

## Етаполан — мікробний екзополісахарид мультифункціонального призначення

Т. П. Пирог, Ю. В. Корж

Інститут мікробіології і вірусології НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

tapirog@usuft.kiev.ua, Korzh@serv.imv.kiev.ua

---

*Підсумовано опубліковані експериментальні дані стосовно інтенсифікації синтезу, регуляції фізико-хімічних властивостей і практичного використання мікробного екзополісахариду (ЕПС) етаполану (продуцент — *Acinetobacter* sp. B-7005). Наведено характеристики етаполану і штаму продуцента, аналіз розроблених технологій біосинтезу цього ЕПС на різних вуглецевих субстратах (у тому числі і на суміші ростових C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-сполук), переваги етаполану порівняно з відомими ЕПС, а також нові підходи до регуляції синтезу і властивостей етаполану.*

---

*Ключові слова: екзополісахариди, етаполан, інтенсифікація синтезу, регуляція метаболізму, фізико-хімічні властивості, суміш ростових субстратів, біосинтез.*

---

Мікробні полісахариди широко застосовуються в біотехнології, нафтовидобуванні, харчовій, хімічній промисловостях та як речовини, що в низьких концентраціях здатні змінювати реологічні характеристики водних систем.

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

В Інституті мікробіології і вірусології НАН України селекціоновано штам бактерій *Acinetobacter* sp. — продуцент комплексного полісахарид-

ного препарату етаполану. Цей біополімер завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям можна розглядати як полісахарид мультифункціонального призначення.

**Характеристика продуцента етаполану.** Штам *Acinetobacter* sp. депоновано в Українській колекції мікроорганізмів під номером B-7005. Штам виділено з ЕПС-утворювальної накопичувальної культури, отриманої внаслідок декількох послідовних пересівів зразка активного мулу станції біологічного очищення стічних вод Надворнянського нафтопереробного заводу (Україна) на мінеральному середовищі з етанолом [1, 2].

Дослідження морфолого-культуральних ознак даного штаму показало, що в експоненційній фазі росту клітини паличкоподібні (товсті короткі палички), у стаціонарній — кокоподібні, розташовані парами (диплоформи) або невеликими ланцюжками. Клітини розміром (0,95—1,5) × (1,2—2,0) мкм,

спор не утворюють. Розмноження клітин відбувається бінарним поділом. Клітини грамнегативні, нерухливі. На агаризованому суцільному середовищі утворюють гладенькі блискучі слизоподібні колонії кремового кольору. Розмір трьохдобової колонії складає 4—5 мм. На агаризованому мінеральному середовищі з ацетатом, етанолом або сахарозою колонії блискучі, мукоїдні, розміром 1—2 мм; на м'ясопептонному агарі — гладенькі, білі, опуклі, мукоїдні, розміром 3 мм. При культивуванні на рідких середовищах клітинна популяція утворює в'язку гомогенну суспензію. Штам є облигатним аеробом, каталазопозитивним і оксидазонегативним. Росте на складних органічних середовищах, при рості на мінеральному середовищі з етанолом без внесення факторів росту в культуральній рідині накопичується ацетат [2].

Продуцент етаполану — природний ауксотроф, який для росту потребує пантотенову кислоту та неідентифікований ростовий фактор, що міститься у дріжджовому автолізаті [2].

*Таксономічний статус продуцента етаполану.* На основі досліджень морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознак, проведених у 80-х роках минулого століття, продуцент етаполану було віднесено до роду *Acinetobacter*. Згідно з 9-м виданням Визначника Бергі [3], усі штами бактерій роду *Acinetobacter* є представниками одного виду *Acinetobacter calcoaceticus*. У зв'язку з тим, що за деякими ознаками досліджуваний штам відрізнявся від *A. calcoaceticus*, його було ідентифіковано як *Acinetobacter* sp. [1].

Слід зазначити, що після виходу в світ вищезгаданого видання із систематики бактерій описано кілька десятків видів роду *Acinetobacter* [4], однак продуцент етаполану відрізнявся від них також. Великий обсяг інформації щодо властивостей штаму В-7005 зумовив необхідність уточнення його таксономічного статусу. Тому було здійснено низку молекулярно-біологічних досліджень цього штаму, зокрема, аналіз 16S рРНК. Секвенування гена 16S рРНК показало, що штам В-7005 є найбільш наближеним до представників родів *Rhodobacter* і *Paracoccus* [5].

Так, штам *Acinetobacter* sp. В-7005 об'єднується в єдиний кластер з фотосинтезувальним штамом *Rhodobacter capsulatus* ATCC 11166 (D16428) з відносно невисоким коефіцієнтом подібності — 95,7 %. Штам *Acinetobacter* sp. В7005 також близький до фотосинтезувальних бактерій *Rhodobacter*

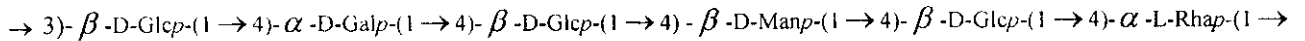
*massiliae* та *R. sphaeroides* (рівень подібності 94,6—94,3 %) та нефотосинтезувальної бактерії *Paracoccus* (рівень подібності 95,2—95,0 %). Враховуючи одержані результати, було порівняно нуклеотидні послідовності генів 16S рРНК декількох штамів *R. capsulatus* і *Paracoccus denitrificans* за допомогою програми ClustalX (версія 1.81).

Виявлено, що відмінності між генами 16S рРНК цих видів знаходяться в таких позиціях: 36 незбіжних нуклеотидів розподілені практично рівномірно в різних локусах гена 16S рРНК та 26 незбіжних нуклеотидів сконцентровані в одному з фрагментів гена 16S рРНК (відповідає позиціям нуклеотидів від 935 до 980). У цьому ж фрагменті ген 16S рРНК *Acinetobacter* sp. В-7005 практично повністю ідентичний *R. capsulatus*. Разом з тим в інших позиціях (де є 36 незбіжних нуклеотидів у *R. capsulatus* і *P. denitrificans*) ген 16S рРНК штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 ідентичний *P. denitrificans*. У цій роботі назву штаму наведено згідно з документами про його депонування в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України (*Acinetobacter* sp. В-7005), оскільки зазначені розбіжності нуклеотидів у різних фрагментах гена 16S рРНК не дали змоги ідентифікувати штам В-7005 як представник роду *Rhodobacter* або *Paracoccus*.

*Характеристика препарату мікробного екзополісахариду етаполану.* Комплексний полісахаридний препарат етаполан складається з нейтрального і кислого полісахаридів [2, 6—8]. Нейтральний полісахарид, до складу якого входять глюкоза, маноза, галактоза (3:2:1), є міноним компонентом — його вміст не перевищує 5—6 %. За даними газово-рідинної хроматографії, у складі кислого ЕПС виявлено залишки глюкози, манози, галактози і рамнози у молярному співвідношенні 3:2:1:1. У кислому ЕПС встановлено наявність уронових і піровиноградної (ПВК) кислот.

У процесі лужної обробки кислого ЕПС виділено суміш жирних кислот, основними компонентами якої були додеканова, гексадеканова, гексадеценна, октадеканова та *цис*-октадеценна кислоти у співвідношенні 10:29:12:7:20 [1, 8]. Слід зазначити, що наявність жирних кислот, які етерифікують вуглеводний ланцюг, не є характерною для мікробних ЕПС.

У складі кислого ЕПС виявлено 40—50 % вуглеводів, білка не визначено, що підтверджено як негативними реакціями Лоурі і Бредфорд, так і



даними  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопії. У спектрах  $^{13}\text{C}$ -ЯМР цього ЕПС відсутні сигнали з хімічним зсувом 55—57 м. д., характерні для С-N-зв'язку [9]. Кислий ЕПС містить також 20—30 % мінеральних компонентів [8, 10].

Встановлено, що залежно від природи використаного джерела вуглецю і концентрації катіонів калію в середовищі культивування *Acinetobacter* sp. В-7005 вміст в ЕПС залишків ПВК варіює (у % до маси умовно сухої речовини) від 3,0 до 4,3; урнових кислот — від 15,3 до 22,5; жирних кислот — від 1,8 до 6,5 [2, 8, 11].

Нашими наступними дослідженнями показано, що кислий компонент етаполану складається з ацильованого (АП) і неацильованого (НАП) полісахаридів [7]. Для цього було розроблено простий спосіб препаративного розділення ЕПС на ацильований і неацильований компоненти, оснований на емульгувальних властивостях розчинів ацильованих ЕПС [7].

Необхідність розробки такого способу зумовлювалась тим, що методи розділення полісахаридів, один з яких містить жирні кислоти, були невідомими. Існуючі на той час підходи дозволяли розділити полісахариди на компоненти різної молекулярної маси (наприклад, методи гель-хроматографії [12] і градієнтного центрифугування [13]); фракціонувати кислий і нейтральний полісахариди (на аніонітах целюлози — ДЕАЕ і ЕКТЕОЛА або при обробці бромистим цетилтриметиламонієм [14—16]). Відомим на той час методом розділення сполук, одна з яких має гідрофобну частину, було фракціонування на колонці з гідрофобними носіями, однак застосування його для препаративного розділення ЕПС обмежене часом і трудомісткістю.

