exopolysaccharide produced by oil fermentation with *Pseudozyma* sp. SY16. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2020. doi:10.1007/s12257-020-0066-x
90. Bojana Ž. B., Damjan G.V., Siniša N. D., Zorana Z. R., Jovana A. G., Jelena M. D. The biotechnological production of xanthan on vegetable oil industry wastewaters. Part i: modelling and optimization. *Chem. Ind. Chem. Eng.* 2017, 23(3), 329–339. [doi.org/10.2298/ciceq160430048b](https://doi.org/10.2298/ciceq160430048b)
91. Nwosu I.G., Abu G.O., Agwa, K.O. Production of microbial exopolysaccharide by cost-effective medium optimization method. *J Adv. Microbiol.* 2019, 19(2), 1-13. <https://doi.org/10.9734/jamb/2019/v19i230189>
92. Gowdhaman D., Padmapriya S., Ponnusami V. Effect of citric acid inducer on xanthan gum production from cassava bagasse, a potential agro-industry waste. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 2013, 4(3), 370–374.
93. Xu Y., Coda R., Shi Q., Tuomainen P., Katina K., Tenkanen M. Exopolysaccharides production during the fermentation of soybean and fava bean flours by *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20343. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65(13), 2805–2815. doi: 10.1021/acs.jafc.6b05495.
94. Ventorino V., Nicolaus B., Di Donato P., Pagliano G., Poli A., Robertiello A. Bioprospecting of exopolysaccharide-producing bacteria from different natural ecosystems for biopolymer synthesis from vinasse. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2019, 6(1). doi:10.1186/s40538-019-0154-3
95. Sellami M., Oszako T., Miled N., Rebah F.B. Industrial wastewater as raw material for exopolysaccharide production by *Rhizobium leguminosarum*. *Braz. J. Microbiol.* 2015, 46(2), 407-413.
96. Castellane T.C.L., Campanharo J.C., Colnago L.A., Coutinho I.D., Lopes É. M., Lemos, M.V.F., de Macedo Lemos E.G. Characterization of



- new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, 96, 361–369. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.11.123
97. Rashida R.Z., Sana W., Ayesha A., Ayesha S., Syeda K. K., Raheela R. Z. Dextran production by microbial biotransformation of sugarcane waste. *FJB.* 2019, 9(1), 87-94.
98. Clement O.O., Adaeze M.U., Temilayo L.-L., Oluwakemi A.T., Oluwatoyin Modupe A., Olu M. Bioactivity assessment of exopolysaccharides produced by *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture with different agro-waste residues. *Heliyon.* 2020, 6. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05685>.
99. Zarei S., Khodaiyan F., Hosseini S.S., Kennedy J.F. Pullulan production using molasses and corn steep liquor as agroindustrial wastes: physiochemical, thermal and rheological properties. *Appl Food Biotechnol.* 2020, 7(4), 263-272. <http://dx.doi.org/10.22037/afb.v7i4.29747>.
100. Anane R.F., Sun H., Zhao L., Wang L., Lin C., Mao, Z. Improved curdlan production with discarded bottom parts of *Asparagus spear*. *Microb. Cell Fact.* 2017, 16(1). doi:10.1186/s12934-017-0671-3.
101. Mohsin A., Sun J., Khan I. M., Hang H., Tariq M., Tian X., Guo M. Sustainable biosynthesis of curdlan from orange waste by using *Alcaligenes faecalis*: A systematically modeled approach. *Carbohydr. Polym.* 2018. doi:10.1016/j.carbpol.2018.10.047.
102. Han M., Xu J.-Z., Liu Z.-M., Qian H., Zhang W.-G. Co-production of microbial oil and exopolysaccharide by the oleaginous yeast *Sporidiobolus pararoseus* grown in fed-batch culture. *RSC Advances.* 2018, 8(6), 3348–3356. doi:10.1039/c7ra12813d.

## ДОДАТКИ (перелік публікацій та нагород)

### Нагороди:

1. Переможець Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт з природничих, технічних і гуманітарних наук за галуззю знань «Екологія». (Диплом II ступеня – 2020 р.).

### Статті у журналах:

1. *Pirog T.P., Voronenko A.A., Yarosh M.B.* Production of exopolysaccharide etharolan under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on the mixture of acetate and sunflower oil. *Biotechnol. acta.* 2020, 13(4), 71-81.
2. *Ярош М.Б., Пирог Т.П., Скроцька О.І.* Біологічна активність мікробних полісахаридів // Наукові праці НУХТ. – 2020. – Т. 26, № 6. – С. 44-55.
3. *Вороненко А.А., Ярош М.Б., Пирог Т.П.* Біоконверсія відпрацьованої олії в мікробний екзополісахарид етаполан для природоохоронних технологій // Наукові праці НУХТ. – 2020. – Т. 26, № 4. – С.37-46.

