

ХУДАЙГУЛОВ ГАЙСАР ГАРАЕВИЧ

ЭКЗОПОЛИСАХАРИД БАКТЕРИЙ

Raenibacillus ehimensis:

УСЛОВИЯ БИОСИНТЕЗА, СОСТАВ И СВОЙСТВА

03.01.06 - биотехнология

(в т.ч. бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Учреждении Российской Академии Наук Институте биологии Уфимского научного центра РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Логинов Олег Николаевич

Официальные оппоненты:

- доктор биологических наук, профессор Чемерис Алексей Викторович (Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН)
- доктор химических наук, профессор Варламов Валерий Петрович (Учреждение Российской академии наук Центр "Биоинженерия" РАН);

Ведущая организация:

Учреждение Российской Академии Наук Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН

Защита состоится «17» февраля 2012 г. в 16:00 часов на заседании диссертационного совета ДМ 002.136.01 Учреждении Российской Академии Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 69, тел/факс: 8 (347) 235-62-47, e-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, Проспект Октября, 69, с авторефератом – в сети Интернет по адресу <http://ib.anrb.ru/sovet.html> и на сайте ВАК Минобрнауки РФ.

Автореферат разослан _____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



Р.В. Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Полисахариды находят широкое применение в таких областях человеческой деятельности как медицина, пищевая, нефтедобывающая и фармацевтическая промышленность. Экзогликаны бактерий широко используются при полимерном заводнении пласта, применение которых дает ощутимый экономический эффект (Сафонов, 1997).

Растворы декстранов используются как заменители плазмы крови в медицине при больших потерях крови (напр.: препарат «Реополиглюкин»). Предложено использование альгинатов в качестве компонентов в системах адресной доставки лекарств (Ciofani et al., 2008).

Рынок водорастворимых полимеров в 1998 году составил 6,8 миллиардов долларов США. Спрос нефтедобывающей отрасли на бактериальные экзополисахариды только в США составляет цифру порядка 1 млн.т (Sabra et al., 2001).

Бактериальные ЭПС, в отличие от большинства химически синтезированных, являются биodeградируемыми и не наносят вреда окружающей среде (Muhammadi, 2008). А возросший интерес к экологически чистым технологиям стимулирует спрос на природные ЭПС.

Бактериальные экзополисахариды представляют группу очень перспективных стимуляторов защитных сил организма. Так экзополисахариды бактерий *Paenibacillus polymyxa*, обладают антивирусными и противоопухолевыми свойствами, оказывают профилактическое действие при экспериментальной стафилококковой инфекции и пролонгируют действие лекарственных веществ, повышая неспецифическую реактивность организма (Егоренкова и др., 2009).

Таким образом, поиск новых продуцентов экзополисахаридов, несомненно, представляет научный и практический интерес.

Цель исследования.

Выделить и охарактеризовать экзополисахарид бактерий. *Paenibacillus ehimensis*, Определить мономерный состав, свойства и реологические характеристики ЭПС.

Задачи исследования:

- отработать режимы и условия культивирования исследуемого штамма для максимального выхода высоковязкого ЭПС.
- подобрать условия выделения и очистки ЭПС.
- установить химическую природу и мономерный состав экзополисахарида.
- исследовать физико-химические и реологические свойства гелей ЭПС.

Научная новизна. Впервые выделен и охарактеризован экзогенный полиуронид бактерий *Paenibacillus ehimensis* 739 – продуцента ЭПС (Патент РФ).

Практическая значимость.

Запатентован новый продуцент экзополисахарида. Определены основные технологические подходы производства высоковязкого биополимера и перспективные области применения в различных отраслях народного хозяйства.

Апробация работы.

XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2009). XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2010), II Всероссийская школа-конференция молодых ученых «Современные методы и подходы в биологии и экологии» (Уфа, 2011).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 97 страницах, содержит 21 таблиц и 19 рисунков. Список использованной литературы включает 135 наименований, из них 40 на русском языке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследований являлся штамм бактерии *Paenibacillus ehimensis* 739 из Коллекции микроорганизмов Учреждения Российской академии наук Институт биологии Уфимского научного центра РАН, который находится на патентном депонировании во Всероссийской коллекции микроорганизмов под регистрационным номером ВКМ В-2680D.

Оценку влияния источника углерода на вязкость культуральной жидкости оценивали в среде Федорова имеющей состав, г/л: K_2HPO_4 – 0,3; $CaHPO_4$ – 0,2; $MgSO_4$ – 0,3; K_2SO_4 – 0,2; NaCl – 0,5; $FeCl_3$ – 0,01; $CaCO_3$ – 5,0;. В качестве субстратов использовали: глюкозу, сахарозу, мальтозу, крахмал, мелассу, этанол. Культивирование проводили на качалке УВМТ-12-250 (180 мин⁻¹, 120 ч, 30°C).

Оптимизацию условий культивирования проводили с применением метода математического планирования эксперимента (Практикум..., 2005). Факторами варьирования, влияющими на процесс синтеза и накопления ЭПС были выбраны концентрация мелассы в питательной среде, аэрация, температура и продолжительность культивирования, соответственно X_1 , X_2 , X_3 , X_4 . (Таблица 2.1) Варьирование осуществлялось изменением уровня фактора («верхний» и «нижний» уровни варьирования). Концентрация остальных компонентов среды было зафиксировано. Для оценки влияния был составлен план полного факторного эксперимента четвертого порядка (ПФЭ 2⁴). Матрица планирования эксперимента представлена в табл. 2.2.

