ISSN 0233-7657. Біополімери і клітина. 2003. Т. 19. № 5

Вплив умов культивування мікроорганізмів — продуцентів екзополісахаридів на їхній синтез та фізико-хімічні властивості

Т. П. Пирог, Ю. В. Кузьмінська

Інститут мікробіології і вірусології НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

В огляді наведено літературні та власні експериментальні дані щодо впливу умов культивування продуцентів на синтез екзополісахаридів (ЕПС) і їхні фізико-хімічні властивості. Утворення мікробних ЕПС (кількість синтезованих полісахаридів, швидкість їхнього синтезу та вихід залежно від субстрату) обумовлено складом живильного середовища (природа джерела вуглецю, азоту, фосфору, їхня концентрація, співвідношення вуглець/азот, іони металів), способом подачі субстрату, фізико-хімічних факторів (температура, pH, рівень аерації), тривалістю процесу періодичного культивування, швидкістю розбавлення середовища при безперервному культивуванні. В різних умовах вирощування продуцента може змінюватися хімічний склад ЕПС, їхня молекулярна маса, а також співвідношення декількох полісахаридів, що впливає на реологічні властивості розчинів ЕПС, які визначають практичну значущість цих полімерів. Обговорюється питання про необхідність використання даних стосовно впливу умов культивування на синтез та фізико-хімічні властивості ЕПС у біотехнології мікробних полісахаридів при розробці технологій одержання ЕПС із стабільними заданими властивостями.

Вступ. Протягом останніх 20—30 років мікробні екзополісахариди (ЕПС) — високомолекулярні екзогенні продукти метаболізму мікроорганізмів — є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень. Здатність розчинів мікробних ЕПС до гелеутворення, емульгування, суспендування, змінення реологічних характеристик водних систем обумовила широке використання цих біополімерів в нафто- і гірничовидобувній, текстильній, харчовій, фармацевтичній та хімічній промисловості, сільському господарстві і медицині. Мікробні ЕПС мають ряд переваг порівняно з полісахаридами рослинного походження. Так, ці біополімери можна отримувати в потрібних об'ємах незалежно від пори року і кліматичних умов. Економічна доцільність використання мікробних ЕПС визначається їхньою позаклітинною природою і високою продуктивністю синтезу на дешевих субстратах. На відміну від хімічних полімерів (поліакриламіду) мікробні ЕПС стійкі до температурної, окисної, механічної деструкції, але піддаються біологічній деградації і є нетоксичними, що робить екологічно безпечним їхнє застосування, наприклад, в нафтовидобуванні.

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

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

Для утворення ЕПС другої групи також не-

© Т. П. ПИРОГ, Ю. В. КУЗЬМІНСЬКА, 2003

обхідна наявність специфічного вуглецевого субстрату, однак синтезовані ЕПС є гетерополісахаридами. На сьогоднішній день виявлено утворення такого ЕПС жовтозабарвленою псевдомонадою.

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

Четверта група мікробних ЕПС є найчисленнішою. Її представниками є гетерополісахариди, які складаються із структур з повторюваними блоками. До цієї групи відносять найдослідженіший мікробний ЕПС — ксантан, а також промислово цінні ЕПС — гелан і емульсан.

До п'ятої групи мікробних ЕПС відноситься бактеріальний альгінат. Цей гетерополісахарид складається з мономерів двох типів: D-мануронової і L-гулуронової кислот. На відміну від ЕПС четвертої групи в альгінаті немає повторюваних одиниць. Продуцентами альгінату є *Pseudomonas aeruginosa* і *Azotobacter vinelandii*. Бактеріальний альгінат відрізняється від альгінату з морських водоростей наявністю О-ацетильних груп, приєднаних до D-мануронової кислоти. Мікробні альгінати використовують в харчовій промисловості як замінники альгінатів з водорості.

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

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

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

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

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

Утворення ксантану культурою *X. campestris* спостерігається не лише на цих субстратах, але й при вирощуванні продуцента на середовищі з мальтозою, фруктозою, лактозою [12]. Збільшення виходу ксантану було досягнуте при додаванні до середовища, яке вміщує глюкозу або сахарозу, піруват (0,3 %), сукцинат (0,6 %) або α-кетоглутарат (0,4 %) [13]. Вищі концентрації органічних кислот пригнічували синтез ксантану.

Agrobacterium radiobacter NCIB 11883 синтезує ЕПС на середовищі, яке містить як джерело вуглецю глюкозу, сукцинат, глюконат, ксилозу, сорбіт, гліцерин, етанол [14], однак найвищий вихід ЕПС спостерігається при вирощуванні бактерій на глюкозі.

Бактерії *Azotobacter vinelandii* характеризуються високим рівнем біомаси при вирощуванні на середовищі з фруктозою, однак вихід альгінату при цьому є невисоким [15]. При використанні глюкози, маніту та мальтози кількість синтезованого альгінату зростає. Найвищі за рівнем біомаси та ЕПС показники було одержано при вирощуванні *A. vinelandii* на середовищі з сахарозою. Автори [16] також відзначають, що вихід альгінату залежить від природи джерела вуглецевого живлення. Так, у середовищі з нестачею фосфату синтез альгінату спостерігається при використанні як джерела вуглецю сахарози, але не сорбіту. Авторами встановлено, що при вирощуванні продуцента на середовищі з сорбітом відсутні деякі ферменти синтезу альгінату. У роботі [17] показано, що максимальна продукція альгінату відзначається на середовищі з глюкозою. Вихід альгінату знижується при додаванні до середовища ацетату натрію.

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

У літературі наведено відомості про синтез ЕПС галофільними бактеріями *Halobacterium mediterranei*, *H. volcanii* і *Halomonas eurihalina* [19, 20].

Глюкоза в концентрації 0,1—0,5 % стимулювала ріст *H. volcanii* і утворення ЕПС. З інших досліджених цукрів подібний ефект спостерігався при використанні сахарози та галактози [19]. *H. eurihalina* синтезує ЕПС не тільки на середовищі з глюкозою, але й з вуглеводнями, причому максимальний рівень ЕПС спостерігався при вирощуванні бактерій на глюкозі і гексадекані [20].

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

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

У 1970—1977 рр. з'явилися роботи, присвячені утворенню ЕПС на етиленгліколі та етанолі [24—28]. Так, штам *Arthrobacter simplix var. viscosus* при високій аерації за 72 год культивування трансформував 1,5 г етиленгліколю в 0,2 г полісахариду [24]. Автори [25] виділили з різних грунтів азотфіксуючі псевдомонади, які утилізують етанол, етиленгліколь, н-пропанол та утворюють високов'язкі полісахариди. *Alcaligenes faecalis* на мінеральних середовищах з етиленгліколем синтезував 6,2 г/л ЕПС, що складало ~ 28 % від заданого субстрату, а на н-парафінах вихід ЕПС становив 34—38 % [26—28]. Кількість ЕПС, синтезованих *Mycobacterium lacticolum* і *M. cyaneum* на н-алканах варіює у різних штамів та складає від 0,1 до 4,5 г/л [29, 30].

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

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

У деяких випадках саме метанол є найсприятливішим субстратом для синтезу ЕПС. Відомо культури, які утилізують різні джерела вуглецю, але здатні синтезувати ЕПС лише при вирощуванні на метанолі [53, 54].

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

Наші дослідження показали, що для синтезу етаполану — комплексного полісахаридного препарату (продуцент *Acinetobacter* sp. 12S) — може бути використаний широкий набір субстратів (етанол, ацетат, пропанол, піруват, C_4-дикарбонові кислоти, вуглеводи — моно- і дисахариди, крохмаль, меляса та ін.) [8, 58].

Ця властивість вигідно вирізняє продуцент етаполану від відомих мікробних синтетиків, які здебільшого синтезують ЕПС тільки при вирощуванні на вуглеводах. Здатність *Acinetobacter* sp. 12S до утворення ЕПС на C_2—C_6-сполуках дозволяє розробити універсальну гнучку технологію одержання полісахаридів на основі широкого набору вуглецевих субстратів або комплекс різних технологій, кожна з яких може бути реалізована в залежності від економічної доцільності, наявності та доступності того чи іншого субстрату, необхідності одержання ЕПС з певними фізико-хімічними властивостями.

Показано можливість інтенсифікації синтезу етаполану при вирощуванні продуцента на суміші двох енергетично нерівноцінних субстратів (етанол + глюкоза) [59]. На грунті теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу біомаси та ЕПС на енергетично дефіцитному субстраті (глюкоза) визначено «доповнюючу» концентрацію енергетично надлишкового субстрату (етанол), яка дозволяє поповнити втрати вуглецю глюкози при окисленні її до CO_2 з метою одержання енергії для процесів конструктивного метаболізму і підвищити ефективність конверсії вуглецю субстратів в ЕПС. Введення етанолу до середовища з глюкозою в молярному співвідношенні 3,1:1 дозволило збільшити кількість синтезованих ЕПС в 1,8—1,9 разу (до 7,5—8,0 г/л), їхній вихід стосовно біомаси — в 1,4—1,7 разу (до 3,8 г ЕПС/г біомаси), вихід ЕПС в залежності від субстрату — в 1,5—2 рази (до 62—65 %) порівняно з вирощуванням продуцента на моносубстратах.

Природа джерела азотного живлення. Як джерела азоту при одержанні мікробних полісахаридів зазвичай використовують кукурудзяні екстракти, соєве та бавовникове борошно, гідролізати дріж-

джів, а також мінеральні джерела — амонійні солі, нітрати, аміак [10].

При культивуванні продуцента альгінату *A. vinelandii* як джерело азотного живлення використовують газоподібний азот [60]. Ризобії синтезують ЕПС на середовищі, яке вміщує дріжджовий екстракт у концентрації до 3 г/л [61, 62]. Наявність дріжджового екстракту (0,5 %) в оптимізованому середовищі для культивування *Gluconobacter oxydans* Л-1 дозволила забезпечити вихід левану на рівні 95 % від теоретично можливого [63]. Вивчаючи вплив різних факторів на утворення альгінату бактеріями *A. vinelandii* встановили, що вихід ЕПС залежить від концентрації і типу органічного джерела азотного живлення, зокрема, від типу пептону [64]. Оптимізоване середовище, на якому спостерігається максимальний вихід глюкану (продуцент *Aureobasidium pullulans*), вміщує сечовину і пептон як джерела азоту [65].

Введення до середовища культивування *X. campestris* 8162 меляси дозволило не вносити додатково органічного джерела азоту [11, 66]. Для утворення емульсану середовище повинно містити азотвмісні компоненти (сульфат та хлорид амонію, нітрати або сечовину) в кількості, що переважає питому потребу культури, оскільки синтезований полімер складається в основному з похідних аміноцукрів [33]. При культивуванні метилотрофів — продуцентів ЕПС використовують мінеральні джерела азоту — амонійні солі [50, 54]. Для факультативних метилотрофів бажана наявність у середовищі дріжджового екстракту. Так, вихід ЕПС на середовищах з дріжджовим екстрактом складає 25—44, без нього — 10—20 % від субстрату. У присутності дріжджового екстракту кількість синтезованих метилотрофами ЕПС становить 3—5 г/л, без джерела факторів росту — лише 1—2,5 г/л. Для утворення ЕПС дріжджами *Rhodotorula acheniorum* найсприятливішим джерелом азоту є сульфат амонію [67]. Синтез етаполану відбувається в присутності як органічного, так і неорганічного азоту, однак більш корисними є мінеральні джерела (амонійні, нітратні, амонійно-нітратні) [8].

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

Лінтон зі співавт. [70] досліджували здатність бактерій *Methylophilus* sp. NC1B 12047, *Pseudomonas extorguens* NC1B 9399 та дріжджів *Pichia pastoris* синтезувати ЕПС на середовищі з метанолом. Встановлено, що лише *Methylophilus* sp. синтезував ЕПС в умовах лімітування азотом при хемостатному культивуванні. Оптимальним для синтезу ЕПС було співвідношення метанол:сульфат амонію, що дорівнювало 10:1. Два інших досліджуваних мікроорганізми реагували на ліміт азоту збільшенням окислення метанолу до CO_2 [70].