Емульгування вуглеводню в розчині ЕПС використали автори роботи [17] при виділенні з культуральної рідини ацильованого полісахариду емульсану, синтезованого *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. Наші експерименти показали, що даний підхід можна з успіхом застосувати і для розділення полісахаридів, один з яких містить залишки жирних кислот.

Порівняльний аналіз хімічного складу сумарного ЕПС і виділеного з нього АП і НАП продемонстрував, що вони ідентичні за молярним співвідношенням D-глюкози, D-манози, D-галактози, L-рамнози, D-глюкуронової та піровиноградної кислот (3:2:1:1:1). Відмінності між цими полісахаридами полягають в тому, що ацильований ЕПС містить жирні кислоти (C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>) [7, 18, 19].

На основі хімічних модифікацій ЕПС, сольволізу ЕПС безводним фтористим воднем, деградації за Смітом,  $^1\text{H}$ - і  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопії встановлено однакову структуру повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга неацильованого полісахариду і ацильованого ЕПС після вилучення жирних кислот [19] (схема).

Стійкість глюкози і галактози при деградації за Смітом дала змогу припустити, що принаймні ці два моносахаридних залишки є ацильованими, однак точне місце О-ацилювання АП однозначно встановити не вдалося [19].

Аналіз реологічних властивостей розчинів нативного і дезацильованого етаполану показав, що розчини дезацильованих ЕПС не структуруються катіонами, їхня в'язкість не підвищується при низьких швидкостях зсуву, а також при зниженні рН і в системі  $\text{Cu}^{2+}$ -гліцин [2, 8]. Варто зазначити, що саме такі ознаки розчинів етаполану визнача-

ють його практичну цінність [8]. Отже, реологічні властивості розчинів етаполану зумовлені наявністю жирних кислот у його складі.

Встановлено, що залежно від умов культивування середня молекулярна маса (м. м.) етаполану становить 926,0—1441,0 кДа [20]. Аналіз молекулярно-масового складу ЕПС показав наявність компонентів з м. м. від 13,5 до 2000 кДа, однак основну масу препарату становили фракції з м. м. понад 2000 кДа. Після осаджування ЕПС етанолом (ізопропанолом, ацетоном) середня м. м. знижувалася у 2—3 рази і становила 400—500 кДа [20]. На нашу думку, це можна пояснити порушенням структури розчинів етаполану у процесі їхньої обробки органічними розчинниками. Таке явище характерне для більшості мікробних ЕПС [2].

Синтез етаполану на різних вуглецевих субстратах. *Біосинтез етаполану на етанолі.* Показано, що в процесі росту *Acinetobacter* sp. В-7005 на мінеральному середовищі з етанолом без факторів росту рівень біомаси й ЕПС становив 0,3—0,5 г/л, при цьому в культуральній рідині накопичувався ацетат [2, 21, 22]. Внесення до середовища культивування дріжджового автолізу супроводжувалося збільшенням біомаси та ЕПС до 2—3 г/л. Як відомо, дріжджовий автолізат є джерелом амінокислот, вітамінів, пептидів, пуринів, піримідинів та низки інших факторів [23]. Тому ми дослідили вплив на ріст *Acinetobacter* sp. В-7005 цих сполук. Встановлено, що штам не потребує амінокислот, а з вітамінів лише за присутності пантотенату кальцію спостерігали підвищення рівня біомаси і ЕПС [2, 21].

Проте у декількох послідовних пересівах *Acinetobacter* sp. В-7005 на середовищі з етанолом та пантотенатом кальцію спостерігали поступове зниження рівня біомаси, ЕПС та вимивання культури. Внесення до середовища з етанолом додатково до вітаміну В<sub>5</sub> дріжджового автолізу (0,5 %) призводило до стабілізації росту і синтезу високов'язкого ЕПС (4,5—5,0 г/л). Це засвідчувало, що штам, окрім пантотенату кальцію, потребує також інших ростових факторів, які містяться в дріжджовому автолізаті.

Наступні експерименти дозволили виключити з групи можливих ростових факторів пуринові (аденін, гуанін) і піримідинові (тимін, цитозин, урацил) основи, а також відповідні нуклеотиди (моно- і трифосфати).

*Процес одержання етаполану на етанолі за*

*присутності С<sub>4</sub>-дикарбонових кислот.* Для інтенсифікації процесу біосинтезу ЕПС на етанолі ми використали підхід, умовно названий «метаболічний», суть якого полягала в теоретичному визначенні можливих «вузьких місць» метаболізму культури та пошуку шляхів їхнього усунення [2, 24, 25].

При вирішенні цієї задачі ми виходили з того, що метаболізм етанолу у гетеротрофних бактерій може здійснюватися внаслідок його окиснення через ацетальдегід до ацетату. Ацетат залучається до подальшого метаболізму за посередництвом ацетил-коферменту А (КоА) [26, 27]. При рості на етанолі бактерії використовують ацетил-КоА головним чином на синтез жирних кислот, 2-оксоглутарату, С<sub>4</sub>-дикарбонових кислот, з яких потім утворюються С<sub>3</sub>-інтермедіати, вуглеводи, амінокислоти, нуклеотиди. Синтез С<sub>4</sub>-дикарбонових кислот у мікроорганізмів, які ростуть на етанолі, ацетаті, жирних кислотах або вуглеводнях, відбувається в гліоксилатному циклі [26, 27].

Оскільки для синтезу КоА бактеріям *Acinetobacter* sp. В-7005 потрібний екзогенний пантотенат кальцію — попередник коферменту А [2, 25], ця гілка метаболізму, очевидно, лімітована ацетил-КоА. Виходячи з цього, запропоновано вносити С<sub>4</sub>-дикарбонові кислоти до середовища з етанолом для підсилення глюконеогенезу та збільшення синтезу ЕПС. Показано, що при культивуванні *Acinetobacter* sp. В-7005 на середовищі з етанолом, яке містить пантотенат кальцію і С<sub>4</sub>-дикарбонові кислоти, вихід ЕПС від субстрату збільшувався в 2 рази, а кількість синтезованих ЕПС підвищувалася на 30 % [2, 24, 25]. Для подальших експериментів як С<sub>4</sub>-блоки було обрано фумарат калію; оптимальна концентрація фумарату, який вносили до середовища культивування, становила 0,2 %. Додавання фумарату в експоненційній фазі росту *Acinetobacter* sp. В-7005 при культивуванні на середовищі з етанолом і пантотенатом кальцію повністю пригнічувало ріст клітин та значно підсилювало синтез ними ЕПС.

Цими дослідженнями показано, що екзогенний фумарат калію використовується на утворення ЕПС, тобто внесення фумарату дає змогу регулювати спрямованість процесів біосинтезу етаполану у *Acinetobacter* sp. В-7005 [2, 24, 25].

У подальших експериментах виявлено, що додавання фумарату на початку стаціонарної фази росту бактерій приводило до збільшення ЕПС-син-

тезувальної здатності, при цьому екзогенний фумарат стехіометрично метаболізувався в ЕПС. Процес засвоєння фумарату, який транспортується у клітини разом з протоном, супроводжувався зростанням величини рН середовища, що досягала максимуму при повному використанні фумарату, після чого поступово знижувалася до вихідного рівня. Досягнення нейтрального значення рН слугувало «сигналом» необхідності внесення наступної порції  $C_4$ -дикарбонових кислот. Оскільки при повторному додаванні фумарату спостерігалось поступове зниження величини рН до вихідного рівня, наступні його порції вносили після підкислення культуральної рідини до рН 7,0. Це дозволило зменшити тривалість процесу культивування *Acinetobacter* sp. B-7005 за рахунок скорочення періодичності додавання  $C_4$ -дикарбонової кислоти.

У наступних дослідах встановлено, що дробне внесення фумарату калію (порціями по 0,2 %) дозволило підвищити кількість синтезованих ЕПС в 4—5 разів (до 10—15 г/л), і вихід ЕПС від спожитого субстрату (етанол + фумарат) досягав 60—80 % [2, 24, 25].