Таблица 2.1

Факторы и уровни их варьирования в ПФЭ 2⁴

Параметр культивирования	Фактор	Средний уровень «0»	Нижний уровень «-»	Верхний уровень «+»	Единица варьирования
Содержание мелассы, г/л	X ₁	40	20	60	20
Перемешивание, мин ⁻¹	X ₂	160	120	200	40
Температура, °С	X ₃	30	25	35	5
Продолжительность культивирования, ч	X ₄	96	48	144	48

Таблица 2.2

Матрица планирования ПФЭ 2⁴

№ среды	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+
17	0	0	0	0

Выделение ЭПС из культуральной жидкости проводили при помощи переосаждения изопропиловым спиртом (0,9 частей). Осадок промывали чистым изопропиловым спиртом, холодной водой и сушили до постоянной массы.

Молекулярные массы ЭПС оценивали методом гелъпроникающей хроматографии (ВЭЖХ), на колонке TSK G4000SW В качестве стандартов использовали декстраны с различными молекулярными массами. Для установления типов мономеров применяли гидролиз в 7% HCl.

ИК - спектры записывали на спектрофотометре Specord M 80 (Carl Zeise, Германия) в области $600-4000 \text{ см}^{-1}$ (в пленке толщиной 15-20 μ).

Спектры ЯМР ^1H регистрировали на спектрометре Bruker AM-300 (Германия) (рабочая частота 300 МГц) для 2 % растворов гидролизата полисахарида при 80 °С, растворитель - D_2O .

Спектры ЯМР ^{13}C с широкополосным подавлением по протонам регистрировали на спектрометре Bruker AM-300 (Германия) (рабочая частота 75,47 МГц) для 2 % растворов гидролизата полисахарида, внутренний стандарт — DDS, растворитель — D_2O .

Для оценки кинематической вязкости культуральной жидкости и растворов экзополисахаридов использовали стеклянный капиллярный вискозиметр Оствальда. Исследования реологических свойств экзополисахаридов проводились на реометре RheoStress-1 (Haake, Германия).

Статистическую обработку результатов проводили, используя t-критерий Стьюдента на 5% уровне значимости. Полученные данные статистически обрабатывались с помощью программы Microsoft Excel-2002.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние источника углерода на синтез ЭПС *Paenibacillus ehimensis*

При культивировании на индивидуальных углеводах вязкость образцов культуральной жидкости полученных на сахарозе была выше, наилучшие результаты были получены на средах, где в качестве источника углерода использовалась меласса. Вероятно, на продукцию ЭПС влияют факторы роста, которые в большом количестве содержатся в мелассе.

Таблица 3.1

Подбор источника углерода

Источник углерода	Вязкость культуральной жидкости, сСт
Глюкоза	48 ±2
Сахароза	67 ±3
Мальтоза	50 ±3
Крахмал	53 ±3
Меласса	765 ±38
Этанол	34 ±2

В ходе экспериментов установлено что меласса, применяемая для биосинтеза ЭПС бактериями *Paenibacillus ehimensis* 739 должна соответствовать определенным требованиям. Наиболее критичным параметром является содержание сахарозы, которое должно быть не менее – 45%.

Таблица 3.2

Результаты ПФЭ 2⁴

№	Содержание Мелассы, г/л	Частота перемешивания, Об/мин	Температура °С	Продолжительность Культивирования, ч	Вязкость, сСт
1	10	160	25	72	40,02
2	30	160	25	72	50,93
3	10	200	25	72	33,95
4	30	200	25	72	274,05
5	10	160	35	72	20,61
6	30	160	35	72	4,85
7	10	200	35	72	7,28
8	30	200	35	72	20,61
9	10	160	25	168	126,11
10	30	160	25	168	55,78
11	10	200	25	168	297,09
12	30	200	25	168	~ 30 000
13	10	160	35	168	14,55
14	30	160	35	168	27,89
15	10	200	35	168	18,19
16	30	200	35	168	13,34
17	20	180	30	120	76,39

Наиболее оптимальным условиям, с точки зрения накопления экзополисахарида в культуральной жидкости, соответствовали: аэрация – 200 об/мин, температура – 25°C, концентрация мелассы – 30 г/, продолжительность культивирования – 168 ч.

Таблица 3.3

Результаты полного факторного эксперимента 4-го порядка

Вариант №	Содержание мелассы, г/л	Аэрация, об/мин	Температура, °С	Продолжительность культивирования, ч	Вязкость, сСт
1	10	160	25	72	40,02
2	30	160	25	72	50,93
3	10	200	25	72	33,95
4	30	200	25	72	274,0
5	10	160	35	72	20,61
6	30	160	35	72	4,85
7	10	200	35	72	7,28
8	30	200	35	72	20,61
9	10	160	25	168	126,1
10	30	160	25	168	55,78
11	10	200	25	168	297,0
12	30	200	25	168	~ 30 000
13	10	160	35	168	14,55
14	30	160	35	168	27,89
15	10	200	35	168	18,19
16	30	200	35	168	13,34
17	20	180	30	120	76,39

Следует отметить, что такое сочетание факторов неблагоприятно для роста микроорганизмов и ведет к удлинению логарифмической фазы роста. Вероятно, синтез молекул ЭПС с более высокой молекулярной массой и в большем количестве является ответом на стресс, вызванный неблагоприятными условиями роста, например: увеличение продукции экзополисахарида бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* в присутствии Cu^{2+} (Kidambi et al., 1995).