Досліди з хемостатною культурою *Pseudomonas mendocina* продемонстрували, що найефективнішою умовою утворення альгінату є лімітування азотом, причому із його зростанням синтез альгінату підвищується [71]. При N-лімітуванні бактерій *Pseudomonas aeruginosa* в безперервній культурі також збільшується вихід альгінату [72]. Мутант метилотрофної бактерії *Methylobacterium rhodesianum* при лімітуванні азотом утворює меншу кількість внутрішньоклітинного поліоксибутирату, а синтез ЕПС при цьому збільшується в 10 разів [52]. При низьких швидкостях розбавлення середовища ($D < 0{,}1$ год$^{-1}$) в умовах лімітування азотом зростає вихід курдлану [73]. Однак при підвищенні значень D синтезувався інший ЕПС.

Виявилося несподіваним, що при лімітуванні вуглецем бактерії *A. vinelandii* синтезували ЕПС з такою ж високою швидкістю, як і в умовах лімітування іншими субстратами [4]. Аналогічні результати одержано при культивуванні *X. campestris* в умовах лімітування росту вуглеводами. В той же час при ліміті глюкози не спостерігали синтезу ЕПС бактеріями *Pseudomonas* sp., а при лімітуванні амонієм 43 % використаної глюкози перетворювалися в полісахарид, концентрація якого досягала 7,5 г/л.

Слід зазначити, що культивування продуцентів ЕПС у хемостаті при лімітуванні вуглецем найчастіше призводить до появи немукоїдних варіантів і виродження культури як продуцента ЕПС [1]. Однак в літературі є відомості про те, що в безперервній культурі ($D = 0{,}05$ год$^{-1}$) на NH_4-лімітованому середовищі також можливе виникнення немукоїдних варіантів [74]. Так, при культивуванні *P. aeruginosa* в таких умовах упродовж 12 днів кількість синтезованого альгінату і процентний вміст мукоїдних клітин знижувалися практично до нуля. При цьому спостерігалося падіння активності ферментів, які беруть участь у синтезі альгінату.

Потрібно також зауважити, що дуже низький вміст азоту в середовищі культивування продуцентів ЕПС спричинює зменшення рівня біомаси,

змінення фізіологічного стану клітин та зниження виходу ЕПС від субстрату, хоча вихід ЕПС стосовно біомаси може збільшуватися [1].

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

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

Дослідження особливостей метаболізму етанолу у продуцента етаполану показало, що при концентрації субстрату в середовищі вище 1 % (за об'ємом) спостерігається накопичення в ньому ацетату, що призводить до пригнічення росту та синтезу ЕПС [77]. Встановлено, що проміжні продукти окислення етанолу та ацетальдегіду (НАДН і НАДФН) є інгібіторами активності ацетил-КоА-синтетази — ферменту, за допомогою якого ацетат залучається до метаболізму. Зниження початкової концентрації етанолу до 0,5 % з наступним дрібним внесенням субстрату в процесі культивування бактерій дозволило інтенсифікувати ріст бактерій і утворення ЕПС. Для проведення біохімічних досліджень продуценту етаполану використовували мутантний штам бактерій, який не синтезує ЕПС, оскільки клітини ЕПС-утворюючого штаму неможливо було відділити від високов'язкого полісахариду з великою молекулярною масою. Результати досліджень регуляції ацетил-КоА-синтетази у мутантного штаму було використано для вдосконалення технології одержання етаполану на основі етанолу.

Вплив способу подачі субстрату на вихід ЕПС описаний для вуглеводокислюючих бактерій *Xanthomonas* [12], *Alcaligenes* [73] і гриба *Aureobasidium* [78]. Збільшення виходу ксантану було досягнуто при поступовому додаванні глюкози з постійною швидкістю до концентрації її в середовищі 7 %. Зростання швидкості утворення курдлану спостерігалося при додатковому внесенні наприкінці експоненційної фази росту *Alcaligenes faecalis* глюкози до кінцевої концентрації 6 %. Вихід пулулану вдалося підвищити в два рази (до 58 г/л) при дворазовому внесенні сахарози (по 2,5 %) у процессі культивування продуцента при початковій концентрації субстрату 5 %. Максимальна швидкість синтезу глюкану у *Schizophyllum commune* та *Sclerotium glucanicum* досягається за умов періодичного культивування шляхом періодичної подачі субстрату [79].

Джерела фосфору. Як джерела фосфору звичайно використовують одно- та двоосновні фосфати калію і натрію При культивуванні метилотрофів з метою одержання ЕПС японські дослідники рекомендують середовище з високим вмістом фосфорних солей: KH_2PO_4 — 5,5 і Na_2HPO_4 — 10,0 г/л [80]. Використання фосфорних солей в таких концентраціях дозволило іншим авторам провести виділення і відбір продуцентів ЕПС, а також забезпечило високий рівень синтезу ЕПС як у моно-, так і змішаних культур мікроорганізмів [43, 81].

Використання гліцерофосфату натрію, який краще засвоюється бактеріями в порівнянні з неорганічними фосфорними солями, призвело до збільшення виходу ЕПС у *Methylomonas mucosa* [82]. Гліцерофосфат натрію як єдине джерело фосфору або в поєднанні з неорганічними солями попереджує втрати інгредієнтів поживного середовища, які утворюють нерозчинні осади при стерилізації, а також менше залужнює середовище порівняно з неорганічними фосфатами. Використання гліцерофосфату в середовищі культивування *P. aeruginosa* — продуцента альгінату описано також у роботі [83]. Автори відзначають, що лімітування фосфатом пригнічувало синтез альгінату. Однак при знятті лімітування додаванням однакової кількості (24 ммоль) KH_2PO_4, гліцерофосфату або фосфорилхоліну найпомітніша стимуляція біосинтезу альгінату (до 6 г/л) спостерігалася для фосфорилхоліну (в 3 рази вища, ніж при використанні інших сполук).

У роботі [84] відзначено, що синтез альгінату підвищується в 4 рази при зниженні вмісту фосфатів в середовищі до 0,1—0,8 ммоль, тобто майже в 10 разів у порівнянні з кількістю цих солей, використаною іншими дослідниками. У деяких випадках при кількості фосфатів вище 0,5 і нижче 0,2 ммоль має місце зниження синтезу ЕПС метилотрофними бактеріями [85]. Досить низькі концентрації фосфору в середовищі бажані при культивуванні бактерій роду *Klebsiella* — продуцентів ЕПС [86]. У той же час вихід ЕПС *Pseudomonas* sp. GSP-910 збільшується при підвищенні вмісту фосфатів у середовищі до 80 ммоль [87]. При вивченні впливу різних факторів на утворення альгінату і поліоксибутирату штамом *A. vinelandii*

в періодичній культурі виявлено, що при високій концентрації фосфатів у середовищі (7,5 г/л) збільшується вихід альгінату (до 6,5—7 г/л), а вміст поліоксибутирату зменшується до 40 % і становить 1 г/л [64].

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

На процес синтезу ЕПС в деяких випадках суттєво впливають іони Fe^{3+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}. Так, додавання марганцю (500 мкмоль) у середовище культивування *Rhizobium meliloti* призводить до збільшення кількості синтезованих ЕПС більш ніж в 4 рази (до 2,5 г/л) [88]. У разі присутності 100 мкмоль хлориду марганцю або сульфату алюмінію кількість ЕПС, утворюваних *Rhizobium trifolii* при вирощуванні на рідкому манітно-дріжджовому середовищі, підвищується на 12 і 7 % відповідно [89]. Дію іонів марганцю на синтез ЕПС ризобіями відзначено також у роботі [90]. На думку авторів, іони марганцю та алюмінію впливають на активність ферментів, які беруть участь у синтезі ЕПС у ризобій [89].

Експериментальні дані, одержані Гвоздяком та співавт. [66], показали, що внесення мікроелементів (у певній концентрації і поєднанні) збільшує вихід і покращує тиксотропні властивості ксантану. Лі та співавт. [91] встановили, що додавання іонів заліза (III) до періодичної культури *X. campestris* супроводжувалося підвищенням рівня біомаси і зниженням синтезу ксантану. Вихід ксантану значно зростав у присутності цинку і магнію [92]. Збільшення вмісту заліза від 0 до 50 мкмоль у середовищі культивування *Azotobacter chroococcus* B-8 корелювало із зниженням виходу ЕПС в 16 разів [93]. У той же час деякі метилотрофні бактерії — продуценти ЕПС — характеризуються вищою активністю синтезу полісахаридів за наявності в середовищі 5—10 мг/л заліза [5, 6, 50, 51, 76]. Для кращого засвоєння іонів заліза до середовища додають хелатуючі агенти — лимонну і 2,3-дигідробензойну кислоти, ЕДТА. Оптимальна концентрація хелатуючих агентів складає 0,0001—0,02 %.

При дослідженні впливу кальцію (0,068—2,72 ммоль) на утворення альгінату бактеріями *A. vinelandii* і *P. aeruginosa* встановлено, що низькі концентрації пригнічують ріст, особливо при високих швидкостях розбавлення середовища [94]. Із збільшенням концентрації Ca^{2+} в культуральному середовищі синтез альгінату підвищується; при цьому спостерігається також покращання його реологічних властивостей. Автори вважають, що утворення більш гетерополімерних структур у цьому випадку обумовлене позаклітинною епімеризацією альгінату (зокрема, ізомеризацією полімануронової кислоти до гулуронової), на яку впливає кальцій [94, 95]. Підвищення синтезу альгінату бактеріями *P. aeruginosa* спостерігалося при збільшенні вмісту Mg^{2+} в середовищі [7].

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

Стимулюючу дію іонів Fe^{3+} на синтез пулулану відзначено в роботі [97]. Для синтезу емульсану *A. calcoaceticus* необхідна наявність у середовищі двовалентних катіонів Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} в кількості 1—100 ммоль [33].

Температура і pH. Температура і pH середовища, оптимальні для росту продуцента, здебільшого є оптимальними і для синтезу ЕПС. У ряді випадків зниження температури нижче оптимальної супроводжується збільшенням концентрації ЕПС [3, 81, 98], що можна розглядати як прояв захисних функцій ЕПС у відповідь на неоптимальні умови існування продуцента. Крім того, цілком можливо, що в деяких мікроорганізмів температурний оптимум ферментів, які беруть участь в утворенні (чи полімеризації) ЕПС, відрізняється від оптимуму ферментів, що використовують для синтезу біомаси. У *Pseudomonas* sp. GSP-910 оптимум температури для синтезу ЕПС складає 25 °С, для росту — 18 °С [87]. Для мутантного термофільного штаму *Methylomonas methanolica* оптимальною для синтезу ЕПС є температура 37 °С, для росту — 35 °С [99].

Автори роботи [100] виявили, що при безперервному культивуванні *Pseudomonas* sp. NC1B 11264 концентрація біомаси залишається однаковою в діапазоні температури 20—37,5 °С, тоді як ефективність перетворення глюкози в полісахарид і в'язкість культурального середовища суттєво змінюються. Максимум утворення ЕПС спостерігається при 30 °С.

Для мікроорганізмів — продуцентів ЕПС на метані має велике значення термотолерантність, оскільки ріст на метані супроводжується виділенням більшої кількості тепла, ніж на метанолі [56]. Зниження температури культивування *Methylococcus thermophilus* нижче оптимальної корелює із збільшенням виходу ЕПС [43]. Температура культивування продуцентів гелану та склероглюкану впливає на вихід ЕПС [68, 101]. Із падінням температури спостерігається утворення побічних продуктів: щавелевої, яблучної і фумарової кислот [101, 102]. Процес утворення ЕПС у гало- і термотолерантних бактерій роду *Bacillus* є термозалежним [103]. Молочнокислі бактерії *Lactococcus lactis* синтезують два ЕПС — нейтральний і кислий [104]. В умовах хемостатного культивування утворення нейтрального ЕПС знижується з підвищен-

ням температури (з 65 мкг/мл при 25 °С до 18 мкг/мл при 30 °С). Концентрація кислого ЕПС (10 мкг/мл) не змінюється в діапазоні температур 20—30 °С.