Проведені пізніше [28—30] ензимологічні дослідження штаму *Acinetobacter* sp. B-7005 підтвердили висунуте нами теоретичне припущення щодо можливих шляхів метаболізму етанолу у даних бактерій. Так, виявлено, що «вузьким місцем»  $C_2$ -метаболізму у *Acinetobacter* sp. B-7005 є асиміляція ацетату, про що свідчило інгібування іонами натрію як окиснення ацетату в інтактних клітинах, так і активності ацетил-КоА-синтетази в безклітинному екстракті, а також лімітування  $C_2$ -метаболізму коферментом А [28, 29]. При внесенні до середовища з етанолом  $C_4$ -дикарбонових кислот (фумарату калію) в 1,5—2 рази збільшувалася активність ферментів гліоксилатного циклу, а також фумаратгідратази, малатдегідрогенази і фосфоенолпіруват-синтетази (ФЕП-синтетази). Помітнішим (майже в 7,5 разу) було підвищення за цих умов ФЕП-карбоксікіназної активності [30]. Таким чином, зростання рівня синтезу етаполану при культивуванні продуцента на етанолі за присутності  $C_4$ -дикарбонових кислот зумовлене посиленням глюконеогенезу.

*Синтез етаполану на вуглеводних субстратах.* Встановлено можливість синтезу етаполану при вирощуванні штаму *Acinetobacter* sp. B-7005 на вуглеводних субстратах (моно- і дисахариди, меляса, крохмаль) [31]. Під час росту продуцента на

$C_6$ -субстратах без пантотенату кальцію кількість синтезованих ЕПС становила 2—3 г/л, проте величина рН культуральної рідини до кінця культивування знижувалося до 5,5—5,7 [31, 32]. Для з'ясування причин, які обумовлюють зниження рівня рН культуральної рідини, досліджено основні етапи метаболізму  $C_6$ -сполук у *Acinetobacter* sp. B-7005. Показано, що катаболізм глюкози у згаданих бактерій здійснюється за шляхом Ембдена—Мейергофа—Парнаса і Ентнера—Дудорова, що підтверджує висока активність ключових ферментів цих шляхів [31]. Наявність 2-оксоглутаратдегідрогеназної активності свідчила про те, що в *Acinetobacter* sp. B-7005 функціонує повний цикл трикарбонових кислот (ЦТК).

Виявлено, що «вузьким місцем» метаболізму глюкози у продуцента етаполану є реакція, яка каталізується піруватдегідрогеназою, тобто  $C_6$ -метаболізм у даних бактерій лімітований КоА. Поповнення пулу інтермедіатів для реакцій конструктивного метаболізму відбувається за участі піруваткарбоксілази.

У клітинах *Acinetobacter* sp. B-7005 незалежно від джерела вуглецевого живлення (глюкоза, етанол) визначено високу активність ключових ферментів  $C_2$ - і  $C_6$ -метаболізму. При рості бактерій на глюкозі активність ізоцитратліази становила  $4,3 \text{ нмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  білка. Встановлено, що індукторами цього ферменту у продуцента етаполану є  $C_2$ -сполуки (етанол, ацетат). Внесення  $C_2$ -сполук у низьких концентраціях (0,01—0,1 %) у середовище з глюкозою супроводжувалося одночасним споживанням двох субстратів, збільшенням кількості синтезованих ЕПС (5,1—6,1 г/л) і ЕПС-синтезувальної здатності (4,07—4,25 г ЕПС на 1 г біомаси) [31]. Отримані результати стали основою для розробки [32] технології отримання етаполану на вуглеводах, а також на суміші  $C_2$ - $C_6$ -субстратів.

*Інтенсифікація синтезу етаполану на суміші ростових субстратів.* Принципово новою є технологія інтенсифікації синтезу мікробного ЕПС етаполану на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів [32—36].

У місцях природного існування мікроорганізми розвиваються за присутності декількох вуглецевих субстратів, тоді як у лабораторних умовах для їхнього культивування використовують моносубстрати як єдине джерело вуглецю і енергії. У той же час відомо, що значна частина деяких субстратів витрачається на окиснення до  $\text{CO}_2$  для одержання

енергії, необхідної для конструктивного метаболізму (наприклад, на глюкозі — 40 %). Поряд з цим існують роботи, де доведено здатність мікроорганізмів використовувати суміші двох (або більше) субстратів і досліджено деякі аспекти регуляції таких процесів [27, 37—40]. Проте зазначені дослідження стосуються використання змішаних субстратів лише для підвищення виходу біомаси.

Відомо також, що комбінація енергетично нерівноцінних субстратів дозволяє підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у біомасу [39, 40]. Ми припустили, що такий підхід може бути застосований не лише для збільшення виходу біомаси, а й для інтенсифікації синтезу вторинних метаболітів (з урахуванням додаткових енергозатрат на їхнє утворення).

Визначення шляхів енергетичного і конструктивного метаболізму  $C_2$ - $C_6$ -субстратів у продуцента етаполану дало змогу встановити, які з цих сполук є енергетично надлишковими, а які — енергетично дефіцитними [28, 31]. Встановлено, що окиснення етанолу і ацетальдегіду у даних бактерій здійснюється НАД<sup>+</sup>- і НАДФ<sup>+</sup>-залежними дегідрогеназами [28], тому цей субстрат класифікується як енергетично надлишковий. Катаболізм глюкози у штаму *Acinetobacter* sp. В-7005 (продуцента етаполану) здійснюється за шляхом Ембдена—Мейєргофа—Парнаса та Ентнера—Дудорова [31]. Згідно з енергетичною класифікацією субстратів Бабея [39], глюкоза є енергетично дефіцитним субстратом.

В результаті теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ЕПС і біомаси штамом *Acinetobacter* sp. В-7005 знайдено співвідношення концентрацій етанолу і глюкози, що дозволяє уникнути непродуктивних втрат вуглецю і енергії, які мають місце при використанні моносубстратів, та підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у ЕПС [33, 35]. Введення етанолу до середовища з глюкозою у молярному співвідношенні 3,1:1 дозволило збільшити кількість синтезованих ЕПС в 1,8—1,9 разу (до 7,5—8,0 г/л), ЕПС-синтезувальну здатність — в 1,4—1,7 разу (до 3,8 г ЕПС на 1 г біомаси), а вихід ЕПС від субстрату — в 1,5—2 рази (до 62—65 %) порівняно з вирощуванням продуцента на моносубстратах.

Дослідження, результати яких викладено в роботах [32—34, 36], показали, що при культивуванні *Acinetobacter* sp. В-7005 на суміші етанолу і глюкози обидва субстрати засвоюються одночасно, при цьому підвищується в 1,3—1,4 разу макси-

мальна питома швидкість росту і значно скорочується час її досягнення.

Проте при культивуванні продуцента етаполану на суміші етанолу і глюкози часто спостерігали підвищення синтезу не лише ЕПС, але й біомаси. Тому у подальших дослідженнях було визначено умови культивування бактерій, які забезпечують максимально повну конверсію вуглецю обох субстратів саме в ЕПС [32, 36]. Встановлено, що при вирощуванні продуцента етаполану на суміші етанолу і глюкози найвища ефективність трансформації вуглецю субстратів в ЕПС спостерігається при: 1) використанні посівного матеріалу, вирощеного на етанолі або суміші етанолу і глюкози; 2) зниженні концентрації джерела азотного живлення (нітрату амонію) в середовищі до 0,3—0,45 г/л; 3) відсутності катіонів натрію в середовищі культивування.

Вивчення активностей ключових ферментів  $C_2$ -метаболізму (алкоголь- і ацетальдегіддегідрогеназ, ацетаткінази, ацетил-КоА-синтетази) та  $C_6$ -метаболізму (фосфофруктокінази і фосфоглюконатдегідратази) при вирощуванні продуцента етаполану на суміші етанолу і глюкози показало, що їхні значення були дещо нижчими порівняно з вирощуванням на відповідних моносубстратах [36, 41]. Істотнішим було зниження ізоцитратліазної та малатсинтазної активності при вирощуванні на змішаному субстраті (у порівнянні з культивуванням на етанолі). Отже, ми припустили, що ацетил-КоА, який утворюється з етанолу в ацетаткіназній і ацетил-КоА-синтетазній реакціях, залучається до подальшого метаболізму переважно через ЦТК.

Показано, що при вирощуванні бактерій на суміші етанолу і глюкози активність ферментів ЦТК була вищою, ніж на етанолі (особливо активність ізоцитратдегідрогенази). Можливо, роль гліюксилатного циклу в метаболізмі продуцента етаполану на змішаному субстраті є не такою значною, як на етанолі. Тим більше, що в умовах міксотрофного росту бактерій спостерігали підвищення активності піруваткарбоксілази — ферменту анаплеротичної реакції, що забезпечує поповнення пулу  $C_4$ -дикарбонових кислот при вирощуванні на вуглеводах. Разом з тим одночасне функціонування двох анаплеротичних шляхів (гліюксилатного циклу і піруваткарбоксілазної реакції) може свідчити про посилення глюконеогенезу за умов міксотрофного росту продуцента. Дійсно, активність ФЕП-синтетази — ключового ферменту

глюконеогенетичної гілки обміну речовин на змішаному субстраті — була у 3 і 1,5 рази вищою, ніж на глюкозі та етанолі відповідно.