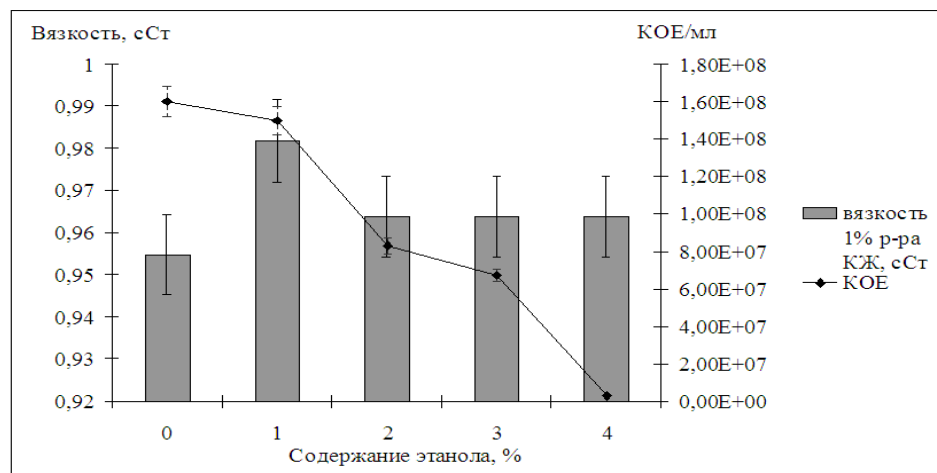
Для установления справедливости данной теории в отношении бактерий *Paenibacillus ehimensis* 739 был проведен эксперимент о влиянии стрессовых ситуаций на продуктивность биомассы *Paenibacillus ehimensis* 739. Подобные исследования, только для бактерий рода *Pseudomonas*, проводили Shrikrishna и William (Shrikrishna et al. 1995). В качестве компонента вызывающего

дегидратацию клеток, как и в оригинальной статье, выбрали этанол, который помимо этого обладает бактерицидным действием. Так при росте на среде содержащей 1-4% этанола при меньшем титре колониеобразующих единиц вязкость 1% раствора КЖ была выше. Что может быть вызвано большей молекулярной массой синтезируемого ЭПС (рис. 3.1). Как видно из рисунка, при культивировании на среде с добавлением 1% этанола вязкость 1% раствора КЖ выше при меньшем количестве колониеобразующих единиц, в то время как масса препаратов ЭПС была одинаковой, также в данном случае проявлялось совместное ингибирование мелассой и этанолом. Концентрация этанола в среде более 2% ингибировала рост штамма-продуцента. В варианте с 4% содержанием этанола титр был равен 3 млн. КОЕ в миллилитре культуральной жидкости масса ЭПС и вязкость 1% раствора КЖ оставались на прежнем уровне.

Рисунок 3.1

Влияние осмотического стресса на продукцию ЭПС

Paenibacillus ehimensis 739



Нами установлено, что хранение КЖ не сказывается негативно на вязкостных свойствах постферментационной жидкости. Образцы КЖ сохраняли свои реологические характеристики более 90 дней при температуре окружающей среды 20-25°C и относительной влажности 75-85%, что является немаловажным при практическом применении и говорит об отсутствии ферментов катализирующих распад ЭПС у *Paenibacillus ehimensis* 739.

В большинстве случаев выделение ЭПС из культуральной жидкости осуществляют добавлением двух или трех объемов полярного смешивающегося с водой растворителя (напр. этанол, ацетон, изопропиловый спирт). Для выбора наиболее оптимальных параметров данного процесса с точки зрения полноты извлечения из культуральной жидкости ЭПС было проведено исследование по влиянию типа растворителя на количество осаждаемого ЭПС. Для этого были

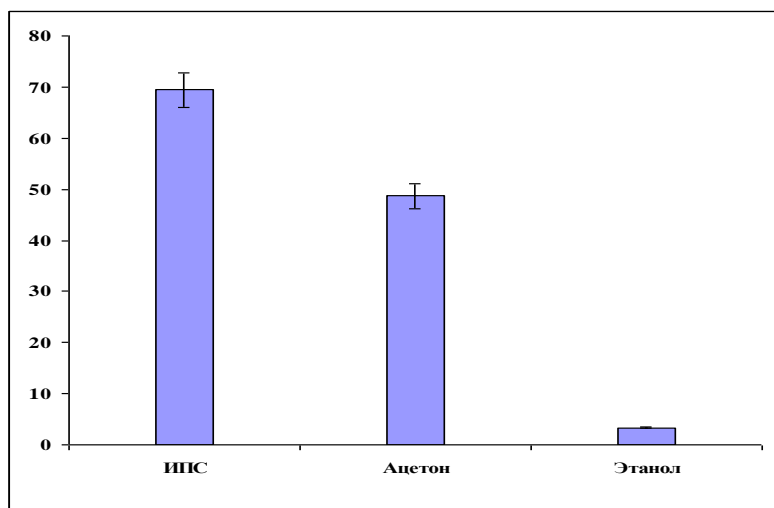
выбраны следующие растворители этанол, изопропиловый спирт и ацетон. Был приготовлен раствор ЭПС.

Для приготовления данного раствора использовался экзополисахарид полученный осаждением ацетоном (температура -20°C), после добавления ацетона, КЖ выдерживалась при температуре -20°C в течение 72 часов. За это время сформировывался плотный осадок экзополисахарида, осадок дополнительно промывался ацетоном для удаления оставшейся влаги.

На первом этапе определялся наиболее оптимальный растворитель для осаждения ЭПС. Соотношение раствор ЭПС – осаждающий агент 1:1. Результаты представлены в процентах, масса осажденного ЭПС от массы в растворе (рис. 3.2).