Синтез ЕПС у мікроорганізмів є більш чутливим до змін pH, ніж синтез біомаси. Підтримання постійним значення pH (на рівні 7,0) упродовж процесу культивування *Pseudomonas* sp. EPS-5028 сприяло підвищенню виходу ЕПС [105]. При культивуванні *A. vinelandii* pH середовища знижується до кінця процесу з 7,4 до 5,5 [84]. Вирощування бактерій в умовах постійного значення pH, рівного 7,0—8,2, призводило до зростання кількості синтезованих ЕПС в 2—3 рази.

Для створення оптимального для синтезу альгінату значення pH рекомендують введення до середовища культивування буфера, наприклад, трис-(гідроксиметил)-амінометану. Підвищення виходу ЕПС при культивуванні метилотрофних бактерій на середовищі Кодама [80] також обумовлене постійним нейтральним значенням pH упродовж процесу внаслідок наявності в середовищі фосфатного буфера.

У періодичній культурі *Aureobasidium pullulans* кількість дріжджоподібних клітин збільшується при підвищенні початкового значення pH від 3,5 до 6,0 [106]. Одночасно зростає кількість синтезованого пулулану, тоді як рівень біомаси не змінюється. Крім того, при підтриманні pH в межах 5,0—6,3 синтез меланіну клітинами є мінімальним, що значно полегшує очищення пулулану. Як і в умовах періодичної культури, при хемостатному культивуванні *A. pullulans* морфологія клітин визначається величиною pH середовища: низькі значення є сприятливими для утворення ниткоподібних форм [107]. Оптимальним для біосинтезу пулулану було значення pH 4,5, при якому культура вміщувала 50 % дріжджоподібних і 50 % ниткоподібних клітин. Автори вважають, що в хемостатній культурі ниткоподібні клітини також синтезують пулулан при низьких значеннях pH середовища. З підвищенням pH рівень біомаси збільшується, але вихід пулулану зменшується.

При культивуванні *Lactobacillus casei* CRL 87 в умовах постійного значення pH середовища, рівного 6,0, кількість синтезованих ЕПС була максимальною і складала 488 мг/л [108]. Однак вихід ЕПС по відношенню до одиниці біомаси був найбільшим при pH 4,0.

У літературі відзначається стимулююча дія органічних кислот (пірувату, цитрату, сукцинату, α-кетоглутарату) на утворення ксантану бактеріями *X. campestris* [13]. Автори вважають, що дія органічних кислот пов'язана із встановленням сприятливого для синтезу ксантану значення pH. Аналогічний ефект має місце при введенні до середовища культивування *X. campestris* фумарової кислоти [66]. У цьому випадку спостерігається збільшення виходу ксантану з 6,0 до 9,1 г/л.

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

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

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

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

При вивченні впливу умов культивування на ріст і утворення ЕПС *Acinetobacter* sp. 12S встановлено, що на початку процесу бактерії є чутливими до високих концентрацій розчиненого кисню. Так, рівень pO_2 не повинен перевищувати 20—30 % насичення повітрям (при концентрації розчиненого кисню в середовищі понад 40 % спостерігається уповільнення, а понад 50 % — пригнічення росту культури) [8, 110]. Додавання синтетичного антиоксиданта іонолу (0,01 %) до середовища при вирощуванні *Acinetobacter* sp. 12S у ферментаторі в умовах високої концентрації розчиненого кисню (50 % насичення) супроводжувалося відсутністю лаг-фази, збільшенням швидкості росту бактерій і синтезу ЕПС, скороченням тривалості культивування.

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

вах високих концентрацій розчиненого кисню (70—80 % насичення) відзначалося підвищення максимальних питомих швидкостей росту і синтезу ЕПС, а також зміщення часу їхнього досягнення в бік ранньої ростової фази. Очевидно, за таких умов захист клітин від токсичної дії кисню зумовлений високою (15—20 %) концентрацією інокуляту із стаціонарної фази росту (високов'язкого культурального середовища, що містить ЕПС). На нашу думку, це явище можна розглядати як прояв адаптивних механізмів, які дозволяють популяції вижити в несприятливих умовах.

Із збільшенням швидкості перемішування від 200 до 800 об/хв вихід пулулану підвищувався в 4 рази [111]. Наявність взаємозв'язку між рівнем аерації, морфологічними формами продуцента і біосинтезом пулулану відзначається в роботі [112]. Вихід альгінату також у значній мірі залежить від концентрації розчиненого кисню в середовищі культивування продуцента [64, 71]. При високій концентрації кисню спостерігається зниження швидкості синтезу альгінату. За таких умов більша частина вуглецю перетворюється в CO_2. При нестачі кисню вихід ЕПС також знижується, при цьому в клітинах *A. vinelandii* накопичується надлишок полі-β-гідроксибутирату. Так, у періодичній культурі на безазотному середовищі при швидкості перемішування 120 об/хв вихід альгінату складав лише 1 г/л, а кількість полі-β-гідроксибутирату перевищувала 50 % біомаси [64]. При збільшенні швидкості перемішування до 280 об/хв вихід альгінату підвищувався до 6,5—7,0 г/л; вміст полі-β-гідроксибутирату в клітинах знижувався до 30 %.

Можливість регуляції біосинтезу ЕПС шляхом змінення рівня аерації (з використанням різних типів мішалок і способів перемішування) показано в роботах Рац та співавт. [79] і Осадчої та співавт. [113]. Дослідження синтезу ксантану при культивуванні продуцента у ферментаторі показало, що максимальний вихід ЕПС спостерігався при швидкості перемішування 150 об/хв в перші 48 год і 280 об/хв упродовж решти часу, необхідного для досягнення найвищої в'язкості [114]. Встановлено, що оптимальна аерація складає 0,5 л/л середовища за 1 хв, а швидкість споживання кисню варіює від 0,4 ммоль O_2/л за 1 хв при швидкості перемішування 150 об/хв до 1,5 ммоль O_2/л за 1 хв при 280 об/хв.

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

Як показано Лінтоном та співавт. [70], при культивуванні *Methylophilus* sp. в умовах лімітування киснем полісахарид утворюється в низьких концентраціях, однак при збільшенні лімітування концентрація ЕПС у культуральному середовищі підвищується. Утворенню ЕПС *Methylomonas methanolica* MV 13 сприяє висока температура культивування, низька швидкість росту і лімітування киснем [99]. Причому кисень є найсуттєвішим лімітуючим фактором для максимального виходу ЕПС при надлишку вуглецю і азоту як у безперервному, так і в періодичному процесі культивування продуцента. В роботі [46] показано, що *M. methylotrophus* при безперервному культивуванні в умовах нестачі метанолу синтезує ЕПС зі швидкістю 18 мг·год$^{-1}$·г$^{-1}$ біомаси. При лімітуванні росту бактерій киснем або азотом цей показник збільшується в 3 і 4 рази відповідно.

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

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

Культивування продуцентів ЕПС у періодичному та безперервному режимах. У мікроорганізмів — продуцентів ЕПС синтез полісахаридів може бути тісно пов'язаним з ростом, наприклад, у *Methylocystis parvus* OBBP [54], частково пов'язаним — *Xanthomonas*, *Methylomonas methanolica* [1, 99], і не пов'язаним — *Alcaligenes*, *Rhizobium* [1, 119].

У більшості мікроорганізмів час досягнення максимальної питомої швидкості росту і синтезу ЕПС не збігається. Як правило, максимальна

швидкість синтезу ЕПС спостерігається наприкінці експоненційної—початку стаціонарної фази росту. Однак концентрація ЕПС у культуральному середовищі досягає найвищого значення в кінці періодичного процесу, тобто в стаціонарній фазі. В залежності від умов культивування тривалість періодичного процесу для різних продуцентів ЕПС складає від 24 до 120 год.

Визначення фази росту продуцента, в якій швидкість синтезу ЕПС є максимальною, а також фази росту, де досягається максимальна концентрація ЕПС, дозволить встановити оптимальну тривалість процесу при періодичному культивуванні. Зіставлення часу досягнення максимальної швидкості росту і синтезу ЕПС робить можливим визначення оптимальної швидкості розбавлення середовища при безперервному культивуванні. Оскільки максимальна швидкість синтезу ЕПС у продуцентів здебільшого не збігається в часі з максимальною швидкістю їхнього росту, можна передбачити, що для оптимального виходу ЕПС вести безперервний процес при високих швидкостях розбавлення середовища недоцільно.

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

Показано, що швидкість утворення ЕПС метилотрофним штамом *M. methanolica* M13V є максимальною наприкінці експоненційної фази росту і поступово знижується у фазі сповільненого росту [99]. Однак кількість синтезованих ЕПС та їхній вихід зростають після припинення росту.

Утворення ЕПС у *Methylocystis parvus* ОВВР починалося і закінчувалося майже в той же час, що й ріст культури. Однак в'язкість культурального середовища суттєво підвищувалася в стаціонарній фазі росту (від 160 до 900 мПа/с) [54].

В облігатних метанокислюючих бактерій *Methylococcus* sp. і *M. thermophilus* максимальна швидкість синтезу ЕПС спостерігається у фазі сповільненого росту, концентрація ЕПС у культуральному середовищі досягає максимуму в стаціонарній фазі [8, 43]. Показано, що умови культивування, а також спосіб одержання інокуляту дозволяють зсунути час досягнення максимальної швидкості утворення ЕПС у бік більш ранньої ростової фази, що дає можливість скоротити тривалість культивування продуцента для одержання максимальної кількості ЕПС [8].

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

При вивченні хемостатного культивування *P. aeruginosa* (в умовах лімітування азотом) встановлено, що синтез альгінату не залежить від швидкості розбавлення середовища в межах значень $D = 0{,}05—0{,}1$ год$^{-1}$ [72]. Питома швидкість утворення ЕПС зростала при підвищенні швидкості розбавлення. Однак при тривалому культивуванні за таких умов штам з великою частотою дисоціював і утворював немукоїдні варіанти. В роботі Вільямса та співавт. [74] відзначається, що поява немукоїдних варіантів *P. aeruginosa* спостерігається також при вирощуванні бактерій на N-лімітованому середовищі при низьких швидкостях розбавлення (0,05 год$^{-1}$). Досліди з хемостатною культурою *P. mendocina* продемонстрували, що оптимальна швидкість розбавлення середовища для синтезу альгінату складає 0,05 год$^{-1}$ [71]. У таких умовах при ліміті азоту вихід альгінату складав 64 %, тоді як при лімітуванні вуглецем — лише 23,7 %. *A. vinelandii* характеризується високим рівнем синтезу альгінату при значеннях $D = 0{,}05—0{,}25$ год$^{-1}$, швидкість синтезу ЕПС у вказаних межах значень D практично постійна, вихід альгінату з сахарози варіює в залежності від лімітуючого джерела живлення [120, 121].

Максимальний синтез ЕПС бактеріями *Agrobacterium radiobacter* NC1B при безперервному культивуванні в умовах лімітування азотом спостерігається при низьких швидкостях розбавлення (0,04—0,08 год$^{-1}$) [14]. Найвищий вихід курдлану у безперервному процесі при лімітуванні азотом відзначається при швидкостях розбавлення середовища менше 0,1 год$^{-1}$ [73]. Для *X. campestris* також показано, що швидкість утворення ксантану є функцією ступеня розбавлення середовища [7, 66, 122]. Аналогічні закономірності встановлено для C_1-окислюючих [46, 99], а також для молочнокислих бактерій [123].

Вплив умов культивування на склад і властивості мікробних ЕПС. Умови культивування впливають не лише на такі показники процесу, як кількість ЕПС, швидкість їхнього утворення, вихід ЕПС залежно від субстрату, але й на фізико-хімічні властивості синтезованих ЕПС.