Таким чином, результати ензимологічних досліджень засвідчують зміну спрямованості процесів біосинтезу на суміші  $C_2$ - $C_6$ -субстратів у бік утворення ЕПС порівняно з вирощуванням бактерій на монособстратах.

Одержані дані є підґрунтям для створення принципово нових технологій отримання практично цінних вторинних метаболітів на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів.

*Регуляція  $C_2$ -метаболізму у *Acinetobacter* sp. B-7005 і вдосконалення технології біосинтезу етаполану на етанолі.* Недоліком розробленої раніше технології одержання етаполану на етанолі була необхідність підтримання нейтрального значення рН у процесі культивування продуцента, що досягалося введенням у середовище солей у високих концентраціях (11 г/л) для створення достатньо ємного фосфатного буфера (0,05 М). При вирощуванні *Acinetobacter* sp. B-7005 на середовищі з етанолом, яке не містить буфера, спостерігалось зниження величини рН до 4—5, припинення росту бактерій і синтезу ЕПС [2, 28, 29].

На основі дослідження особливостей енергетичного і конструктивного метаболізму у продуцента етаполану розроблено підходи до регуляції  $C_2$ -метаболізму і визначено шляхи керування процесом біосинтезу ЕПС.

Відомо, що окиснення етанолу і ацетальдегіду здійснюється НАД<sup>+</sup>- і НАДФ<sup>+</sup>-залежними дегідрогеназами, ацетат залучається до метаболізму за участі ацетил-КоА-синтетази [28]. Анаплеротичною послідовністю реакцій, що поповнює пул  $C_4$ -дикарбонових кислот у клітинах *Acinetobacter* sp. B-7005, є гліоксилатний цикл, а ЦТК виконує переважно біосинтетичну роль. Синтез фосфоенолпірувату забезпечується двома ключовими ферментами глюконеогенезу — ФЕП-карбоксикіназою і ФЕП-синтетазою [30].

Встановлено, що «вузьким місцем» метаболізму етанолу у *Acinetobacter* sp. B-7005 є асиміляція ацетату: реакція, що каталізується ацетил-КоА-синтетазою і лімітується швидкістю [28, 29]. Отже, у клітинах бактерій *Acinetobacter* sp. B-7005, що ростуть на етанолі, ацетат утворюється з високою швидкістю, ніж залучається до подальшого метаболізму.

Наступні дослідження було спрямовано на по-

шук факторів, які забезпечують однакову швидкість утворення і подальшого метаболізму ацетату в клітинах *Acinetobacter* sp. B-7005, вирощених на етанолі.

З'ясовано, що інгібіторами ацетил-КоА-синтетази є іони натрію, а також продукти окиснення етанолу і ацетальдегіду — НАДН і НАДФН. Активаторами ферменту є пантотенова кислота, катіони калію і магнію [29]. Зниження початкової концентрації етанолу з 1,0 до 0,5 % (з наступним внесенням 0,5 % етанолу в середині експоненційної фази росту), відсутність іонів натрію і наявність 100 мМ  $K^+$  у середовищі культивування продуцента етаполану обумовлювали практично однакову швидкість окиснення етанолу, ацетальдегіду і ацетату в інтактних клітинах бактерій, при цьому у 3 рази підвищувалася активність ацетил-КоА-синтетази в безклітинному екстракті. Це дозволило реалізувати процес синтезу етаполану на середовищі, молярність якого знижена в 2 рази. Отримання аналогічного результату за початкової концентрації етанолу 1,0 % забезпечувалося (на фоні відсутності солей натрію і наявності 100 мМ  $K^+$ ) при підвищенні концентрації пантотенової кислоти і  $Mg^{2+}$  в середовищі до 0,0009—0,0012 % і 5 мМ відповідно. Однак при подальшому зниженні концентрації солей і буферної ємності середовища спостерігали падіння рівня синтезу етаполану і накопичення ацетату в культуральній рідині. За таких умов культивування продуцента етаполану активність ацетил-КоА-синтетази була в 2 рази нижчою [29].

Літературні дані свідчать про те, що ацетил-КоА-синтетаза, яка функціонує в клітинах багатьох про- і еукаріотів, є індукцибельним ферментом [42, 43], індуктором синтезу якого є ацетат [44]. Наші експерименти показали, що внесення до середовища з етанолом екзогенного ацетату підвищує активність ацетил-КоА-синтетази в клітинах *Acinetobacter* sp. B-7005 [45].

На основі вивчення регуляції  $C_2$ -метаболізму розроблено спосіб одержання етаполану, ключовими елементами якого є відсутність у середовищі культивування катіонів натрію, підвищення у ньому концентрації пантотенату кальцію до 0,0009 % та наявність 0,1 % ацетату калію при одержанні інокуляту і біосинтезі полісахариду. Це дало змогу здійснити (без зниження показників синтезу) процес отримання етаполану на середовищі, в якому вміст солей зменшено у 4 рази (з 11 до 2,95 г/л).

Принципи регуляції фізико-хімічних властивостей етаполану. Відомо, що умови культивування продуцента впливають не лише на синтез ЕПС, а й на фізико-хімічні властивості кінцевого продукту [46—48]. За різних умов культивування може змінюватися хімічний склад ЕПС, їхня молекулярна маса, співвідношення декількох полісахаридів, що впливає на реологічні властивості ЕПС, які визначають практичну значущість цих полімерів. Тому важливою і необхідною умовою розробки біотехнологій мікробних ЕПС є стабільність фізико-хімічних властивостей полісахаридів, а також можливість регуляції властивостей полімерів залежно від області їхнього практичного використання. З'ясовано, що в процесі періодичного культивування *Acinetobacter* sp. B-7005 у складі етаполану змінюється співвідношення АП і НАП [6, 49, 50]. Синтез обох полісахаридів починається з перших годин росту бактерій і відбувається паралельно. На момент досягнення максимальної в'язкості 0,02 % розчинів етаполану вміст АП у його складі був найвищим і становив 65—68 %. До кінця періодичного процесу в складі ЕПС зростав вміст НАП (до 60 %), що супроводжувалося зниженням в'язкості його розчинів [6].

Крім того, у розчинах ЕПС з високим вмістом НАП в'язкість не підвищувалася за присутності катіонів, в області низьких швидкостей зсуву, при зниженні рівня рН, а також у системі  $\text{Cu}^{2+}$ —гліцин, тобто вони не виявляли реологічних властивостей, які визначають практичну цінність етаполану [49]. Таким чином, властивості розчинів етаполану залежать від співвідношення АП і НАП у його складі [50]. Для отримання ЕПС, розчинам яких притаманні необхідні реологічні ознаки, процес культивування продуцента слід зупинити до стаціонарної фази росту, що призводить до зниження кількості синтезованих ЕПС.

Наступні дослідження показали, що при збільшенні у 2 рази (з 0,025 до 0,05 М) концентрації  $\text{K}^+$  у середовищі спостерігалось поступове підвищення в'язкості розчинів синтезованих ЕПС упродовж всього процесу культивування. За таких умов вміст АП в ЕПС практично не змінювався і становив 70—75 %, до того ж його утворення відбувалося і в стаціонарній фазі росту [51]. Аналогічні закономірності встановлено при вирощуванні продуцента на середовищі, яке вміщує 0,10 М  $\text{K}^+$ . У цьому разі вміст АП в ЕПС становив 90—95 %. Одержані дані свідчать про те, що при культивуванні *Acine-*

*tobacter* sp. B-7005 на середовищі з підвищеним вмістом  $\text{K}^+$  можна (незалежно від тривалості процесу) одержувати ЕПС з необхідними реологічними властивостями. Аналіз хімічного складу ЕПС, синтезованих на середовищах з різною концентрацією  $\text{K}^+$  (0,025—0,1 М), показав, що вони відрізнялися між собою вмістом АП, а також вмістом жирних кислот в АП [50]. Розчинам досліджуваних ЕПС була притаманна різна в'язкість за присутності катіонів, при низьких значеннях рН, а також у системі  $\text{Cu}^{2+}$ —гліцин. Таким чином, реологічні властивості розчинів етаполану визначаються не лише співвідношенням АП і НАП у його складі, але й вмістом жирних кислот в АП [6, 49—51].

Встановлено, що синтез ацильованого ЕПС залежав від вмісту одновалентних катіонів ( $\text{K}^+$  і  $\text{Na}^+$ ) у середовищі культивування продуцента. Для утворення високоацильованого АП, який вміщує 12—16 % жирних кислот, концентрація одновалентних катіонів ( $\text{K}^+$  і  $\text{Na}^+$ ) у середовищі повинна бути не нижче 0,09 М [49, 52].

Щоб зробити етаполан конкурентоздатним промисловим мікробним ЕПС, необхідно було створити керовану технологію його одержання, яка б забезпечувала високий вихід ЕПС з певними, наперед заданими властивостями. Раніше [2, 24, 25] виявлено можливість інтенсифікації синтезу ЕПС *Acinetobacter* sp. B-7005 за рахунок внесення у середовище  $\text{C}_4$ -дикарбонових кислот — попередників глюконеогенезу.