Рисунок 3.2

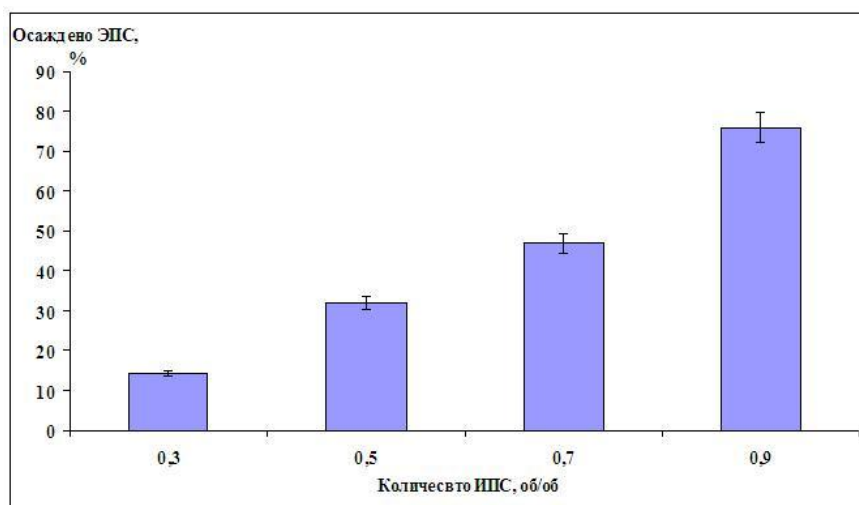
Выбор оптимального растворителя



Как видно из рис 3.2 изопропиловый спирт является наиболее подходящим для этой цели растворителем, ИПС осаждает до 70% экзополисахарида из раствора, для ацетона и этанола 50% и 3% соответственно. Применение бутанола и более высших спиртов, в данном случае, не является возможным, т.к. не происходило смешивания КЖ и растворителя. Вариант с метанолом не рассматривался изначально ввиду его ядовитости.

На втором этапе проводился выбор количества изопропилового спирта. Результаты представлены в процентах осажденного ЭПС от исходного (рис. 3.3).

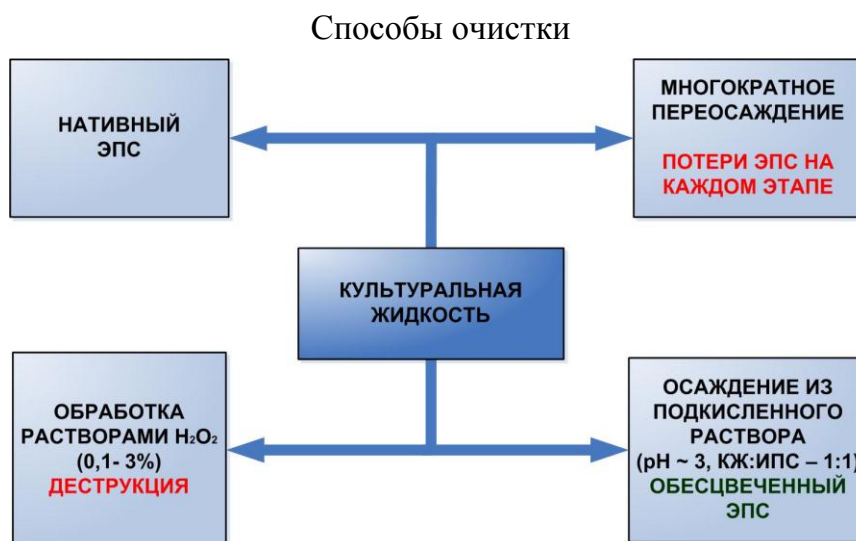
Выбор количества изопропилового спирта



Таким образом, параметры осаждения следующие: тип полярного растворителя применяемого для осаждения ЭПС из культуральной жидкости – изопропиловый спирт, количество ИПС – 0.9 объемов на 1 объем культуральной жидкости. Температура осаждающего агента -20°C .

Так как сами экзополисахариды бесцветны либо слабоокрашены была предпринята попытка очистить их от красящих веществ. Переосаждение ЭПС не только уменьшала конечный выход экзополисахарида, но и не приводила к желаемому результату. Были выбраны следующие способы очистки ЭПС (Рис.3.4):

Рисунок 3.4



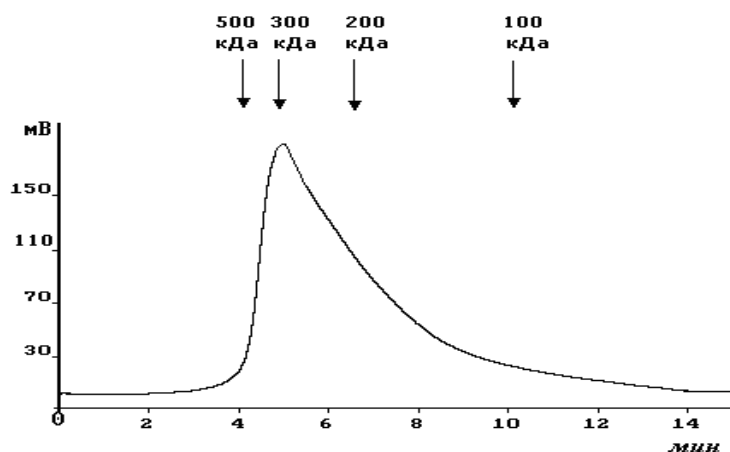
Обработка растворами перекиси водорода при концентрациях от 3 до 0,3 % приводила к деструкции полимера, многократное переосаждение тоже не привело к желаемым результатам, к тому же это приводит к увеличению потерь ЭПС. При

растворении экзополисахарида в 0,1 М серной кислоте и последующем осаждении получался обесцвеченный продукт, без ухудшения реологических характеристик (Рис. 3.4).