Важливою характеристикою мікробних ЕПС є реологічні властивості їхніх розчинів, які значною мірою обумовлені якісним і кількісним складом полісахаридів. Відмінності в реологічних характеристиках ЕПС, синтезованих одним продуцентом, можуть бути пояснені його здатністю синтезувати декілька різних за фізико-хімічними властивостями полімерів, а також зміненням кількості бокових замісників у складі ЕПС в залежності від умов

культивування [7, 54, 117, 124, 125]. Крім того, в процесі безперервного культивування можливе виникнення варіантів продуцентів, які продукують ЕПС з різними властивостями (*X. campestris*, *A. vinelandii*) [1]. На фізико-хімічні властивості мікробних ЕПС в значній мірі діють такі фактори, як тривалість ферментації, склад середовища, спосіб подачі субстрату, рівень аерації та ін. Таким чином, дослідження впливу умов культивування продуцента на склад та властивості синтезованих ЕПС є одним з першочергових завдань біотехнології мікробних ЕПС.

Хімічний склад ЕПС. На відміну від внутрішньоклітинних полісахаридів, генетична інформація про біосинтез ЕПС часто буває локалізована в плазмідах, що, можливо, є причиною лабільності іхнього синтезу [126].

Від структурно-метаболічних і структурних полісахаридів клітинної стінки ЕПС відрізняються тим, що в одного й того ж продуцента їхній склад залежить від умов культивування. При цьому основний ланцюг полісахариду найчастіше залишається незмінним, а найбільших змін зазнають бокові ланцюги — їхня довжина, склад, число розгалужень, а також склад і природа замісників — ацильних залишків, О-метильних груп, залишків піровиноградної та інших оксикислот, сульфатів і фосфатів. Склад мікробних ЕПС в значній мірі піддається впливу таких факторів, як тривалість ферментації, склад середовища, спосіб подачі субстрату і його природа, ступінь розбавлення середовища та тип лімітуючого фактора.

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

Вміст пірувату в складі ксантану може варіювати від 0 до 7,5 % залежно від складу середовища і штаму [2, 7, 96, 116, 117, 124, 129—131]. Ксантан з низьким вмістом пірувату одержують при зниженні концентрації азоту в середовищі і невисокому рівні аерації [130]. Так, при концентрації $(NH_4)_2HPO_4$ в середовищі 0,1 % і аерації 0,25 л/л середовища за 1 хв вміст залишків пірувату в ксантані складає 2 %. Введення до середовища K_2HPO_4 і підвищення аерації до 1,5 л/л середовища за 1 хв супроводжується синтезом високов'язкого ксантану, який містить більш як 4 % пірувату [117]. Вихід ксантану від заданого субстрату в обох випадках був однаковим і становив 50—60 %.

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

У роботах [114] і [122] наведено дані щодо змінення в'язкості розчинів ксантану під час періодичного і безперервного культивування продуцента. При одностадійному способі безперервного культивування в'язкість розчинів ксантану зменшувалася по мірі підвищення швидкості розбавлення середовища, в той час як швидкість утворення ксантану зростала. Очевидно, причинами зростання швидкості синтезу ЕПС у цьому випадку є більш ефективне перемішування і масоперенос, що мають місце при низьких значеннях в'язкості культурального середовища, тобто при високій швидкості його розбавлення.

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

Реологічні властивості альгінату обумовлені не лише співвідношенням у його складі гулуронової та манурової кислот, але і вмістом О-ацетильних груп. Показано, що альгінат, який практично не містить гулуронової кислоти, характеризується високим вмістом О-ацетильних груп [95], тобто ацетильованими є, в основному, залишки манурової кислоти. Однак до теперішнього часу остаточно не вияснено вплив умов культивування на вміст ацетильних груп в альгінаті та його реологічні власти-

вості. Зокрема, при культивуванні продуцента на середовищі з низьким вмістом кальцію не вдалося одержати високоацетильований альгінат.

При культивуванні бульбочкових бактерій роду *Rhizobium* у присутності марганцю або алюмінію спостерігали зміни в хімічному складі синтезованих ЕПС [89, 90]. Так, додавання 100 мкмоль хлориду марганцю чи сульфату алюмінію до середовища культивування *Rhizobium trifolii* супроводжувалося збільшенням у складі синтезованих ЕПС вмісту D-глюкози на 24—32 % і зниженням залишків уронових кислот на 25—35 % [89]. На думку автора, іони марганцю і алюмінію впливають на активність ферментів, які беруть участь в синтезі ЕПС у ризобій. У присутності 40 мкмоль марганцю штам бульбочкових бактерій синтезував ЕПС із зниженим вмістом уронової кислоти і невуглеводних компонентів, але з підвищеним вмістом глюкози [90].

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

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

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

Склад і фізико-хімічні властивості ЕПС, синтезованих фітопатогенною бактерією *Clavibacter michiganense* [139], бактеріями *Volcaniella eurihalina* [140], *B. polymyxa* [141], молочнокислими бактеріями *Lactobacillus delbrueckii*, змінюються залежно від умов культивування [142]. Так, наприклад, при вирощуванні *Bacillus polymyxa* на середовищах з різними джерелами азоту (дріжджовий автолізат, пептон, білково-вітамінний концентрат, сульфат амонію) співвідношення нейтральних моносахаридів у складі поліміксану практично не змінюється, однак вміст уронових кислот варіює в широких межах — від 9 до 35 % [141]. Автори відзначають, що поліміксани з різним вмістом уронових кислот характеризуються різною в'язкістю розчинів.

При вивченні впливу умов культивування *Acinetobacter* sp. 12S на склад етаполану встановлено, що в залежності від природи джерела вуглецю та концентрації катіонів калію в середовищі вміст в ЕПС залишків піровиноградної кислоти варіює (у відсотках до маси умовно сухої речовини) від 3,0 до 4,3; уронових кислот — від 15,3 до 22,5; жирних кислот — від 1,8 до 6,5 [8, 143, 144]. Молярне співвідношення глюкози, манози, галактози та рамнози у складі всіх ЕПС залишається незмінним і становить 3:2:1:1. При вирощуванні продуцента на суміші етанолу та глюкози хімічний склад ЕПС не відрізнявся від синтезованого на моносубстратах, однак вміст жирних кислот у складі ЕПС був найвищим на змішаному субстраті [145].

Молекулярна маса ЕПС. Одним із факторів, які визначають реологічні властивості розчинів мікробних ЕПС, є молекулярна маса цих полімерів, величина якої варіює в залежності від умов культивування продуцента. Так, вивчення впливу умов культивування (заміна джерела вуглецевого живлення, зміна pH) на утворення і властивості ЕПС дріжджів *Bullera alba* показало, що синтезовані ЕПС мали однаковий моносахаридний склад, але різну молекулярну масу [146]. Зміна складу поживного середовища при культивуванні *Pseudomonas viscogena* супроводжувалася підвищенням виходу ЕПС, однак при цьому зменшувалась його молекулярна маса [147]. При культивуванні облігатного метилотрофа *Methylomonas parvus* ОВВР

біосинтез біомаси та ЕПС починався і закінчувався одночасно, однак у стаціонарній фазі росту при постійній концентрації полісахариду в'язкість культурального середовища збільшувалася в 6 разів. Припускається, що це явище обумовлене структуруванням розчинів ЕПС і підвищенням його молекулярної маси [54]. Величина молекулярної маси ЕПС, синтезованих молочнокислими бактеріями *Lactococcus lactis* у безперервному процесі, залежить від природи лімітуючого фактора [123]. Із збільшенням тривалості культивування *Aureobasidium pullulans* молекулярна маса ЕПС знижується [148].

Слід відзначити, що питання про те, чи існує зв'язок між швидкістю росту мікроорганізмів і молекулярною масою синтезованих полісахаридів, на сьогоднішній день практично не досліджене. Відомі поодинокі роботи, присвячені його вивченню. Так, показано, що *Salmonella enteritidis* при високій швидкості росту продукує ліпополісахарид з більш короткими ланцюгами О-антигену [1]. Можливо, аналогічні закономірності характерні і для ЕПС. Еванс та співавт. [127] показали, що ксантан, синтезований *Xanthomonas juglandis* при низьких швидкостях розбавлення середовища (D = = 0,03 год$^{-1}$), складається з довших нерозгалужених молекул, ніж полісахарид, одержаний при високих швидкостях розбавлення.

Незважаючи на те, що для багатьох ЕПС досить добре вивчено залежність реологічних властивостей розчинів від величини молекулярної маси, до сьогоднішнього часу не вдалося одержати ЕПС з заданою молекулярною масою. Так, молекулярна маса хітозану і пулулану варіює в досить широких межах (від 200 тис до 4 млн) залежно від складу середовища, тривалості культивування, pH, аерації [149]. Потрібні додаткові дослідження для виявлення залежності між умовами культивування продуцента, швидкістю його росту і молекулярною масою синтезованих полісахаридів.

В результаті наших досліджень показано, що в процесі періодичного культивування *Acinetobacter* sp. залежно від початкової концентрації одновалентних катіонів у середовищі в складі синтезованого етаполану змінюється співвідношення фракцій різної молекулярної маси, що призводить до зміни реологічних властивостей розчинів ЕПС [143, 150, 151].

У деяких випадках продуценти ЕПС синтезують позаклітинні ферменти, які розщеплюють свій власний ЕПС, в результаті чого знижується їхня молекулярна маса і в'язкість культурального середовища. Пригнічення активності альгінатліази при культивуванні *A. vinelandii* залишається однією з основних проблем економічного виробництва високомолекулярних мікробних альгінатів. Найефективнішим засобом проти зниження в'язкості альгінатів стало внесення до середовища культивування протеолітичних ферментів, які розщеплюють альгінатліазу [117]. Подібні проблеми зустрічаються і при одержанні пулулану і ксантану.

Потрібно зазначити, що молекулярна маса мікробних ЕПС може змінюватися не лише в різних умовах культивування продуцента, але також у процесі виділення і очищення ЕПС. Так, наприклад, молекулярна маса поліміксану після осадження етанолом знижувалася майже у 8 разів [141]. Авторами запропоновано нетрадиційні методи виділення та очищенню ЕПС (електрокоагуляція, ультрафільтрація культурального середовища, обробка останнього протеазами), які дозволяють одержувати високомолекулярні (2—3 млн) ЕПС, розчини яких характеризуються високою в'язкістю.

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

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

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

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

Підвищення концентрації сахарози в середовищі культивування *Pseudomonas phaseolicola* супроводжується синтезом левану, в той час як на середовищах з глюкозою або глюконатом утворюється лише альгінат [153].

Співвідношення левану і альгінату, утворюваних *P. syringae pv. phaseolicola*, також залежить від умов культивування продуцента [154]. Додавання до середовища NaCl і етанолу корелює із збільшенням синтезу левану.

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

При низькій осмолярності (0 і 0,2 М) середовища культивування *R. meliloti* спостерігається переважне утворення галактоглюкану; при підвищенні осмолярності до 0,4 і 0,6 М синтезується, в основному, сукциноглюкан [155] Автори роботи [156] показали, що *R. meliloti* утворює галактоглюкан при лімітуванні росту бактерій фосфатами.

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

В залежності від тривалості культивування *A. pullulans*, складу середовища, рівня аерації і перемішування спостерігається зміна співвідношення двох полісахаридів — пулулану і ЕПС, здатного трансформуватися в пулулан [112]. Автори відзначають наявність взаємозв'язку між морфологічними формами гриба (бластоспори, хламідоспори, гіфи, перехідні форми), які переважають в тих чи інших умовах культивування, і рівнем синтезу обох ЕПС. Так, при наявності значного вмісту хламідоспор синтез пулулану спостерігається за будь-яких умов культивування, при вмісті гіфів більше 3 % пулулан не утворюється [112]. При вирощуванні *Aureobazidium pullulans* на середовищі з глюкозаміном кількість синтезованого пулулану є невисокою, однак при цьому утворюються щонайменше два інших ЕПС [23].