Відомо, що залежно від концентрації одновалентних катіонів у середовищі з фумаратом калію синтезується АП або НАП [49]. Так, поряд із збільшенням концентрації одновалентних катіонів у середовищі підвищувався вміст АП у складі синтезованих ЕПС, що приводило до покращення реологічних властивостей їхніх розчинів. Однак при цьому вміст жирних кислот упродовж процесу зменшувався від 7,2 % (після внесення 1-ї порції фумарату) до 3,5 % (після додавання 4-ї порції). Це супроводжувалося зниженням в'язкості розчинів ЕПС, синтезованих наприкінці процесу, за присутності катіонів, у  $\text{H}^+$ -формі і в системі  $\text{Cu}^{2+}$ —гліцин [49].

Подальші дослідження показали, що зниження вмісту жирних кислот в АП, синтезованих після внесення останніх порцій фумарату, зумовлено недостатньою кількістю одновалентних катіонів у середовищі культивування бактерій. При зростанні



початкової концентрації одновалентних катіонів у середовищі до 0,14 М з фумарату калію синтезувався АП з високим вмістом жирних кислот (7,5—8,5 %), який був постійним упродовж всього процесу культивування. При цьому властивості розчинів ЕПС, синтезованих після внесення кожної з чотирьох порцій фумарату, не змінювалися і були аналогічними властивостям ЕПС, утворених на середовищі без фумарату [8, 49].

Наступні дослідження показали, що синтез високоацильованого етаполану можливий і під час вирощування продуцента на середовищах з етанолом, які містять лише 20—40 мМ  $K^+$ . Так, у результаті досліджень регуляції  $C_2$ -метаболізму у *Acinetobacter* sp. В-7005 встановлено, що культивування бактерій за умов усунення метаболічного лімітування, пов'язаного з утворенням ацетил-КоА (попередника жирних кислот), супроводжується синтезом переважно ацильованого ЕПС з високою м. м. (1,5 млн Да), яка не знижується в процесі виділення і очищення препарату [45].

З'ясовано, що етаполан захищає клітини продуцента від несприятливих факторів зовнішнього середовища: дії токсичних похідних кисню, важких металів ( $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ ), біоциду (формальдегід), детергенту (додецилсульфат натрію), високих і низьких значень рН, нагрівання, висушування, заморожування [53—56]. Показано, що етаполан виконує захисні функції не тільки щодо клітин продуцента, а й стосовно клітин мікроорганізмів, які перебувають у трофічних взаємовідносинах з *Acinetobacter* sp. В-7005 [55].

Дослідженнями, результати яких викладено в роботах [8, 57], виявлено, що за неоптимальних умов культивування *Acinetobacter* sp. В-7005 (при зміні температури, рН середовища, концентрації розчиненого кисню) кількість ЕПС знижувалася, однак ЕПС-синтезувальна здатність залишалася незмінною і становила 1 г ЕПС на 1 г біомаси. Розчини ЕПС, синтезованих за неоптимальних умов, характеризувалися різною в'язкістю за присутності катіонів, у  $H^+$ -формі і в системі  $Cu^{2+}$ —гліцин.

Отримані результати дозволили припустити, що ефективність захисних функцій таких ЕПС є різною, вона корелює з реологічними властивостями етаполану і найповніше реалізується за неоптимальних умов культивування *Acinetobacter* sp. В-7005. Проте при культивуванні бактерій в неоптимальних умовах знижувалася кількість синтезо-

ваних ЕПС. У зв'язку з цим ми висловили припущення, що можна одночасно збільшити концентрацію ЕПС і покращити властивості розчинів етаполану за рахунок вирощування продуцента в двостадійному процесі, на першій стадії якого здійснювати культивування бактерій в оптимальних для росту і синтезу ЕПС умовах, а на другій — створювати неоптимальні умови (зниження температури до 24 °С, підвищення рН до 8,0, внесення до середовища формальдегіду — 30 мкг/мл). Встановлено, що при культивуванні *Acinetobacter* sp. В-7005 у двостадійному процесі кількість синтезованих ЕПС досягала рівня, відповідного такому за оптимальних умов [20]. При цьому розчини ЕПС характеризувалися вищою в'язкістю за присутності катіонів, у  $H^+$ -формі і в системі  $Cu^{2+}$ —гліцин, ніж полісахариди, синтезовані за оптимальних умов.

**Практичне використання етаполану.** Етаполан — ЕПС багатофункціонального призначення, який може бути застосований у різних галузях промисловості [8, 58—62] і сільському господарстві для створення препаратів захисту рослин [63].

**Нафтовидобування.** Такі фізико-хімічні властивості розчинів етаполану, як здатність до емульгування, підвищення в'язкості за присутності катіонів, при низьких швидкостях зсуву, при зниженні рН та в системі  $Cu^{2+}$ —гліцин привернули увагу фахівців з нафтовидобутку до цього ЕПС як до нафтовитиснювального агента.

Показано, що для інтенсифікації нафтовидобутку доцільним є використання етаполану, що містить у своєму складі 70—95 % АП зі ступенем ацилювання 5—12 %.

На сьогоднішній день у світі найперспективнішими для застосування в нафтовидобуванні вважаються такі мікробні ЕПС: ксантан (продуцент *Xanthomonas campestris*), склероглюкан (продуцент *Sclerotium glucanicum*, *S. rolfsii*), емульсан (продуцент *Acinetobacter calcoaceticus*).

Етаполан істотно відрізняється від цих полісахаридів значним підвищенням в'язкості розчинів у мінералізованих середовищах. Важливою особливістю розчинів етаполану є підвищення їхньої в'язкості при підкисленні, що відкриває можливості використання цього ЕПС для пролонгування кислотної обробки призабійних зон пласту. Розчини етаполану термостійкіші за розчини ксантану і склероглюкану, що дає змогу використовувати їх на родовищах з високими пластовими температурами [59].

Завдяки наявності ліпофільної частини в молекулі етаполану він може стабілізувати емульсії води з нафтою та іншими вуглеводнями. Розчини етаполану характеризуються вищою спроможністю (у порівнянні з відомими біополімерами) збільшувати в'язкість в області низьких швидкостей зсуву ( $0,1\text{--}1,0\text{ с}^{-1}$ ). Етаполан здатний утворювати гелеподібні системи при взаємодії з іонами металів та іншими зшивальними агентами. При цьому спостерігається підвищення в'язкості розчинів модифікованого етаполану більш ніж в 10 разів і стабілізація отриманого розчину при тривалому зберіганні [2, 59].

У нафтовидобуванні можливе використання етаполану у вигляді культуральної рідини, що виключає необхідність виділення і попереднього очищення препарату. Застосування такої товарної форми етаполану додатково має ту перевагу, що в ній полісахариди стабілізовані інгредієнтами, які входять до складу культуральної рідини. Крім того, він не має мікрогелевих згустків. Цим пояснюється легка розчинність етаполану навіть у мінералізованих середовищах і сумісність його з іншими хімічними реагентами при приготуванні композицій.

Композиції етаполану і поліакриламід, а також етаполану і силікату натрію, розроблені спільно із співробітниками Інституту «Союзнефтеотдача» (Росія) і «ВНИИнефть» (Росія), використано в 1988—1990 роках для інтенсифікації нафтовидобутку на вироблених свердловинах ВО «Башнефть» (Башкортостан). Виготовлення дослідних партій етаполану здійснювали також на Башкирському біохімічному заводі і на ВО «Ензим» (Україна).

Спільно із співробітниками Інституту «ВНИИнефть» та ЕНТО «ИТИН» (Росія) розроблено спосіб ізоляції притоку пластових вод за допомогою гелеутворювальних композицій на основі етаполану, неорганічних солей міді і гліцину, який забезпечує високоєфективну ізоляцію водопроникних пропластів, що супроводжується збільшенням нафтовидобутку та істотним зниженням обводнення нафти [64]. Розроблений спосіб ізоляції притоку пластових вод використано в 1991—1992 роках для гідроізоляції вироблених свердловин на Прилуцькому нафтородовищі (Чернігівська обл.). Промислові партії етаполану вироблено на дослідній мобільній установці, розробленій спільно з ЕНТО «ИТИН», в умовах Трипільського біохімічного заводу ВАТ «Стиролбіотех» (Україна).

Застосування 1 т етаполану у нафтовидобуванні дає змогу отримати додатково до 240 т нафти.

*Побутова хімія й косметологія.* У побутовій хімії й косметології використовують препарати етаполану, розчинам яких притаманна висока емульгувальна активність [8]. Таким вимогам задовольняє етаполан, який вміщує 70 % АП зі ступенем ацилювання 12—16 %. На основі етаполану розроблено технічний миючий засіб БІМС-1, обсяг реалізації якого в 1989—1990 рр. становив 1000 т. На основі етаполану розроблено технологію виробництва косметичних кремів під загальною назвою «Екол» [8].