При анализе молекулярной массы методом гельпроникающей хроматографии ЭПС выходил из колонки ассиметричным пиком в интервале 350-300 кДа (Рис 3.5).

Рисунок 3.5

Гельпроникающая хроматография ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739



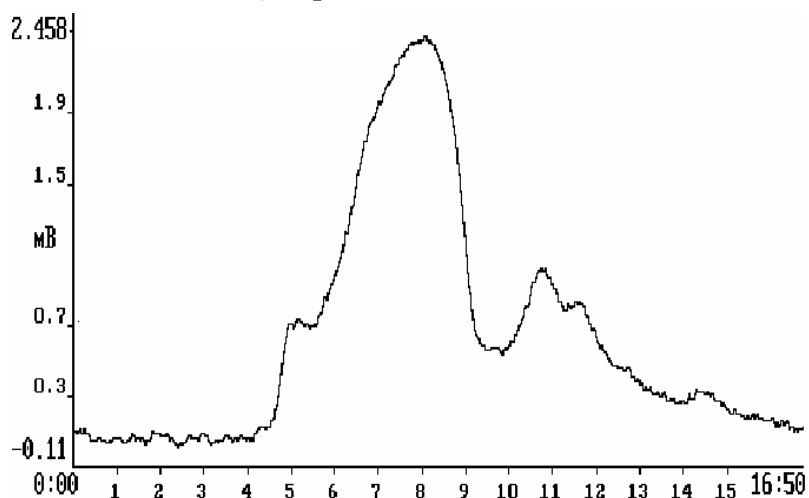
колонка TSK G4000SW (300x7,8 мм, “Тоуо Soda”, Япония)

0,15 М NaCl, расход 1 мл/мин.

При гидролизе растворами 2–5 н. серной кислоты (температура 100°C, 5 часов) не удалось добиться полного распада полимерной цепи экзополисахарида, ЭПС расщеплялся на фрагменты с молекулярной массой составляющей примерно 40 000 (рис. 3.6).

Рисунок 3.6

Гельпроникающая хроматография гидролизатов ЭПС
(гидролиз 4 н. H_2SO_4)



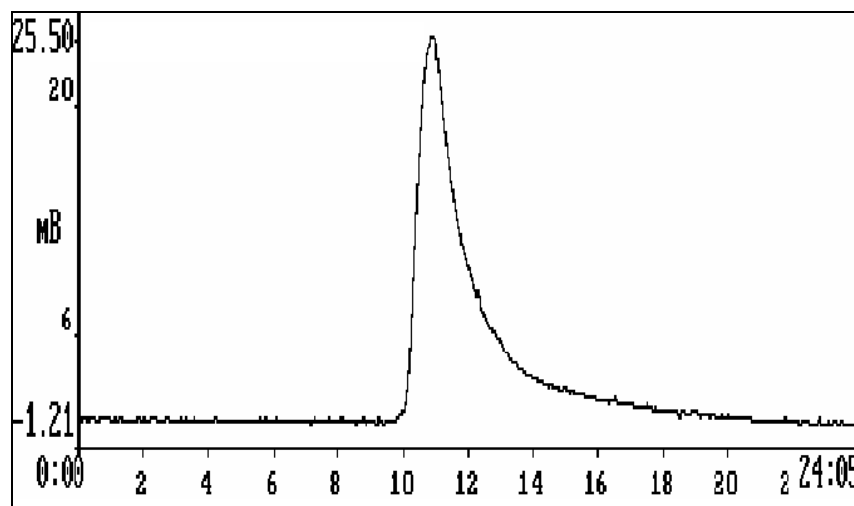
колонка TSK G4000SW (300x7,8 мм, "Тоуо Soda", Япония)

0,15 М NaCl, расход 1 мл/мин.

После гидролиза в 7% соляной кислоте хроматографические профили гидролизатов были идентичны результатам гельпроникающей хроматографии растворов сахарозы (рис. 3.7 и рис. 3.8).

Рисунок 3.7

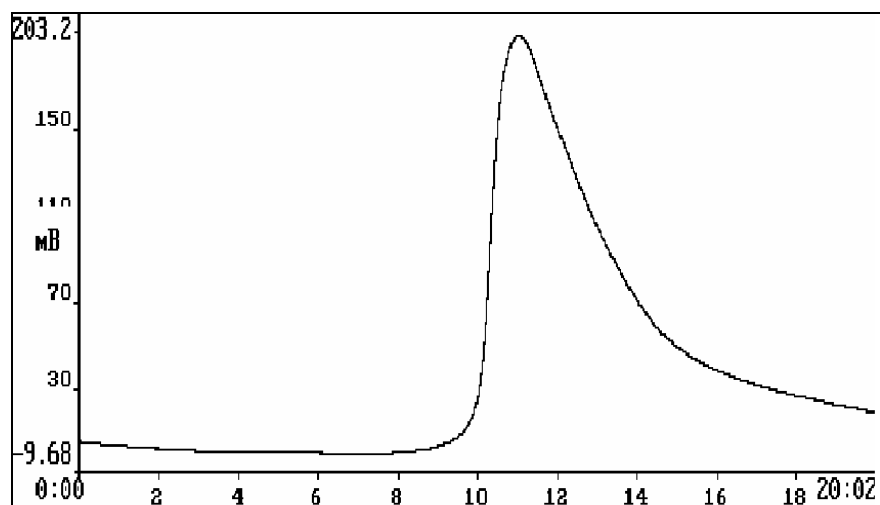
Гельпроникающая хроматография 4% раствора сахарозы



колонка TSK G4000SW (300x7,8 мм, "Тоуо Soda", Япония)

0,15 М NaCl, расход 1 мл/мин.