### Тези у збірниках міжнародних конференцій за межами України:

1. *Вороненко А.А., Ярош М.Б., Пирог Т.П.* Биосинтез микробного экзополисахарида этаполана на смеси ацетата натрия и рафинированного подсолнечного масла / Сборник тезисов международной научной конференции молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии» (г. Алматы, Республика Казахстан, 28-29 ноября, 2019 г.). – С. 75.
2. *Ярош М.Б., Вороненко А.А., Пирог Т.П.* Интенсификация микробного экзополисахарида этаполана на смеси этанола и подсолнечного масла / Сборник тезисов Республиканской научной конференции «Современные проблемы генетики, геномики и биотехнологии» (Ташкент, 12 августа 2020 г.). – С. 286-288.
3. *Voronenko A.A., Yarosh M.B., Pirog T.P.* Processing of the mixture of fried sunflower oil and acetate into the microbial exopolysaccharide etharolan / Сборник тезисов X Международной научной конференции молодых

учених, студентів, магістрантів и аспірантів «Actual environmental problems» (19-20 ноября 2020 г., г. Минск, Республика Беларусь). – С. 203-204.

### **Тези у збірниках міжнародних конференцій в Україні:**

1. *Вороненко А.А., Ярош М.Б., Пирог Т.П.* Оптимізація синтезу екзополісахариду етаполану на суміші ацетату натрію та рафінованої соняшникової олії / Матеріали VIII Міжнародної науково-практичної онлайн конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (15 листопада 2019 року, м. Київ). – С. 69-70.
2. *Ярош М.Б., Вороненко А.А., Пирог Т.П.* Вплив дробного внесення субстратів на синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші ацетату та олії / Збірник тез доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 27–29 квітня 2020 р.). – С. 88-89. **Сертифікат за успішну постерну доповідь.**
3. *Ярош М.Б., Вороненко А.А., Пирог Т.П.* Биосинтез мікробного екзополісахарида етаполана на смеси энергетически избыточных субстратов / Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Перспективні матеріали та інноваційні технології: біотехнологія, прикладна хімія та екологія» (м. Київ, 14-15 травня 2020 р.). – С. 41.
4. *Вороненко А.А., Ярош М.Б., Пирог Т.П.* Биоконверсия смеси отработанного подсолнечного масла и мелассы в микробный экзополісахарид етаполан / VI Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні питання розвитку біології та екології» (21-22 жовтня 2020 р., м. Вінниця). – С. 53-54.
5. *Ярош М.Б., Вороненко А.А., Пирог Т.П.* Біосинтез мікробного екзополісахариду етаполану насуміші етанолу та соняшникової олії / Матеріали V Міжнародної науково-практичної інтернет – конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських

препаратів різної направленості дії» (м. Харків, 26 листопада 2020 р.). – С. 532-533.

### **Тези у збірниках Всеукраїнських конференцій:**

1. *Voronenko A.A., Yarosh M.B., Pirog T.P.* Prospects of microbial exopolysaccharide ethapolan production on the mixture of molasses and mixed waste oil / Збірник наукових праць «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології». Випуск 6 (м. Харків, 7-8 листопада 2019 р.). –С. 42-43.
2. *Ярош М.Б., Вороненко А.А., Пирог Т.П.* Інтенсифікація синтезу екзополісахариду етаполану на суміші ацетату натрію та соняшникової олії / Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Майбутній науковець-2019» ( м. Сєверодонецьк 12 грудня 2019 р.). - С. 33.
3. *Ярош М.Б., Вороненко А.А., Пирог Т.П.* Біоконверсія відпрацьованої олії в мікробний полісахарид етаполан для природоохоронних технологій / Матеріали науково-практичної конференції Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт зі спеціальності «Екологія» м. Полтава (18-20 березня 2020 року). – С. 71.
4. *Вороненко А.А., Ярош М.Б., Пирог Т.П.* Використання суміші енергетично надлишкових субстратів для синтезу етаполану / Матеріали XIV Всеукраїнської науковопрактичної конференції «Біотехнологія XXI століття» (м. Київ, 20 травня 2020 р.). – С. 21.
5. *Вороненко А.А., Ярош М.Б., Пирог Т.П.* Біохімічні особливості синтезу мікробного полісахариду етаполану на суміші енергетично надлишкових субстратів / Матеріали XXII Всеукраїнської наукової конференції молодих учених м. Черкаси (23 – 24 квітня 2020 р.). – С. 441-443.
6. *Ярош М.Б., Вороненко А.А., Пирог Т.П.* Вплив дробного внесення субстратів на синтез мікробного екзополісахариду етаполану на суміші етанолу та олії / Всеукраїнська науково-практична конференція

«Майбутній науковець – 2020» (м. Сєверодонецьк, 4 грудня 2020 року).  
– С. 36-37.

**Тези у збірниках студентських конференцій НУХТ:**

1. *Ярош М.Б., Вороненко А.А., Пирог Т.П.* Визначення оптимального молярного співвідношення концентрацій ацетату та соняшникової олії у суміші для синтезу етаполану / Програма та тези матеріалів ІХ-ї Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті Євроінтеграції». (НУХТ, 10-11 листопада, 2020 р.) - С. 27-28.
2. *Ярош М.Б., Вороненко А.А., Пирог Т.П.* Використання суміші ацетату натрію та рафінованої соняшникової олії для одержання мікробного езополісахариду етаполану / Збірник тез VIII Міжнародної науково-технічної конференції «Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції» (5-6 листопада 2019 р.), м. Київ. – К.: НУХТ, 2019. – С. 64-66.
3. *Вороненко А.А., Ярош М.Б., Пирог Т.П.* Особливості синтезу етаполану на суміші ацетату та олії при дробному внесенні субстратів / Матеріали 86 Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті", 2–3 квітня 2020 р. – Київ: НУХТ. – Ч.1. – С.374.