Етаполан з високим вмістом неацильованого полісахариду може бути використано як загущувальний агент у лужних середовищах (наприклад, при виготовленні деяких миючих засобів, пральних паст і т. д.). Застосування за таких умов етаполану з високим вмістом жирних кислот є недоцільним, оскільки в лужному середовищі (при рН 10 і вище) може відбуватися часткове дезацилювання ЕПС, що призводить до зниження в'язкості його розчинів і, отже, до зниження ефективності використання ЕПС [8].

*Харчова промисловість.* Дослідженнями, проведеними в Українському державному університеті харчових технологій (УДУХТ, з 2002 року — Національний університет харчових технологій) під керівництвом чл.-кор. УААН В. І. Дробот, показано можливість і доцільність застосування етаполану при виробництві хліба і хлібопродуктів [60—62].

Відпрацьовано технологічні режими і параметри виготовлення хліба «Житомирський» і «Поліський», які забезпечують стабільний ритм тістоутворення і високу якість готового продукту. Визначено технологічну дозу етаполану для випічки хліба, яка становить 0,3—0,5 % до маси борошна. Економічний ефект від застосування етаполану полягає у можливості використання борошна 2-го і 3-го сортів (борошна з низьким змістом клейковини), економії борошна за умов додавання до нього етаполану і в уповільненні черствіння хлібопродуктів.

В УДУХТ на основі етаполану розроблено комплексні добавки К-1, К-2 і К-3 для використання при виробництві хліба і булочних виробів з пшеничного борошна з низьким вмістом клейковини. На хлібокомбінаті № 2 (м. Київ) проведено

промислові випробування з виробництва хлібопродуктів з комплексними добавками К-1, К-2 і К-3. Обсяг дослідних партій хлібопродуктів, вироблених на основі добавки К-1, становив 21,4 т; К-2 — 24,5 т; К-3 — 21,7 т.

Дослідженнями, проведеними в НДІ гігієни харчування Міністерства охорони здоров'я України, показано відсутність мутагенності, ембріотоксичності, тератогенності і алергенності етаполану, а також встановлено комплексоутворювальну здатність етаполану по відношенню до солей важких металів (на прикладі свинцю). Завдяки здатності етаполану адсорбувати і виводити з організму солі важких металів хлібопродукти з його використанням можуть бути рекомендовані для профілактичного харчування.

У харчовій промисловості, на відміну від нафтовидобування і косметології, можна використовувати етаполан з нижчим вмістом жирних кислот (40—50 % АП зі ступенем ацилювання 3—5 %).

*Захист рослин від вірусних та інфекційних хвороб.* Відомо, що мікробні полісахариди різної будови мають антивірусні властивості [64]. Найбільшу увагу привертають гетерополісахариди, у складі яких поряд з нейтральними моносахаридами виявлено значну кількість уронових кислот [8, 32]. Такі полімери мають поліаніонну структуру і завдяки цьому здатні індукувати резистентність організму до вірусних інфекцій *de novo*. Враховуючи вищезазначене, ми вважали за доцільне дослідити антивірусну активність цих препаратів, зокрема, на моделях фітовірусів.

Випробування препаратів у контактних дослідках *in vitro* показали, що незалежно від джерела вуглецю в середовищі культивування продуцента (етанол, глюкоза, етанол + глюкоза) ЕПС пригнічували інфекційність вірусу тютюнової мозаїки та Х-вірусу картоплі в рослинах дурману (*Datura stramonium*) і гомфрени (*Gomphrena globosa* L.) у широкому діапазоні концентрацій. Цікаво зазначити, що таку активність мали як нативні, так і дезацильовані препарати етаполану. Це засвідчувало, що жирні кислоти не були, принаймні, головними детермінантами у визначенні антифітовірусних властивостей цього ЕПС [64].

Встановлено, що препарати етаполану в концентрації 500—2000 мкг/мл здатні індукувати стійкість надчутливих рослин тютюну сорту Імунний 580, *Nicotiana sanderae* та дурману до ВТМ-інфекції.

Таким чином, для синтезу етаполану може бути використаний великий набір субстратів (етанол, С<sub>4</sub>-дикарбонові кислоти, вуглеводи — моно- і дисахариди, крохмаль, меляса). Така властивість вигідно вирізняє продуцент етаполану серед відомих мікробних синтетиків, які здебільшого синтезують ЕПС лише при вирощуванні на вуглеводах (*Xanthomonas campestris*, *Azotobacter vinelandii*, *Sclerotium glucanicum*, *Aureobasidium pullulans* та ін.). Слід зазначити, що дослідження, проведені в 70—80-х роках ХХ століття, продемонстрували можливість розширення сировинної бази мікробіологічного виробництва ЕПС за рахунок застосування нехарчових субстратів — метану, нижчих спиртів, етиленгліколю, вуглеводнів та нафтопродуктів [48]. Представником нової генерації мікробних ЕПС є емульсан (продуцент *Acinetobacter calcoaceticus*), одержуваний в промисловому масштабі на основі етанолу [17]. Однак у літературі відсутні дані щодо мікроорганізмів, здатних активно синтезувати ЕПС як на вуглеводних, так і на неуглеводних субстратах.

Здатність *Acinetobacter* sp. В-7005 до утворення ЕПС на С<sub>2</sub>-С<sub>6</sub>-сполуках дозволила нам розробити комплекс різних технологій одержання етаполану на основі широкого набору вуглецевих субстратів, кожна з яких може бути реалізована залежно від економічної доцільності, наявності та доступності того чи іншого субстрату, необхідності одержання ЕПС з певними фізико-хімічними властивостями.

Синтез етаполану інтенсифікували за допомогою таких підходів:

— встановлення сукупності оптимальних зовнішніх факторів (природа і концентрація факторів росту, джерел вуглецевого і азотного живлення, співвідношення С/Н, спосіб подачі субстрату та ін.);

— внесення у середовище культивування попередників біосинтезу полісахаридів;

— використання суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів;

— виявлення «вузьких місць» метаболізму і розробка підходів до їхнього усунення.

Фізико-хімічні властивості етаполану регулювали, застосовуючи такі методи:

— виявлення в складі ЕПС функціональних груп, що визначають їхні реологічні властивості, та пошук факторів, які забезпечують синтез ЕПС з необхідними функціональними групами;

— дослідження зміни складу і властивостей

ЕПС у процесі культивування продуцента і визначення фази росту, в якій відбувається синтез ЕПС з необхідними фізико-хімічними властивостями;

— вивчення взаємозв'язку між реологічними властивостями ЕПС та їхніми захисними функціями, а також визначення умов культивування продуцента, необхідних для прояву таких функцій.

Деякі з цих підходів щодо інтенсифікації синтезу ЕПС і регуляції їхніх фізико-хімічних властивостей реалізовано нами вперше.

Так, відомі на сьогодні літературні дані стосовно використання мікроорганізмами змішаних субстратів свідчать лише про підвищення рівня синтезу біомаси на суміші ростових і неростових субстратів. Нами ж вперше показано можливість інтенсифікації синтезу вторинних метаболітів (на прикладі мікробного екзополісахариду етаполану) на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів. На основі експериментальних даних розроблено технологію одержання етаполану, що дає змогу підвищити майже в 2 рази максимальну швидкість росту продуцента, кількість синтезованих ЕПС, їхній вихід по відношенню до біомаси та вихід ЕПС від субстрату, а також скоротити тривалість культивування і покращити реологічні властивості розчинів ЕПС, які визначають його практичну цінність.

У літературі відсутні також будь-які відомості про можливість регуляції реологічних властивостей мікробних ЕПС через зміну ефективності їхніх захисних функцій. На теперішній час дослідження, пов'язані з вивченням фізіологічних функцій мікробних ЕПС, залишаються поза увагою біотехнологів. На нашу думку, з'ясування причин, які зумовлюють необхідність синтезу ЕПС для самого продуцента, дозволить з нових позицій підійти до вирішення низки проблем біотехнології мікробних полісахаридів, у тому числі і одержання ЕПС з заданими властивостями.

Варто зазначити, що способи одержання мікробних ЕПС у двостадійному процесі відомі [65, 66], але вони характеризуються тим, що на першій стадії створюються умови, оптимальні для росту продуцента, а на другій — оптимальні умови для синтезу ЕПС. Відмінною рисою нашого підходу є те, що на першій стадії процесу продуцент вирощується за оптимальних як для росту, так і для синтезу ЕПС умов, а на другій — створюються неоптимальні (або навіть стресові) для продуцента умови, за яких найповніше проявляються захисні

функції мікробних ЕПС. У відповідь на несприятливе оточення синтезуються полісахариди зі зміненими реологічними характеристиками. У літературі відзначено стимулювальну дію органічних кислот (пірувату, цитрату, сукцинату,  $\alpha$ -кетоглутарату) на утворення ксантану бактеріями *Xanthomonas campestris* [67]. Автори вважають, що вплив органічних кислот пов'язаний зі встановленням сприятливого для синтезу ксантану значення рН.