Гельпроникающая хроматография гидролизатов ЭПС
(гидролиз 4 н. HCl)

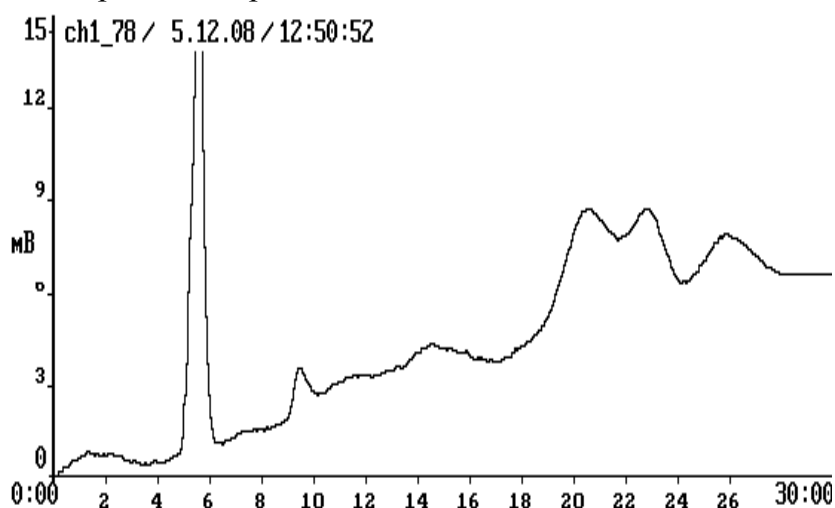


колонка TSK G4000SW (300x7,8 мм, “Тоуо Soda”, Япония)

0,15 М NaCl, расход 1 мл/мин.

При анализе методом ВЭЖХ на колонке Silasorb – NH₂, откалиброванной по углеводам, наблюдалось значительное удерживание компонентов гидролизата (рис. 3.9), что вероятно говорит о кислотном характере компонентов входящих в состав полимерной цепи полисахарида продуцируемого штаммом бактерии *Paenibacillus ehimensis* 739.

Хроматограмма гидролизата ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739



колонка Silasorb – NH₂ (290x7,5 мм), ацетонитрил : вода = 75 : 25, расход 1
мл/мин

Однако, в ИК спектрах гидролизатов присутствовали сигналы характерные для уроновых кислот, табл. 3.4.

Таблица 3.4

Данные ИК-спектров ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739

Волновое число ИК- спектра, см ⁻¹	Функциональная группа
3400	ОН
2800-2900	-CH ₃
1730, 1250	-COCH ₃
1607-1620	-COO-
1320, 808	Колебания маннуриновой кислоты (M - блоки)
1290, 787	Колебания гулуриновой кислоты (G - блоки)

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C экзополисахарида также содержат характерные для уронидов сигналы (табл. 3.5, 3.6).

Таблица 3.5

Характерные химические сдвиги спектра ЯМР ¹H
ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739

Кислота	Химические сдвиги, м.д.				
	H1	H2	H3	H4	H5
D – маннуриновая кислота	4,79	4,74	4,69	4,72	4,67
– гулуриновая кислота	4,84	4,72	4,74	4,76	4,82

Таблица 3.6

Характерные химические сдвиги спектра ЯМР ¹³C
ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739

Кислота	Химические сдвиги, м.д.				
	C1	C2	C3	C4	C5
D-маннуриновая кислота	105,82	70,84	71,31	78,70	77,56
L-гулуриновая кислота	106,51	65,72	68,83	82,61	68,83

Из данных ИК-спектроскопии можно рассчитать соотношение уроновых кислот в ЭПС, а именно величины M/G по сигналам интенсивностей полос поглощения при 808 (M) и 787 см⁻¹ (G) (Усов, 1999). Для ЭПС *Paenibacillus*

ehimensis 739 соотношение мономеров в полисахаридной цепи соответствуют величине M/G–0,64. Степень ацетилирования 10%.

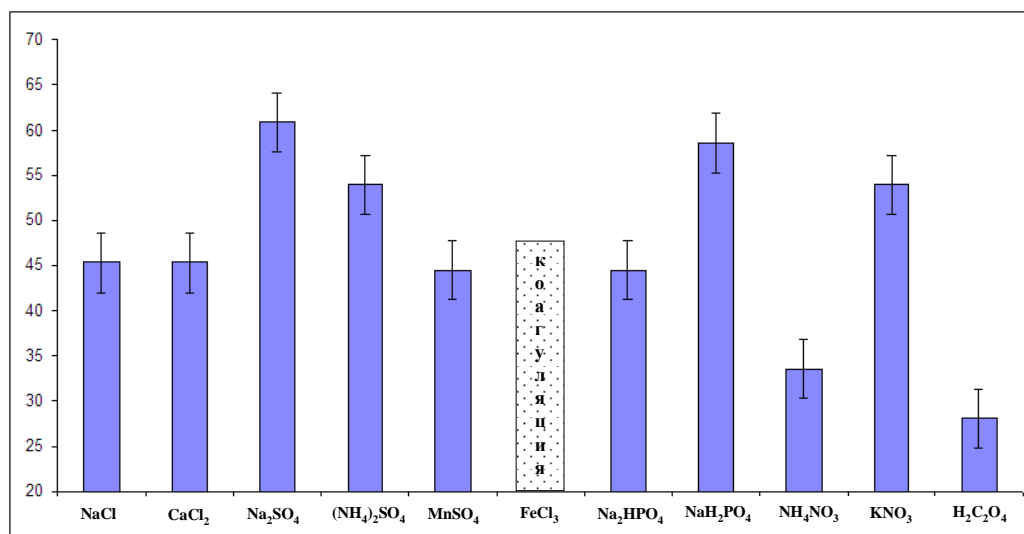
Физико-химические свойства и реология ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739