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

Комплексний полісахаридний препарат етаполан, синтезований бактеріями *Acinetobacter* sp., складається з нейтрального і двох кислих ЕПС, один з яких є ацильованим [144]. Нейтральний ЕПС є мінорним компонентом. Ацильований і неацильований полісахариди ідентичні за молярним співвідношенням D-глюкози, D-манози, D-галактози, L-рамнози, D-глюкуронової і піровиноградної кислот (3:2:1:1:1:1) та структурою повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга. Різниця між цими ЕПС полягає в тому, що ацильований полісахарид вміщує жирні кислоти (C_{12}—C_{18}) [161]. Реологічні властивості розчинів етаполану, які обумовлюють його практичну цінність, визначаються співвідношенням у його складі ацильованого і неацильованого компонентів, а також вмістом жирних кислот в ацильованому полісахариді. Дослідження показали, що в процесі періодичного культивування *Acinetobacter* sp. залежно від початкової концентрації одновалентних катіонів у середовищі в складі синтезованих ЕПС змінюється співвідношення обох кислих ЕПС, а також вміст жирних кислот в ацильованому полісахариді, що супроводжується зміною властивостей розчинів етаполану [143, 150, 151, 162]. Для утворення високоацильованого ЕПС, який містить 12—16 % жирних кислот, концентрація K^+ і Na^+ в середовищі повинна бути не нижчою 0,09 М [162].

Молекулярно-біологічні та генетичні дослідження синтезу ЕПС. З середини 80-х років з'являються публікації, присвячені генетичним дослідженням штамів — продуцентів ЕПС [164—167]. Ці дослідження стосувалися, в основному, ідентифікації генів, які кодують синтез ЕПС у різних мікроорганізмів, і були направлені на підвищення синтезуючої здатності продуцента і збільшення виходу ЕПС. Найповніше ця інформація викладена в огляді [168]. З виникненням технології рекомбінантних ДНК стало можливим удосконалення існуючих та створення нових штамів — продуцентів ЕПС, що дозволило підвищити ефективність процесів біосинтезу та знизити їхню вартість. Так, створено рекомбінантний штам *X. campestris*, здатний синтезувати ксантан на середовищі з молочною сироваткою [169]. Для цього гени *lacZY Escherichia coli*, які кодують β-галактозидазу і лактозопермеазу, перенесли в плазміду з широким кругом хазяїв так, щоб вони знаходилися під транскрипційним контролем промотору одного з бактеріофагів *X. campestris*. Цю конструкцію ввели до складу *E. coli*, а потім перенесли *X. campestris* шляхом потрійного зхрещування. Трансформанти, які містили плазміду, синтезували β-галактозидазу і лактозопермеазу, використовуючи лактозу як єдине джерело вуглецю, та синтезували ксантан на середовищі з глюкозою, лактозою і молочною сироваткою.

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

Слід відзначити, що на сьогоднішній день кількість публікацій, де розглядаються молекулярно-біологічні та генетичні аспекти залежності фізико-хімічних властивостей мікробних ЕПС від умов культивування продуцентів, є обмеженою. На жаль, причини, які викликають зміни складу ЕПС

і механізми регуляції властивостей полісахаридів, залишаються практично недослідженими. Роботи, присвячені вивченню цих питань, почали з'являтися лише з середини 90-х років.

Так, літературні дані свідчать, що варіювання хімічного складу ЕПС за різних умов культивування продуцентів може бути обумовлене зміною активності або інактивацією ферментів (зокрема, глікозилтрансфераз), які беруть участь в утворенні нуклеозиддифосфатсахаридів — попередників синтезу ЕПС.

Зокрема, у *Rhizobium leguminosarum* мутації в *exoB* гені (аналог *galE*), який кодує синтез УДФ-галактозоепімерази, супроводжувалися відсутністю галактози у складі ЕПС [171]. У *galE* мутантів *Erwinia amylovora* змінювався склад синтезованого ліпополісахариду [172]. У той же час у молочнокислих бактерій *Lactococcus lactis* мутації у *galE* гені не впливали на склад ЕПС, зокрема, на вміст галактози [173]. Виявлено, що в даних бактерій утворення УДФ-галактози (як і УДФ-глюкози) контролюється рівнем активності іншого ферменту — УДФ-глюкозопірофосфорилази, синтез якого кодується *galU* геном.

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

У ЕПС-синтезуючих стрептококів групи В визначено гени (*cpsIaC* і *cpsIaD*), відповідальні за полімеризацію ЕПС [175]. Мутанти, дефектні за цими генами, синтезували ЕПС, склад яких був ідентичний такому ЕПС вихідного штаму, однак з нижчою молекулярною масою (41000—45000 проти 90000—100000 у ЕПС вихідного штаму). Автори відзначають, що білки CpsC та CpsD подібні за амінокислотним складом до білків грамнегативних бактерій (ExoP у *Rhizobium meliloti* та Wzz у ентеробактерій), які також відповідальні за довжину синтезованого полісахаридного ланцюга. Ці білки у стрептококів регулюються шляхом фосфорилювання—дефосфорилювання.

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

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

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

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

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

При одержанні ЕПС на основі C_1—C_2-сполук існують певні обмеження для збільшення концентрації в середовищі метану, метанолу та етанолу. В разі метану — це недостатня розчинність його у воді і підвищена вибухонебезпечність, у випадку метанолу і етанолу — пригнічення життєдіяльності клітин високими концентраціями спиртів. У зв'язку з цим при одержанні ЕПС на основі метанолу і етанолу можлива дрібна подача субстрату, при використанні метану — зменшення концентрації азоту в середовищі з метою підтримання оптимального співвідношення вуглець/азот. Крім того, при культивуванні продуцентів ЕПС на метанолі і етанолі в умовах примусової аерації, коли має місце зниження концентрації спиртів у середовищі в результаті їхнього виносу з відпрацьованим повітрям, дрібний спосіб подачі субстрату дає можливість підтримувати концентрацію спиртів на необхідному для оптимального синтезу ЕПС рівні.

Здебільшого температура і величина pH, оптимальні для росту продуцента, є оптимальними і для синтезу ЕПС. Однак в деяких випадках зниження або підвищення температури культивування продуцентів відносно оптимальної для їхнього росту призводить до збільшення концентрації синтезованих ЕПС. Підтримання значення pH середовища на постійному рівні упродовж процесу культивування більшості продуцентів також супроводжується підвищенням синтезу ЕПС.

Рівень аерації на початку процесу культиву-

вання продуцентів ЕПС визначається їхніми фізіологічними особливостями (зокрема, відношенням до кисню). Однак по мірі синтезу ЕПС і збільшення в'язкості культурального середовища виникає потреба в підвищенні рівня аерації і посиленні масопереносу. Ці обставини необхідно враховувати при виборі конструкції апаратів для культивування продуцентів ЕПС, зокрема, типу пристроїв для їхнього перемішування.

Оскільки максимальна швидкість утворення ЕПС у більшості продуцентів не збігається в часі з досягненням максимальної питомої швидкості їхнього росту, безперервний процес одержання ЕПС, як правило, проводять при низьких швидкостях розбавлення середовища (0,03—0,05 год$^{-1}$).

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

Крім того, зміни складу та властивостей мікробних ЕПС у процесі культивування продуцента є також маловивченим питанням. Оскільки існуючі технології виробництва мікробних ЕПС являють собою періодичні процеси, орієнтовані на максимальний вихід ЕПС, а їхній склад у процесі культивування може змінюватися, то немає гарантій одержати продукт з необхідними стабільними властивостями. Потрібно також додаткове вивчення взаємозв'язку фізіологічного стану продуцента зі складом і властивостями синтезованих ЕПС.

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

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

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

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

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

T. P. Pirog, Yu. V. Kuzminskaya

Influence of the producer cultivation conditions on synthesis, physical and chemical properties of exopolysaccharides

Summary

A review represents the data concerning the influence of the producer cultivation conditions on the synthesis, physical and chemical properties of exopolysaccharides (EPS). The formation of microbial EPS (quantity, rate of their synthesis and yield from a substrate) depends on the composition of nutrient medium (carbon, nitrogen, phosphorus source, their concentration, ratio carbon/nitrogen, metal ions), mode of a substrate supply, physical and chemical factors (temperature, pH, aeration), duration of a process at periodic cultivation, dilution rate under continuous cultivation. Different conditions of a producer growth can change chemical composition of EPS, their molecular mass and ratio of several polysaccharides, that affects rheological properties of EPS solutions, determining their practical significance. The necessity of data concerning the influence of cultivation conditions on the synthesis, physical and chemical properties of EPS for the development of biotechnology of obtaining EPS with given stable properties is discussed.

Т. П. Пирог, Ю. В. Кузьминская

Влияние условий культивирования продуцентов экзополисахаридов на их синтез и физико-химические свойства

Резюме

Представлены литературные и собственные экспериментальные данные о влиянии условий культивирования продуцентов на синтез экзополисахаридов (ЭПС) и их физико-химические свойства. Образование микробных ЭПС (количество синтезированных полисахаридов, скорость их синтеза и выход в