Аналогічний ефект має місце при введенні до середовища культивування *X. campestris* фумарової кислоти [68]. У цьому разі відмічено збільшення виходу ксантану з 6,0 до 9,1 г/л. Механізм дії екзогенного фумарату при рості продуцента етаполану на  $C_2$ -сполуках принципово інший, оскільки у даному випадку  $C_4$ -дикарбонові кислоти є інтермедіатами метаболізму етанолу, які безпосередньо залучаються до глюконеогенезу.

Наведені підходи до інтенсифікації синтезу і регуляції властивостей етаполану можуть бути застосовані при розробці технологій не лише мікробних полісахаридів, а й будь-яких практично важливих вторинних метаболітів.

Унікальні реологічні властивості розчинів етаполану (здатність до емульгування, підвищення в'язкості за присутності одно- і двовалентних катіонів, при зниженні рН, в області низьких швидкостей зсуву, у системі  $Cu^{2+}$ —гліцин), сукупність яких не притаманна жодному з відомих мікробних ЕПС, дають змогу розглядати його як полісахарид мультифункціонального призначення, який можна використовувати у нафтовидобувній, хімічній, парфумерно-косметичній, харчовій промисловостях і сільському господарстві.

T. P. Pirog, Yu. V. Korzh

Ethapolan — microbial exopolysaccharide multifunctional assignment  
Summary

The review summarizes the data concerning the synthesis intensification, the regulation of physical and chemical properties and practical application of microbial exopolysaccharide (EPS) ethapolan (producer — *Acinetobacter* sp. B-7005). Ethapolan consist of the acylated ( $C_{10}$ - $C_{18}$  fatty acids) and non-acylated components, which are identical by the content of carbohydrates to pyruvic and glucuronic acids. The presence of fatty acids in this EPS composition causes the unique properties of the ethapolan solutions: ability to emulsify; to increase viscosity in presence of the cations, at low pH values and in  $Cu^{2+}$ -glycin system. These properties determine practical ethapolan application in the oil, chemical, food industry and agriculture. The use of one tone of ethapolan in oil industry

enables to obtain 240 tones of oil, in addition. The data were summarized concerning the technological parameters of this EPS biosynthesis on different carbon substrates (ethanol, carbohydrates, mixture of growth  $C_2$ - $C_6$ -compounds), which allow decreasing the salts content in the producer cultivation medium 3—4 fold (to 2.95 g/l), to increase increasing the EPS quantity 2—5 fold and controlling simultaneously its composition and its physical and chemical properties necessary for a definite field of the ethapolan application.

*Key words:* exopolysaccharides, ethapolan, intensification of synthesis, regulation of metabolism, physical and chemical properties, mixture of growth substrates, biosynthesis.

Т. П. Пирог, Ю. В. Корж

Этаполан — микробный экзополисахарид мультифункционального назначения

Резюме

Суммированы опубликованные экспериментальные данные, касающиеся интенсификации синтеза, регуляции физико-химических свойств и практического использования микробного экзополисахарида (ЭПС) этаполана (продуцент — *Acinetobacter* sp. В-7005). Приведены характеристики этаполана и штамма продуцента, анализ разработанных технологий биосинтеза этого ЭПС на разных углеродных субстратах (в том числе и на смеси ростовых  $C_2$ - $C_6$ -соединений), преимущества этаполана по сравнению с известными ЭПС, а также новые подходы к регуляции синтеза и свойств этаполана.

*Ключевые слова:* экзополисахариды, этаполан, интенсификация синтеза, регуляция метаболизма, физико-химические свойства, смесь ростовых субстратов, биосинтез.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гринберг Т. А., Дерябин В. В., Краснопецева Н. В., Пирог Т. П., Бедрина Е. В., Степанюк В. В., Малащенко Ю. Р. Некоторые свойства полисахарида, синтезируемого культурой *Acinetobacter* sp. // Микробиол. журн.—1987.—49, № 4.—С. 24—30.
2. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Малащенко Ю. Р., Пинчук Г. Э. Микробный синтез экзополисахаридов на  $C_1$ - $C_2$ -соединениях.—К.: Наук. думка, 1992.—212 с.
3. *Bergey's manual of systematic bacteriology* / 9 th ed.—Baltimore; London: Williams & Wilkins Co., 1984.—Vol. 1.—945 p.
4. Bouvet P. J. M., Grimont P. D. D. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii* // *Int. J. Syst. Bacteriol.*—1986.—36.—P. 228—240.
5. Романовская В. А., Рокитко П. В., Шилин С. О., Малащенко Ю. Р. Актуальные проблемы филогенетической классификации бактерий // Микробиол. журн.—2003.—65, № 5.—С. 46—65.
6. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Пинчук Г. Э., Буклова В. Н., Малащенко Ю. Р. Изменение состава и свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования // Микробиология.—1994.—63, № 6.—С. 1015—1019.
7. Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Пинчук Г. Э., Сенченкова С. Н., Малащенко Ю. Р. Разделение экзополисахаридов,

8. Пирог Т. П. Принципы регуляции состава и физико-химических свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp.: дис. ... д-ра биол. наук.—Киев: Ин-т микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1999.—450 с.
9. Kochetkov N. K., Byramova N. E., Tsvetkov Yu. E., Backinovsky L. V. Synthesis of the O-specific polysaccharide of *Shigella flexneri* // *Tetrahedron.*—1985.—41.—P. 3363—3375.
10. Пирог Т. П., Коваленко М. А., Кузьминская Ю. В., Воцелко С. К. Физико-химические свойства микробного экзополисахарида этаполана, синтезированного на смеси ростовых субстратов // Микробиология.—2004.—73, № 1.—С. 19—24.
11. Пирог Т. П., Краснопецева Н. В., Гринберг Т. А., Власов С. А., Воцелко С. К., Малащенко Ю. Р. Изменение некоторых свойств экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования // Биотехнология.—1991.—№ 4.—С. 67—70.
12. Детерман Г. Гель-хроматография.—М.: Мир, 1970.—252 с.
13. Votsek S. K., Pirog T. P., Malashenko Y. R., Grinberg T. A. A method for determining the mass-molecular composition of microbial exopolysaccharides // *J. Microbiol. Meth.*—1993.—18.—P. 349—356.
14. Елинов Н. П. Химия микробных полисахаридов.—М.: Высшая школа, 1984.—254 с.
15. Методы химии углеводов / Под ред. Н. К. Кочеткова.—М.: Мир, 1967.—512 с.
16. Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов.—Киев: Наук. думка, 1982.—192 с.
17. Pat. USA 4234689 IC3 C 12 P 19/04. Production of  $\alpha$ -emulsans / D. L. Gutnick, E. Rosenberg, Y. Shabtai // *Publ.* 18.11.80.
18. Гринберг Т. А., Дерябин В. В., Пирог Т. П., Малащенко Ю. Р. Микробный синтез экзополисахаридов на  $C_1$ - $C_2$ -соединениях // Прикл. биохимия и микробиология.—1990.—26, № 4.—С. 445—455.
19. Пирог Т. П., Сенченкова С. М., Гринберг Т. О., Малащенко Ю. Р. Структура ацилированного экзополисахарида, синтезированного бактериями *Acinetobacter* sp. // Укр. биохім. журн.—2001.—73, № 3.—С. 71—79.
20. Пирог Т. П., Малащенко Ю. Р., Воцелко С. К. Двухстадийный способ получения микробного экзополисахарида этаполана с улучшенными реологическими свойствами // Прикл. биохимия и микробиология.—2001.—37, № 4.—С. 435—449.
21. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Буклова В. Н., Малащенко Ю. Р. Взаимоотношения микроорганизмов в экзополисахаридобразующей смешанной культуре // Микробиология.—1990.—59, № 5.—С. 797—805.
22. Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Супрун В. Н., Буклова В. Н., Загордонцев Л. А., Малащенко Ю. Р. Микробные ассоциации — продуценты экзополисахаридов на этаноле // Микробиол. журн.—1990.—52, № 6.—С. 30—34.
23. Мейнелл Д. Ж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология.—М.: Мир, 1967.—347 с.
24. Малащенко Ю. Р., Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Пинчук Г. Э. Регуляция синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на этаноле // Микробиол. журн.—1993.—55, № 2.—С. 35—41.