Одной из важнейших характеристик полисахаридов с точки зрения практической значимости является характер взаимодействия и поведения полимерной цепи полисахарида в растворах солей, а именно изменение вязкости растворов ЭПС в присутствии моно- и дивалентных ионов металлов. Не менее важны реологические характеристики ЭПС при различных рН растворителя, т.к. возможны изменения конформации молекул экзополисахарида вызывающие как повышение, так и резкое понижение вязкости (Dogsa, 2005). Все это и определяет стратегию и области практического приложения данных веществ.

Для изучения поведения растворов ЭПС в присутствии солей готовили 1% растворы ЭПС. Полученные данные представлены на рис. 3.10.

Рисунок 3.10

Вязкость ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739 в присутствии солей.

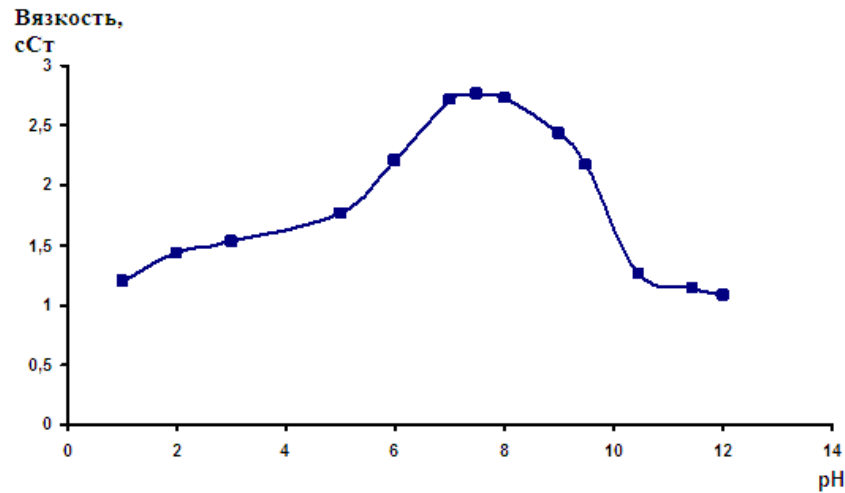


Из графика видно, что в присутствии сульфатов вязкость растворов ЭПС возрастает до 60%, хлориды повышали вязкость раствора ЭПС в среднем на 45% от исходной величины, характер воздействия нитратов в большей степени зависел от катиона так нитрат калия повышал вязкость на 53%, в то время как нитрат аммония всего на 33%. Из представленных на графике солей только хлорид железа (III) вызывал выпадение в осадок экзополисахарида.

Изменение рН раствора также оказывало влияние на вязкость растворов ЭПС рис. 3.11.

Рисунок 3.11

Зависимость вязкости ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739 от кислотности

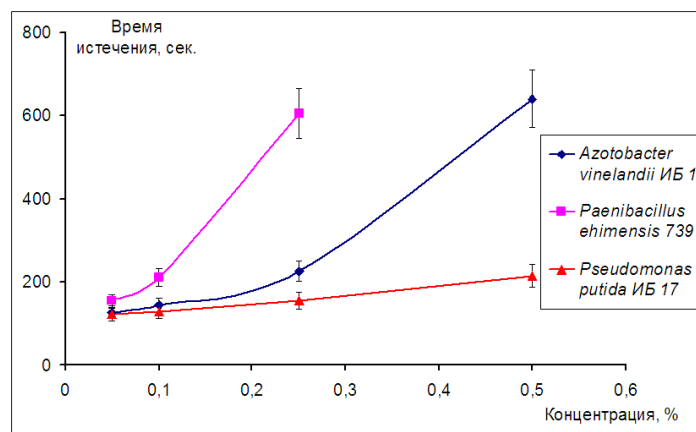


Из графика (рис. 3.11) видно, что наибольшая вязкость наблюдается при pH 7-8, повышение pH выше этого значения приводило к снижению вязкости ЭПС. Незначительное повышение вязкости происходило в интервале pH от 1 до 5. В целом можно сказать, что молекула ЭПС проявляет свойства полиэлектролитов. Вероятно, в результате взаимодействия с окружением молекула экзополисахарида изменяет свою пространственную структуру, что приводит к повышению, либо понижению вязкости раствора.

Кинематическая вязкость растворов ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739 была вдвое выше продуцента ЭПС *Azotobacter vinelandii* ИБ 1 при меньшей концентрации (рис. 3.12).