зависимости от субстрата) обусловлено составом питательной среды (природа источника углерода, азота, фосфора, их концентрация, соотношение углерод/азот, ионы металлов), способом подачи субстрата, физико-химических факторов (температура, pH, уровень аэрации), продолжительностью процесса периодического культивирования, скоростью разбавления среды при непрерывном культивировании. В различных условиях выращивания продуцента может изменяться химический состав ЭПС, их молекулярная масса, а также соотношение нескольких полисахаридов, что влияет на реологические свойства растворов ЭПС, определяющие практическую значимость этих полимеров. Обсуждается вопрос о необходимости использования данных о влиянии условий культивирования на синтез и физико-химические свойства ЭПС в биотехнологии микробных полисахаридов при разработке технологий получения ЭПС со стабильными заданными свойствами.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Sutherland I. W.* Biosynthesis of microbial polysaccharides // Adv. Microbiol. Physiol.—1982.—23.—P. 79—150.
2. *Slodki M. E., Cadmus M. C.* Production of microbial polysaccharides // Adv. Appl. Microbiol.—1978.—**23**.—P. 19—54.
3. *Sandford P. A.* Microbial polysaccharides // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.—1979.—**36**.—P. 265—313.
4. *Pace G. W., Righelato R. C.* Production of extracellular microbial polysaccharides // Adv. Biochem. Eng.—1980.—**15**, N 12.—P. 41—70.
5. *Kanamaru K., Hieda T., Iwamuro Y.* Isolation and characterization of a *Hyphomicrobium* species and its polysaccharide formation from methanol // Agr. Biol. Chem.—1982.—**46**, N 10.—P. 2411—2417.
6. *Kanamaru K., Iwamuro Y., Micami Y.* 2-O-methyl-D-mannose in an extracellular polysaccharide from *Hyphomicrobium* sp. // Agr. Biol. Chem.—1982.—**46**, N 10.—P. 2419—2424.
7. *Sutherland I. W.* Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides // Annu. Rev. Microbiol.—1985.—**39**.—P. 243—270.
8. *Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Малашенко Ю. Р., Пинчук Г. Э.* Микробный синтез экзополисахаридов на C_1—C_2-соединениях.—Киев: Наук. думка, 1992.—212 с.
9. *Linton J. D.* The relationship between metabolite production and the growth efficiency of the producing organism // FEMS Microbiol. Rev.—1990.—**75**, N 1.—P. 1—18.
10. *Prigent J. R.* Les aspects industriels dans la production des polysaccharides microbiens // Petrole et techn.—1988.—**342**.—P. 35—38.
11. *Lazaridou A., Biliaderis C. G., Roukas T., Izydorczyk M.* Production and characterization of pullulan from beet molasses using a nonpigmented strain of *Aureobasidium pullulans* in batch culture // Appl. Biochem. and Biotechnol.—2002.—**97**, N 1.—P. 1—22.
12. *Pat.* 4282321 USA, IC^3 C 12 P 19/06. Fermentation process for production of xanthan // Publ. 04.08.81.
13. *Souw P., Demain A. Z.* Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459 // Appl. Environ. Microbiol.—1979.—**37**, N 6.—P. 1186—1192.
14. *Linton J. D., Jones D. S., Wooddard S.* Factors that control the rate of exopolysaccharide production by *Agrobacterium radiobacter* NCIB 11883 // J. Gen. Microbiol.—1987.—**133**, N 11.—P. 2979—2987.
15. *Okabe E., Nakajima M., Murooka H., Nisizawa K.* Investigation of carbon and phosphorus sources in cultural media of a selected strain of alginate-producing *Azotobacter vinelandii* // J. Ferment. Technol.—1981.—**59**, N 1.—P. 1—7.
16. *Horan N. J., Jarman T. R., Dawes E. A.* Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* grown in continuous culture // J. Gen. Microbiol.—1983.—**129**, N 10.—P. 2985—2990.
17. *Clementi F., Fantozzi P., Mancini F., Moresi M.* Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii* // Enzyme and Microbiol. Technol.—1995.—**17**, N 11.—P. 983—988.
18. *Fett W. F., Wijey C.* Yields of alginates produced by fluorescent pseudomonadas in batch culture // J. Ind. Microbiol.—1995.—**14**, N 5.—P. 412—415.
19. *Северина Л. О., Усенко И. А., Плакунов В. К.* Биосинтез экзополисахарида экстремально галофильной архебактерией *Halobacterium volcanii* // Микробиология.—1990.—**59**, № 3.—С. 437—442.
20. *Martinez-Checa F., Toledo F. L., Vilchez R., Quesada E., Calvo C.* Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons // Appl. Microbiol. Biotechnol.—2002.—**58**, N 3.—P. 358—363.
21. *Tallgren A. H., Airaksinen U., Weissenberg R., Ojamo H., Kuusisto J., Leisola M.* Exopolysaccharide-producing bacteria from sugar beetts // Appl. Environ. Microbiol.—1999.—**65**, N 2.—P. 862—864.
22. *Scheepe-Leberkuhne M., Wagner F.* Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthezised by *Enterobacter sakazakii* // Biotechnol. Lett.—1986.—**8**, N 10.—P. 695—700.
23. *Cescutti P., Pupulin R., Delben F., Abbate M., Dentini M., Sparapano L., Rizzo R., Crescenzi V.* New exopolysaccharides produced by *Aureobasidium pullulans* on glucosamine // Carbohydr. Res.—2002.—**337**, N 13.—P. 1201—1207.
24. *Hagiwara S., Yamada K.* Studies on the utilization of petrochemical product by microorganisms. Pt 2. Production of polysaccharide from ethandiol by *Arthrobacter simplex var. viscosus n. var* // Agr. Biol. Chem.—1970.—**34**, N 9.—P. 1283—1295.
25. *Tanaka A., Cho J., Teranishi J.* Production of polysaccharides from lower alcohols and glycols by nitrogen-fixing *Pseudomonas sp.* // J. Ferment. Technol.—1974.—**52**, N 10.—P. 739—746.
26. *Jamagushi M., Sato A.* Образование вязких полисахаридов из этиленгликоля. Условия культивирования и идентификация продуцируемых микроорганизмами полисахаридов // Коге гидаюцуин бисайбуцу коге гидаюцу кэнкюсе кэнкю хококу, Rept. Ferm. Res. Inst.—1977.—№ 49.—P. 91—101.
27. *Jamagushi M., Sato A.* Образование вязких полисахаридов из этиленгликоля. Компоненты и свойства полисахаридов // Коге гидаюцуин бисайбуцу коге гидаюцу кэнкюсе кэнкю хококу, Rept. Ferm. Res. Inst.—1977.—№ 49.—P. 103—114.
28. *Jamagushi M., Sato A.* Образование вязких полисахаридов из н-парафинов // Коге гидаюцуин бисайбуцу коге гидаюцу кэнкюсе кэнкю хококу, Rept. Ferm. Res. Inst.—1977.—№ 49.—P. 115—121.
29. *Егоров Н. С., Работнова И. Л., Гречушкина Н. Н.* Рост микобактерий на средах с н-алканами и некоторые продукты их метаболизма // Микробные метаболиты.—М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979.—С. 117—133.
30. *Семенова Е. В., Мудрик Е. С., Егоров Н. С.* Образование экзогликана *Mycobacterium cyaneum* в непрерывной культуре // Микробиология.—1987.—**56**, № 3.—С. 506—508.
31. *Belsky I., Gutnick D. L., Rosenberg E.* Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: determination of emulsifier-bound fatty acids // FEBS Lett.—1979.—**101**, N 1.—P. 175—178.
32. *Rosenberg E., Zuckerberg A., Rubinovitz C., Gutnick D. L.*

Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties // Appl. Environ. Microbiol.—1979.—37, N 3.—P. 402—408.

33. *Pat.* 4234689 USA IC[3] C 12 P 19/04. Production of β-emulsans / D. L. Gutnick, E. Rosenberg, Y. Shabtai // Publ. 18.11.80.
34. *Pat.* 4395353 USA IC[3] B 01 F 17/30. Polyanionic heteropolysaccharide biopolymers / D. L. Gutnick, E. Rosenberg, I. Belsky, Z. Sava // Publ. 26.07.83.
35. *Shabtai Y., Wang D. I. C.* Production of emulsan in a fermentation process using soybean oil (SBO) in a carbon-nitrogen coordinated feed // Biotechnol. Bioeng.—1990.—35, N 8.—P. 753—765.
36. *Kaplan N. E., Rosenberg E., Jann B., Jann K.* Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 // Eur. J. Biochem.—1985.—152.—P. 453—458.
37. *Kaplan N. E., Zosim Z., Rosenberg E.* Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein // Appl. Environ. Microbiol.—1987.—53, N 2.—P. 440—446.
38. *Rosenberg E., Rubinovitz C., Gottlieb A., Rosenhak S., Ron E. Z.* Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2 // Appl. Environ. Microbiol.—1988.—54, N 2.—P. 317—322.
39. *Rosenberg E.* Microbial diversity as a source of useful biopolymers // J. Ind. Microbiol.—1993.—11.—P. 131—137.
40. *Tam K. T., Finn R. K.* Polysaccharide formation by a *Methylomonas* // Amer. Chem. Soc. Symp.—1977.—45.—P. 58—80.
41. *Pat.* 8012060 Japan, IC[3] C 08 B 37/10. Preparation of polysaccharide MH-2 from microorganisms / C. Ajinomoto // Publ. 17.03.80.
42. *Higgins R. H., Best D. J., Hammond R. C., Scott D.* Methane-oxidizing microorganisms // Microbiol. Rev.—1981.—45, N 4.—P. 556—590.
43. *Гринберг Т. А., Щурова З. П., Романовская В. А., Малашенко Ю. Р.* Регуляция синтеза экзополисахарида у облигатного метилотрофа *Methylococcus* sp. // Микробиол. журн.—1983.—45, № 4.—С. 44—47.
44. *Пинчук Г. Э., Щурова З. П., Шатохина Э. С.* Характеристика роста метанокисляющей бактерии *Methylococcus thermophilus* в присутствии аминокислот аспартатного семейства // Микробиология.—1987.—56, № 4.—С. 621—625.
45. *Kenne L., Lindberg B.* Bacterial polysaccharides. Polysaccharides.—New York; London: Acad. press, 1983.—2.—P. 287—363.
46. *Southgate G., Goodwin P. M.* The regulation of exopolysaccharide production and of enzymes involved in C1-assimilation in *Methylophilus methylotrophus* // J. Gen. Microbiol.—1989.—135.—P. 2859—2867.
47. *Дерябин В. В., Старухина Л. А., Усов А. И., Яроцкий С. В.* Кислый экзополисахарид облигатно-метилотрофных бактерий *Methylobacillus methylophilus* ВСБ-792 // Биотехнология.—1986.—№ 5.—С. 22—27.
48. *Старухина Л. А., Дерябин В. В., Яроцкий С. В.* Экзогенные углеводсодержащие биополимеры облигатного метилотрофа *Methylobacillus methylophilus* ВСБ-792 (ЦМПМВ-1946) // XIII Всесоюз. конф. «Химия и биохимия углеводов» (Тбилиси, 17—19 ноября, 1987): Тез. докл.—Пущино: НЦБИ АН СССР, 1987.—С. 131—132.
49. *Misaki A., Tsuburava Y., Kakuta M.* D-allose-containing polysaccharide synthesized from methanol by *Pseudomonas* species // Carbohydr. Res.—1979.—75, N 1.—P. 8—19.
50. *Пат.* 929015 СССР, МКИ[3] С 12 Р 19/04. Способ получения полисахаридов / Е. Такаяма, Ц. Нозава, Е. Масуда (Япония) // Открытия. Изобретения.—1982.—№ 18.—С. 303.
51. *Логинова Н. В., Троценко Ю. А.* Образование экзополисахарида *Blastobacter viscosus* при росте на среде с метанолом // Прикл. биохимия и микробиология.—1980.—16, № 3.—С. 331—334.
52. *Breuer U., Ackerman J.U., Babel W.* Accumulation of poly-(3-hydroxybutyric acid) and over production of exopolysaccharides in a mutant of a methylotrophic bacterium: 4th Symp. Bact. Polyhydroxyalkanoates (Montreal, Aug. 14—18, 1994) // Can. J. Microbiol.—1995.—41, Suppl., N 1.—P. 55—59.
53. *Davis E. N., Wallen L. L.* Viscosus product from activated sludge by methanol fermentation // Appl. Environ. Microbiol.—1976.—32, N 2.—P. 303—305.
54. *Hou C. T., Laskin A. I., Pattel R. N.* Growth and polysaccharide production by *Methylocystis parvus* OBBP on methanol // Appl. Environ. Microbiol.—1978.—37, N 5.—P. 800—804.
55. *Pat.* 3932218 USA, IC[2] C 12 D 13/04. Production of heteropolysaccharides by fermentation of methanol / R. R. Finn, A. L. Tannahill, J. E. Laptevitz // Publ. 13.01.76.
56. *Harada T.* Special bacterial polysaccharides and polysaccharidases // Biochem. Soc. Symp.—1983.—48.—P. 97—116.
57. *Rees D. A., Morris E. R., Thom D., Madden K.* Shapes and interaction of carbohydrate chains // Polysaccharides.—New York; London: Acad. press, 1982.—Vol. 1.—P. 196—281.
58. *Пирог Т. П., Коваленко М. А., Кузьминская Ю. В.* Образование на углеводных субстратах экзополисахаридов штаммом *Acinetobacter* sp. и особенности его C_6-метаболизма // Микробиология.—2002.—71, № 2.—С. 215—221.
59. *Пирог Т. П., Коваленко М. А.* Энергетические и биохимические аспекты интенсификации синтеза экзополисахарида этаполана на смеси этанола и глюкозы // Междунар. конф. «Микробиология и биотехнология XXI столетия» (Минск, 21—25 мая 2002).—Минск, 2002.—С. 56—57.
60. *Pat.* 1513104 Britain, IC[3] C 12 D 13/04. Process for the production of polysaccharide / R. C. Rhigelato, L. Deavin // Publ. 07.06.78.
61. *Courtois B., Courtois J., Heyraund A.* Effect of biosynthesis conditions on the chemical composition of the water-soluble polysaccharides of fastgrowing *Rhizobia* // J. Gen. Appl. Microbiol.—1986.—32, N 6.—P. 519—526.
62. *Leps W. T., Thompson B. G., Brandingen M. A.* Effect of medium constituents and pH control on growth and exopolysaccharide production by *Rhizobium trifolii* // Abstr. 87th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. (Atlanta, Ga, 1987, 1—6 March).—Washington, 1987.—P. 265.
63. *Ткаченко А. А., Алиева С. Н.* Биосинтез левана *Gluconobacter oxydans* Л-1 в питательных средах с мелассой // Вестн. ЛГУ. Сер. 3.—1988.—№ 4.—С. 75—81.
64. *Brivonese A. C., Sutherland I. W.* Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture // Appl. Microbiol. Biotechnol.—1989.—30, N 1.—P. 97—102.
65. *Юрлова Н. А., Кирий А. И., Кудряшова О. А.* Влияние состава питательной среды на синтез экстрацеллюлярного полисахарида *Aureobasidium pullulans* // Микробиология.—1994.—63, № 6.—С. 1031—1037.
66. *Гвоздяк Р. И., Матышевская М. С., Григорьев Е. Ф., Литвинчук О. Л.* Микробный полисахарид ксантан.—Киев: Наук. думка, 1989.—212 с.
67. *Grigorova D., Pavlova K., Panchev I.* Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC // Appl. Biochem. Biotechnol.—1999.—81, N 3.—P. 181—191.