25. Пирог Т. П. Регуляция синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на этаноле: дис. ... канд. биол. наук.—Киев: Ин-т микробиологии и вирусологии НАН Украины, 1989.—189 с.
26. Готшалк Г. Метаболизм бактерий.—М., 1982.—310 с.
27. Малащенко Ю. Р., Соколов И. Г., Романовская В. А. Микробный метаболизм неростовых субстратов.—К.: Наук. думка, 1987.—192 с.
28. Пирог Т. П., Соколов И. Г., Кузьминская Ю. В., Малащенко Ю. Р. Некоторые особенности метаболизма этанола у мутантного штамма *Acinetobacter* sp., не образующего экзополисахариды // Микробиология.—2002.—71, № 2.—С. 222—229.
29. Пирог Т. П., Кузьминская Ю. В. Регуляция метаболизма ацетата у штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // Прикл. биохимия и микробиология.—2003.—39, № 2.—С. 180—188.
30. Пирог Т. П., Кузьминская Ю. В. Особенности центрального метаболизма штамма *Acinetobacter* sp., растущего на этаноле // Микробиология.—2003.—72, № 4.—С. 459—465.
31. Пирог Т. П., Коваленко М. А., Кузьминская Ю. В. Образование на углеводных субстратах экзополисахаридов штаммом *Acinetobacter* sp. и особенности его C<sub>6</sub>-метаболизма // Микробиология.—2002.—71, № 2.—С. 215—221.
32. Коваленко М. О. Синтез микробного экзополисахарида этаполана на смеси ростовых субстратов: дис. ... канд. биол. наук.—Киев: Ин-т микробиологии і вірусології НАН України, 2003.—136 с.
33. Пирог Т. П., Коваленко М. А. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахарида этаполана на смеси этанола и глюкозы // Междунар. конф. «Микробиология и биотехнология XXI столетия» (Минск, 21—25 мая 2002).—Минск, 2002.—С. 56—57.
34. Пирог Т. П., Коваленко М. А. Интенсификация синтеза микробного экзополисахарида этаполана на смеси энергетически неравноценных субстратов // VIII Украинский биохимический съезд (Черновцы, 1—3 октября 2002) // Укр. биохим. журн.—2002.—74, № 4.—С. 74.
35. Пирог Т. П., Коваленко М. А., Кузьминская Ю. В. Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. на смеси этанола и глюкозы // Микробиология.—2003.—72, № 3.—С. 348—355.
36. Пирог Т. П., Коваленко М. А., Кузьминская Ю. В., Криштаб Т. П. Интенсификация синтеза экзополисахарида этаполана на смеси ростовых субстратов // Микробиология.—2003.—72, № 1.—С. 26—32.
37. Eggeling L., Sahm H. Enhanced utilization-rate of methanol during growth on a mixed substrate: a continuous study with *Hansenula polymorpha* // Arch. Microbiol.—1981.—130.—Р. 362—365.
38. Egli Th., Kappeli O., Fiechter A. Regulatory flexibility of methylotrophic yeasts in chemostat cultures: simultaneous assimilation of glucose and methanol at a fixed dilution rate // Arch. Microbiol.—1982.—131.—Р. 1—7.
39. Babel W., Muller R. H. Mixed substrate utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics // J. Gen. Microbiol.—1985.—131.—Р. 39—45.
40. Пирог Т. П., Коваленко М. О. Використання мікроорганізмами суміші ростових та неростових субстратів // Мікробіол. журн.—2004.—66, № 6.—С. 80—100.
41. Пирог Т. П., Кузьминська Ю. В., Коваленко М. О. Метаболізм C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-субстратів в умовах міксотрофного росту штамів *Acinetobacter* sp. В-7005 та В-7005 (ІНГ) // Укр. біохім. журн.—2004.—76, № 1.—С. 33—38.
42. Brasen C., Schonheit P. Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea // Arch. Microbiol.—2001.—175.—Р. 360—368.
43. De Virgilio C., Burckert N., Barth G., Neuhaus J. M., Boller T., Wiemken A. Cloning and disruption of a gene required for growth on acetate but not on ethanol: the acetyl-coenzyme A synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae* // Yeast.—1992.—8.—Р. 1043—1051.
44. Kumari S., Tishet R., Eisenbach M., Wolfe A. J. Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli* // J. Bacteriol.—1995.—177.—Р. 2878—2886.
45. Корж Ю. В., Пирог Т. П. Регуляція C<sub>2</sub>-метаболізму у *Acinetobacter* sp. В-7005 — продуцента екзополісахариду етаполану // Вісн. Одеськ. нац. ун-ту, серія «Біологія».—2005.—10, № 3.—С. 51—57.
46. Sutherland I. W. Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides // Annu. Rev. Microbiol.—1985.—39.—Р. 243—270.
47. Margaritis A., Pace G. W. Microbial polysaccharides // Comprehens. Biotechnol.—Oxford. etc.: Pergamon press, 1985.—Vol. 3.—Р. 1005—1044.
48. Пирог Т. П., Кузьминська Ю. В. Вплив умов культивування мікроорганізмів — продуцентів екзополісахаридів на їхній синтез та фізико-хімічні властивості // Біополімери і клітина.—2003.—19, № 5.—С. 393—413.
49. Пирог Т. П. Образование ацилированных экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. // Микробиология.—1996.—65, № 5.—С. 644—648.
50. Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Сенченкова С. Н., Малащенко Ю. Р. Химический состав экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K<sup>+</sup> // Микробиология.—1995.—65, № 4.—С. 527—532.
51. Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Буклова В. Н., Воцелко С. К., Малащенко Ю. Р. Образование экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K<sup>+</sup> // Микробиология.—1995.—64, № 1.—С. 51—54.
52. Пирог Т. П. Влияние одновалентных катионов на образование ацилированных экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. // Микробиология.—1996.—65, № 5.—С. 639—643.
53. Пирог Т. П. Роль экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. в защите клеток продуцента от действия тяжелых токсичных металлов // Микробиология.—1997.—66, № 3.—С. 341—346.
54. Пирог Т. П. Роль экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в различных условиях культивирования, в защите клеток продуцента от действия Ba<sup>2+</sup> и Zn<sup>2+</sup> // Микробиол. журн.—1999.—61, № 5.—С. 64—71.
55. Пирог Т. П. Биологические функции экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. // Биополімери і клітина.—1998.—14, № 2.—С. 136—143.
56. Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Малащенко Ю. Р. Защитные функции экзополисахаридов, синтезируемых бактериями *Acinetobacter* sp. // Микробиология.—1997.—66, № 3.—С. 335—340.
57. Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Малащенко Ю. Р. Влияние факторов внешней среды на образование и свойства экзо-

- полисахаридов *Acinetobacter* sp. // Прикл. биохимия и микробиология.—1998.—34, № 1.—С. 70—74.
58. Малащенко Ю. Р., Романовская В. А., Соколов И. Г., Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Мучник Ф. В. Биология бактерий, ассимилирующих C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-соединения, и биотехнологические аспекты их использования // Микробиол. журн.—1998.—60, № 6.—С. 38—55.
59. Grinberg T. A., Pirog T. P., Malashenko Yu. R., Vlasov S. A. Ethapolan: A new microbial exopolysaccharide for oil industry // Energy & Fuels.—1995.—9.—P. 1086—1089.
60. Дробот В. И. Использование нетрадиционного сырья в хлебопекарной промышленности.—Киев: Урожай, 1988.—152 с.
61. Дробот В. И., Арсеньева Л. Ю., Гринберг Т. А. Структурно-механические свойства пшеничного теста и клейковины при использовании микробных полисахаридов // Изв. вузов. Пищевая технология.—1987.—№ 5.—С. 53—56.
62. Дробот В. И., Гринберг Т. А. Влияние микробных экзополисахаридов на структурно-механические свойства теста // Третий симпоз. соц. стран по биотехнологии (Братислава, 25—29 апреля 1983 г.): Сб. тез.—Братислава, 1983.—С. 221.
63. Коваленко М. О., Коваленко О. Г., Пирог Т. П. Антифіто-вірусна активність нативних та дезацильованих препаратів мікробного екзополісахариду етаполану // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Т. Шевченка.—2001.—Вип. 35.—С. 32—35.
64. А. с. 1726732 СССР, МКИ5 Е 21 В 33/138. Способ изоляции притока пластовых вод / С. А. Власов, Т. А. Гринберг, В. В. Дерябин, Ю. В. Капырин, Н. В. Краснопецева, Т. П. Пирог, Ю. Р. Малащенко, О. А. Московцев, А. М. Полищук, А. М. Потапов // Оpubл. 15.04.92.
65. Pat. 2090847 Britain, IC3 C 12 P 19/04. A two-stage continuous process for the production of gelable exopolysaccharide // Publ. 21.07.82.
66. Pat. 0112661 Eur. Pat., IC3 C 12 P 19/04. Fermentation process for the production of polysaccharide / V. G. Tolbot, P. D. Brouing // Publ. 04.07.84.
67. Souw P., Demain A. Z. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459 // Appl. Environ. Microbiol.—1979.—37.—P. 1186—1192.
68. Гвоздяк Р. И., Матышевская М. С., Григорьев Е. Ф., Литвинчук О. А. Микробный полисахарид ксантан.—Киев: Наук. думка, 1989.—212 с.

УДК 579.222:577.114  
Надійшла до редакції 24.10.05