68. *Giavasis I., Harvey L. M., McNeil B.* Gellan gum // Crit. Rev. Biotechnol.—2000.—**20**, N 3.—P. 177—211.
69. *Leroy F., Degeest B., De V. L.* A novel area of predictive modelling: describing the functionality of beneficial microorganisms in foods // Int. J. Food Microbiol.—2002.—**73**, N 2—3.—P. 251—259.
70. *Linton J. D., Watts P. D., Austin R. M.* The energetics and kinetics of extracellular polysaccharide production from methanol by microorganisms possesing different pathways of C_1-assimilation // J. Gen. Microbiol.—1986.—**132**, N 3.—P. 779—788.
71. *Sengha S. S., Anderson A. J., Hasking A. J., Dawes E. A.* The production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture // J. Gen. Microbiol.—1989.—**135**, N 4.—P. 795—804.
72. *Mian F. A., Jarman T. R., Righelato D. N.* Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol.—1978.—**134**, N 2.—P. 418—422.
73. *Phillips K. R., Pik J., Lawford H. G., Lavers B., Kligerman A., Lawford G. R.* Production of curdlan-type polysaccharide by *Alcaligenes faecalis* in batch and continuous culture // Can. J. Microbiol.—1983.—**29**, N 10.—P. 1331—1338.
74 *Williams S. G., Greenwood J. A., Jones C. W.* Physiological and biochemical changes accompanying the loss of mucoidy by *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology.—1996.—**142**, N 4.—P. 881—888.
75. *Пирог Т. П., Коваленко М. А., Кузьминская Ю. В., Криштаб Т. П.* Интенсификация синтеза экзополисахарида этаполана на смеси ростовых субстратов // Микробиология.—2003.—72, № 1.—С. 26—32.
76. *Pat.* 3878045 USA, IC^2 C 12 D 13/04. Process for the production of heteropolysaccharides by fermentation of methanol / A. L. Tannahill, R. K. Finn // Publ. 10.07.75.
77. *Пирог Т. П., Кузьминская Ю. В.* Регуляция активности ацетил-КоА-синтетазы у мутантного штамма *Acinetobacter* sp., не образующего экзополисахариды // Междунар. конф. «Микробиология и биотехнология XXI столетия» (Минск, 21—25 мая 2002).—Минск, 2002.—С. 58—59.
78. *Shin Y. C., Rim Y. H., Lee H. C.* Production of pullulan by a fed-batch fermentation // Biotechnol. Lett.—1987.—**9**, N 9.—P. 621—624.
79. *Rau U., Gura E., Olszewski A., Wagner E.* Enchanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing // J. Ind. Microbiol.—1992.—**9**, N 1.—P. 19—26.
80. *Кодама Т., Накахара Т., Омори Т., Бинх Н. Т., Хошино К., Минода И.* Образование внеклеточных полисахаридов водородными и метанспользующими микроорганизмами // Рост микроорганизмов на C_1-соединениях: Тез. докл. симпоз. (12—16 сентября 1977 г., Пущино).—Пущино: НЦБИ АН СССР, 1977.—С. 213—215.
81. *Гринберг Т. А.* Способность смешанных культур метилотрофных микроорганизмов синтезировать экзополисахариды // Микробиол. журн.—1987.—**49**, № 2.—С. 52—56.
82. *Pat.* 4006058 USA, IC^2 C 12 D 13/04. Biopolymer production process / J. G. Savins // Publ. 01.02.77.
83. *Krieg D. P., Bass J. A., Mattingly S. J.* Stimulation of alginate synthesis by the addition of phosphorylcholine to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* grown under phosphate-limiting conditions // Abstr. 87th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. (Atlanta, Ga, 1987, 1—6 March).—Washington, 1987.—P. 89.
84. *Pat.* 2233397 France, IC^2 C 12 D 13/04. Procede pour la production d'un polysaccharide d'alginate type // Publ. 14.11.75.
85. *Пат.* 524576 СССР, МКИ^2 С 12 D 13/04. Способ получения полисахарида / К. Фрейзер, И. Эллиот (США) // Открытия. Изобретения.—1976.—№ 18.—С. 184.
86. *Graber-Gubert M., Morin A., Monsan P.* Isolation of microorganisms producing 6-deoxyhexose-containing polysaccharides // Syst. Appl. Microbiol.—1988.—**10**, N 2.—P. 200—205.
87. *Manresa A., Espuny M. J., Guinea J.* Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas* sp. GSP-910 // Appl. Microbiol.—1987.—**26**, N 4.—P. 347—351.
88. *Appanna V. D.* Stimulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti* JJ-1 by manganese // Biotechnol. Lett.—1988.—**10**, N 3.—P. 205—206.
89. *Appanna V. D.* Exopolysaccharide synthesis in *Rhizobium trifolii* in the presence of manganese and aluminium // Microbios. Lett.—1989.—**40**, N 157.—P. 31—36.
90. *Appanna V. D., Preston C. M.* Manganese elicits the synthesis of a novel exopolysaccharide in an arctic *Rhizobium* // FEBS Lett.—1987.—**215**, N 1.—P. 79—82.
91. *Lee P. K., Chang H. N., Kim B. H.* Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in continuous fermentation // Biotechnol. Lett.—1989.—**11**, N 8.—P. 573—578.
92. *Nirmala C., Purushothaman D.* Production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris var. oryzicola* as influenced by nutritional factors // Nat. Acad. Sci. Lett.—1991.—**14**, N 2.—P. 71—74.
93. *Ferrala N. F., Westervelt P., Mabbott G. A., Fekete F. A.* Relationship between extracellular polysaccharide production and medium iron concentration in nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum* B-8 // Abstr. 86th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. (Washington, 23—28 March, 1986).—Washington, 1986.—P. 217.
94. *Annison G., Couperwhite I.* Influence of calcium on alginate production and composition in continuous cultures of *Azotobacter vinelandii* // Appl. Microbiol. Biotechnol.—1986.—**25**, N 1.—P. 55—61.
95. *Annison G., Couperwhite I.* Composition of alginate synthesized during the growth cycle of *Pseudomonas aeruginosa* // Austral. J. Biol. Sci.—1987.—**40**, N 4.—P. 435—441.
96. *Davidson I. W.* Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture // FEMS Microbiol. Lett.—1978.—3.—P. 347—349.
97. *Reeslev M., Jensen B.* Influence of Zn^{2+} and Fe^{3+} on polysaccharide production and mycelium/yeast dimorphism of *Aureobasidium pullulans* in batch cultivations // Appl. Microbiol. Biotechnol.—1995.—**42**, N 6.—P. 910—915.
98. *Елинов Н. П.* Некоторые микробные полисахариды и их практическое применение // Успехи микробиологии.—М.: Наука, 1982.—С. 158—177.
99. *Haggstrom L.* Mutant of *Methylomonas methanolica* and its characterization with respect to biomass production from methanol // Appl. Environ. Microbiol.—1977.—33, N 3.—P. 567—576.
100. *Williams A. G., Wimpenny W. T.* Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* sp. NCIB 11264 grown in continuous culture // J. Gen. Microbiol.—1978.—**104**, N 1.—P. 47—57.
101. *Wang Y., McNeil B.* Effect of temperature on scleroglucan synthesis and organic acid production by *Sclerotium glucanicum* // Enzyme and Microbiol. Technol.—1995.—**17**, N 10.—P. 893—899.
102. *Wang Y., McNeil B.* Scleroglucan // Crit. Rev. Biotechnol.—1996.—**16**, N 3.—P. 185—215.
103. *Pfiffner S. M., Inerney M. J., Penneman G., Knapp R. M.* Isolation of halotolerant, thermotolerant, facultative polymer-producing bacteria and characterization of exopolymer // Appl. Environ. Microbiol.—1986.—**51**, N 6.—P. 1224—1229.

104. *Marshall V. M., Cowie E. N., Moreton R. S.* Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* LC 330 // J. Dairy Res.—1995.—62, N 4.—P. 621—628.
105. *Marques A. M., Estanol J., Alsina J. M.* Production and rheological properties of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas sp.* strain EPS-5028 // Appl. Environ. Microbiol.—1986.—52, N 2.—P. 1221—1223.
106. *Heald P. J., Kristiansen B.* Synthesis of polysaccharide by yeast-like forms of *Aureobasidium pullulans* // Biotechnol. Bioeng.—1985.—27, N 10.—P. 1516—1519.
107. *McNeil B., Kristiansen B., Seviour R. J.* Polysaccharide production and morphology of *Aureobasidium pullulans* in continuous culture // Biotechnol. Bioeng.—1989.—33, N 9.—P. 1210—1212.
108. *Mozzi F., Degiori G. S., Oliver G., Devaldez G. F.* Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH // Biotechnol. Lett.—1996.—18, N 4.—P. 435—439.
109. *Dudman W. F.* Cellulose production by *Acetobacter* strains submerged culture // J. Gen. Microbiol.—1960.—22, N 1.—P. 25—39.
110. *Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Малашенко Ю. Р.* Влияние факторов внешней среды на образование и свойства экзополисахаридов *Acinetobacter sp* // Прикл. биохимия и микробиология.—1998.—34, № 1.—С. 70—74.
111. *McNeil B., Kristiansen B.* Influence of impeller speed upon the pullulan fermentation // Biotechnol. Lett.—1987.—9, N 2.—P. 101—104.
112. *Simon L., Caye-Vaugien C., Bouchonneau M.* Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations // J. Gen. Microbiol.—1993.—139, N 5.—P. 979—985.
113. *Осадчая А. И., Кудрявцев В. А., Резник С. Р.* Влияние условий аэрации на синтез и экскрецию полисахаридов при их глубинном культивировании // Биотехнология.—1993.—№ 3.—С. 12—14.
114. *Rogovin P., Albrecht W., Sohns V.* Production industrial-grade polysaccharide B-1459 // J. Biotechnol. Bioeng.—1965.—7, N 1.—P. 161—169.
115. *Lawford H., Rousseau J.* Effect of oxygen on the rate of 1,3-glucan microbial exopolysaccharide production // Biotechnol. Lett.—1989.—11, N 2.—P. 125—131.
116. *Pace G. W.* Microbial polysaccharides // Adv. Biotechnol. (Proc. Int. Ferment. Symp.).—1981.—3.—P. 433—439.
117. *Margaritis A., Pace G. W.* Microbial polysaccharides // Comprehens. Biotechnol.—Oxford etc.: Pergamon press, 1985.—Vol. 3.—P. 1005—1044.
118. *Oosterhuis N. M. G., Baal H. C. I., Koerts K.* New chances for microbial polysaccharides // World Biotech. Rept. Conf. (San Francisco, Nov. 1986).—New York; London, 1986.—Vol. 2, pt 3.—P. 105—112.
119. *Pat.* 2488909 France, IC^3 C 12 P 19/04. Production de polysaccharides microbiens / L. Kim, S. Gordon // Publ. 26.02.82.
120. *Jarman T. R.* Bacterial alginate synthesis // Microbial polysaccharides and polysaccharases / Ed. R. C. W. Berkeley.—London: Acad. press, 1978.—P. 35—50.
121. *Jarman T. R., Deavin L., Slocombe S., Rhigelato R. C.* Investigation of the effect of environmental conditions on the rate of exopolysaccharide synthesis in *Azotobacter vinelandii* // J. Gen. Microbiol.—1978.—107, N 1.—P. 59—64.
122. *Silman R. W., Rogovin P.* Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: effect of dilution rate // Biotechnol. Bioeng.—1972.—14.—P. 23—31.
123. *Looijesteijn P. J., van Casteren W. H., Tuinier R., Doeswijk-Voragen C. H., Hugenholtz J.* Influence of different substrate limitation on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous culture // J. Appl. Microbiol.—2000.—89, N 1.—P. 116—122.
124. *Sandford P. A.* Industrial utilization of polysaccharides. Polysaccharides.—New York; London: Acad. press, 1983.—Vol. 2.—P. 411—490.
125. *Sandford P. A., Cottrell I. W., Pettitt D. J.* Microbial polysaccharides: new products and their commercial application // Pure and Appl. Chem.—1984.—56, N 7.—P. 879—892.
126. *Chida K., Chen G. I., Kodama T., Minoda Y.* Acidic polysaccharide production from methane by new methane-oxidizing bacterium H-2 // Agr. Biol. Chem.—1983.—47, N 2.—P. 275—280.
127. *Evans C. G. T., Yeo R. G., Ellwood D. C.* Continuous culture studies on the production of extracellular polysaccharides by *Xanthomonas juglandis* // Microbial polysaccharides and polysaccharases / Ed. R. C. W. Berkeley.—London: Acad. press, 1978.—Vol. 3.—P. 51—68.
128. *Pat.* 1512536 Britain, IC^3 C 12 D 13/04. Productions of polysaccharides // Publ. 01.06.78.
129. *Cadmus M. C., Rogovin S. P., Burton K. A.* Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain // Can. J. Microbiol.—1976.—22.—P. 942—948.
130. *Cadmus M. C., Knutson C. A., Lagoda A. A., Pittsley J. E., Burton K. A.* Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors // Biotechnol. Bioeng.—1978.—20, N 7.—P. 1003—1014.
131. *Philips J. C., Miller J. W., Wernan W. C.* A high-pyruvate xanthan for EOR // Soc. Petrol. Eng. J.—1985.—N 2.—P. 594—602.
132. *Tait M. I., Sutherland I. W., Clarke-Sturman A. J.* Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide // J. Gen. Microbiol.—1986.—132, N 6.—P. 1483—1492.
133. *Skjar-Braek G., Smidsrod O., Larsen B.* Tailoring of alginates by enzymatic modification *in vitro* // Int. J. Biol. Macromol.—1986.—8, N 6.—P. 330—336.
134. *Deryabin V. V., Starukhina L. A., Glukhova E. V.* Structurial and rheological characterisation of exopolysaccharides from new strains of *Azotobacter vinelandii* // Abstr. 6th Eur. Symp. Carbohydr. Chem. (Edinburgh, 1—13 Sept., 1991).—Letchevorth, 1991.—P. 137.
135. *Bryan B. A., Linhardt R. J., Daniels L.* Variation in composition and yield of exopolysaccharides produced by *Klebsiella* sp. strain K32 and *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 // Appl. Environ. Microbiol.—1986.—51, N 6.—P. 1304—1308.
136. *Bryan B. A., Linhardt R. J., Daniels L.* Variation in composition and yield of exopolysaccharides produced by *Klebsiella, Acinetobacter*, and *Rhodotorula* species // Abstr. 86th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. (Washington, 23—28 March, 1986).—Washington, 1986.—P. 272.
137. *Huq M. N., Ralph B. J., Rickard P. A. D.* The extracellular polysaccharide of a methylotrophic culture // Austral. J. Biol. Sci.—1978.—31, N 3.—P. 311—316.
138. *Хмеленина В. Н., Гаязов Р. Р., Сузина Н. Е.* Синтез полисахаридов *Methylococcus capsulatus* в различных условиях культивирования // Микробиология.—1992.—61, № 3.—С. 404—410.
139. *Van A. N. K., McMillan B. D., Dryden P.* The multi-component extracellular polysaccharide of *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum* // Phytopathology.—1987.—77, N 3.—P. 496—501.

140. *Bejar V., Calvo C., Moliz J., Diazmartinez F., Quesada E.* Effect of growth conditions on the rheological properties and chemical composition of *Volcaniella eurihalina* exopolysaccharide // Appl. Biochem. Biotechnol.—1996.—**59**, N 1.—P. 77—86.

141. *Болоховская В. А., Гвоздяк Р. И., Воцелко С. К.* Физико-химические свойства препаратов полимиксана, полученных из различных штаммов *Bacillus polymyxa* // Микробиол. журн.—1993.—**55**, № 2.—С. 27—34.

142. *Bouzar F., Cerning J., Desmazeaud M.* Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CNRZ 1187 and by two colonial variants // J. Dairy Sci.—1996.—**79**, N 2.—P. 205—211.

143. *Пирог Т. П., Краснопевцева Н. В., Гринберг Т. А., Власов С. А., Воцелко С. К., Малашенко Ю. Р.* Изменение некоторых свойств экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования // Биотехнология.—1991.—№ 4.—С. 67—70.

144. *Пирог Т. П.* Принципи регуляції складу і фізико-хімічних властивостей екзополісахаридів, синтезованих *Acinetobacter* sp.: дис. д-ра. біол. наук.—Київ, 1999.—450 с.

145. *Коваленко М. О., Коваленко О. Г., Пирог Т. П.* Антифітовірусна активність нативних та дезацильованих препаратів мікробного екзополісахариду етаполану // Вісн. Київ. Нац. ун-ту імені Тараса Шевченка (Біологія).—2001.—35.—С. 32—35.

146. *Ананьева Е. П., Быстрова Ж. В., Витовская Г. А.* Влияние условий биосинтеза на физико-химические свойства экзополисахаридов *Bullera alba* // Прикл. биохимия и микробиология.—1995.—**31**, № 4.—С. 417—421.

147. *Pat.* 7915872 Japan, IC^3 C 12 D 13/04. Polysaccharide und verfahren zu ihrer herstellung / H. Takemoto, I. Igarashi, Y. Shnanyo // Publ. 31.01.79.

148. *Madi N. S., McNeil B., Harvey L. M.* Influence of culture pH and aeration on ethanol production and pullulan molecular weight by *Aureobasidium pullulans* // J. Chem. Technol. Biotechnol.—1996.—**65**, N 4.—P. 343—350.

149. *Kaplan D. L., Arcidiacono S., Wiley B. J.* Fermentation and processing requirements for the production of high molecular weight pullulan from *Aureobasidium pullulans* and chitosan from *Mucor rouxii* // Abstr. 87th Annu. Meet. Amer. Soc. Microbiol. (Atlanta, 1—6 March, 1987).—Washington, 1987.—P. 264.

150. *Гринберг Т. А., Пирог Т. П., Пинчук Г. Э., Буклова В. Н., Малашенко Ю. Р.* Изменение состава и свойств экзополисахаридов, синтезируемых *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования // Микробиология.—1994.—**63**, № 6.—С. 1015—1019.

151. *Пирог Т. П., Гринберг Т. А., Буклова В. Н., Воцелко С. К., Малашенко Ю. Р.* Образование экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. на средах с различным содержанием K^+ // Микробиология.—1995.—**64**, № 1.—С. 51—54.

152. *Пирог Т. П., Малашенко Ю. Р., Воцелко С. К.* Двухстадийный способ получения микробного экзополисахарида этаполана с улучшенными реологическими свойствами // Прикл. биохимия и микробиология.—2001.—**37**, № 4.—С. 429—435.

153. *Gross M., Rudolph K.* Studies of the extracellular polysaccharides (EPS) produced *in vitro* by *Pseudomonas phaseolicola*. 1. Indications for a polysaccharide resembling alginic acid in seven *P. syringae* pathovars // Phytopathol. Z.—1987.—**118**, N 3.—P. 276—287.

154. *Singh S., Fett W.* Stimulation of exopolysaccharide production by fluorescent pseudomonads in sucrose media due to dehydration and increased osmolarity // FEMS Microbiol. Lett.—1995.—**130**, N 2—3.—P. 301—306.

155. *Navarini L., Cesaro A., Ross-Murphy S. B.* Exopolysaccharides from *Rhizobium meliloti* YE-2 grown under different osmolarity conditions: viscoelastic properties // Carbohydr. Res.—1992.—N 223.—P. 227—234.

156. *Astete S. G., Leigh J. A.* MucS, a gene involved in activation of galactoglucan (EPS II) synthesis gene expression in *Rhizobium meliloti* // Mol. Plant Microbe Interact.—1996.—**9**, N 5.—P. 395—400.

157. *Becker A., Ruberg S., Baumgarth B., Bertram-Drogatz P. A., Quester L., Puhler A.* Regulation of succinoglucan and galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* // J. Mol. Microbiol. Biotechnol.—2002.—**4**, N 3.—P. 187—190.

158. *Cerantola S., Montrozier H.* Production *in vitro*, on different solid culture media, of two distinct exopolysaccharides by a mycoid clinical strain of *Burkholderia cepacia* // FEMS Microbiol. Lett.—2001.—**202**, N 1.—P. 129—133.

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

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

161. *Пирог Т. П., Сенченкова С. М., Грінберг Т. О., Малашенко Ю. Р.* Структура ацильованого екзополісахариду, синтезованого бактеріями *Acinetobacter* sp. // Укр. біохім. журн.—2001.—**73**, № 3.—С. 71—79.

162. *Пирог Т. П.* Образование ацилированных экзополисахаридов в процессе периодического культивирования *Acinetobacter* sp. // Микробиология.—1996.—**65**, № 5.—С. 644—648.

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

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

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

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

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

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

169. *Fu J. F., Tseng Y. H.* Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from

whey // Appl. Environ. Microbiol.—1990.—56.—P. 919—923.

170. *Пирог Т. П.* Біологічні функції мікробних екзополісахаридів // Мікробіол. журн.—2001.—63, № 5.—С. 80—101.
171. *Sanchez-Andujar B., Colorado C., Philip-Hollingsworth S., Dazzo F. B., Palomares A. J.* Structure and role in symbiosis of *exoB* gene of *Rhizobium leguminosarum* by *R. trifolii* // Mol. and Gen. Genet.—1997.—255.—P. 131—140.
172. *Metzer M., Bellemann P., Bugert P., Geider K.* Genetics of galactose metabolism of *Erwinia amylovora* and its influence on polysaccharide synthesis and virulence of the fire blight pathogen // J. Bacteriol.—1994.—176.—P. 450—459.
173. *Boels I. C., Ramos A., Kleerebezem M., de Vos W. M.* Functional analysis of the *Lactococcus lactis galU* and *galE* genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis // Appl. Environ. Microbiol.—2001.—67, N 7.—P. 3033—3040.
174. *Franklin M. J., Ohman D. E.* Identification of algI and algJ in the *Pseudomonas aeruginosa* alginate biosynthetic gene cluster which are required for alginate O-acetylation // J. Bacteriol.—1996.—178, N 8.—P. 2186—2195.
175. *Cieslewicz M. J., Kasper D. L., Wang Y., Wessels M. R.* Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci // J. Biol. Chem.—2001.—276, N 1.—P. 139—146.
176. *Bertram-Drogatz P. A., Quester I., Becker A., Puhler A.* The *Sinorhizobium meliloti* MucR protein, which is essential for the production of high-molecular-weight succinoglucan exopolysaccharide, binds to short DNA regions upstream of *exoH* and *exoY* // Mol. and Gen. Genet.—1998.—257, N 4.—P. 433—441.
177. *Mendrygal K. E., Gonzalez J. E.* Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* // J. Bacteriol.—2000.—182, N 3.—P. 559—606.
178. *Lloret J., Martin M., Oruezabal R. I., Bonilla I., Rivilla R.* MucR and mucC activate exp genes transcription and galactoglucan production in *Sinorhizobium meliloti* EFB1 // Mol. Plant Microbe Interact.—2002.—15, N 1.—P. 54—59.
179. *Martin M., Lloret J., Sanchez-Contreras M., Bonilla I., Rivilla R.* MucR is necessary for galactoglucan production in *Sinorhizobium meliloti* EFB1 // Mol. Plant Microbe Interact.—2002.—15, N 1.—P. 129—135.

УДК 579.222:577.114
Надійшла до редакції 21.08.02