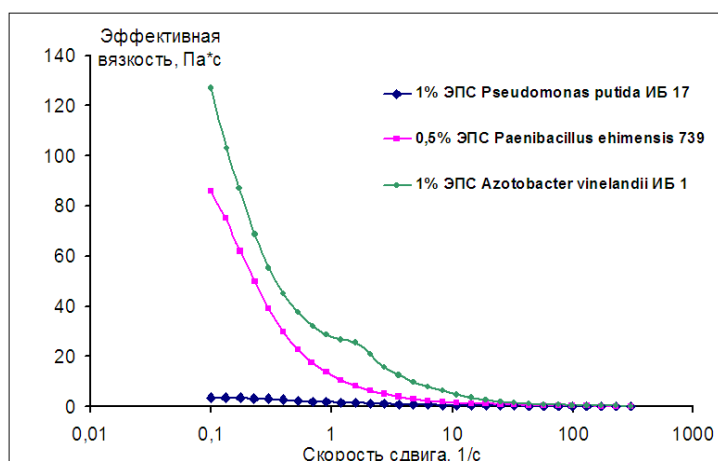
Рисунок 3.12

Кинематические вязкости растворов ЭПС

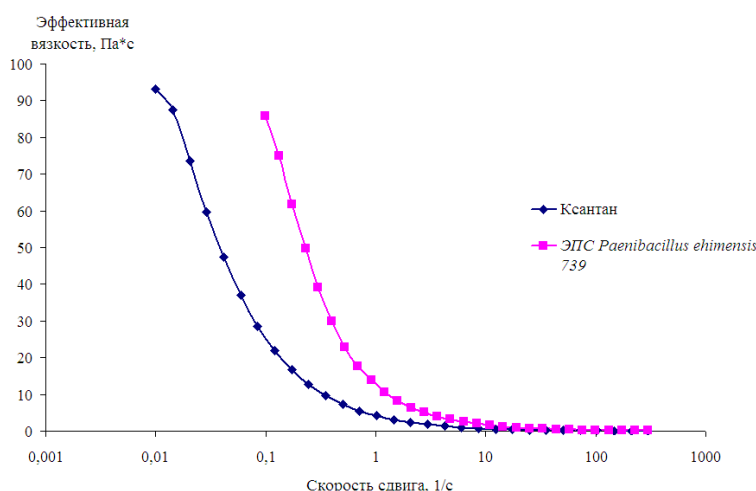


Изучение реологических свойств на реометре RheoStress-1 показало что ЭПС продуцируемый *Paenibacillus ehimensis* 739 при 0,5% концентрации имеет более высокие показатели эффективной вязкости чем ЭПС штаммов *Azotobacter vinelandii* ИБ 1 и *Pseudomonas putida* ИБ 17 (Рис. 3.13).

Сравнение реологических характеристик



Величина вязкости Ксантана НТ при скорости сдвига $5,4 \text{ с}^{-1}$ составила $2,5 \text{ Па}\cdot\text{с}$, аналогичные данные были получены для ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739 при вдвое меньшей концентрации экзополисахарида равной 0,5% (Хисаметдинов, 2009).

Сравнение реологических характеристик
экзополисахарида *Paenibacillus ehimensis* 739 и ксантана

По совокупности физико-химических свойств данный ЭПС принадлежит к бактериальным экзополисахаридам полиуронидного типа, что подтверждается спектрами ИК-спектроскопии и ЯМР ^1H и ^{13}C .

Токсикологические исследования продуцента ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739

Одним из важнейших требований при применении продуктов микробного синтеза в пищевой промышленности, медицине и сельском хозяйстве является безопасность, как самого штамма продуцента, так и продуктов метаболизма.

Если рассматривать сами экзополисахариды синтезируемые микробными клетками, то риск минимален (Moazami, 2001). Ведутся обширные исследования по увеличению их продуктивности, описываются генетически модифицированные штаммы бактерий *Azotobacter vinelandii* с повышенным синтезом альгинатов или полигидроксibuтирата (Galindo et al., 2007). Стало обыденным и использование растворов ЭПС продуцируемых *Leuconostoc mesenteroides* в качестве заменителей плазмы крови.

В то же время, экзополисахариды бактерий являясь биологически инертными субстанциями, могут обуславливать высокую резистентность продуцента к антибиотикам (Remminghorst, 2006), тяжелым металлам (Rathnayake, 2009) и антимикробным пептидам (Llobet et al., 2008) создавая вокруг бактериальной клетки барьер, защищающий ее от неблагоприятных воздействий.

В опытах доказано что штамм *Paenibacillus ehimensis* 739 является не вирулентным, не токсичным, не обладающим токсигенностью, не десимилирующим во внутренние органы, не имеющим существенного дисбиотического действия на микрофлору организма.

Выявлено иммуномодулирующее влияние и слабовыраженные аллергенные свойства штамма *Paenibacillus ehimensis* 739.

Местный раздражающий эффект на слизистые оболочки глаза и кожные покровы не выражен.

ВЫВОДЫ

1. Установлен оптимальный состав среды и условия культивирования, обеспечивающие максимальное продуцирование экзополисахаридов штаммом *Paenibacillus ehimensis* 739: перемешивание – 200 об/мин, температура – 25°C, концентрация мелассы – 30 г/, продолжительность культивирования – 168 ч, конечная вязкость культуральной жидкости составила >> 30 000 сСт.
2. Определены условия выделения и очистки экзополисахарида из культуральной жидкости штамма *Paenibacillus ehimensis* 739. Показано, что очистка ЭПС штамма *Paenibacillus ehimensis* 739 достигалась при осаждении из подкисленного раствора при pH равном 3 и соотношении КЖ:ЭПС – 1:1.
3. Методами жидкостной хроматографии, ИК– и ЯМР – спектроскопии показано, что ЭПС *Paenibacillus ehimensis* 739 относится к полиуронидам и является гетерополимером, мономерными единицами которого являются гулуоновая и маннуоновая кислоты в соотношении (M/G = 0,62); молекулярная масса ЭПС лежит в интервале 450 - 350 кДа.
4. Установлены физико-химические и реологические характеристики экзополисахарида *Paenibacillus ehimensis* 739. ЭПС стабилен в диапазоне pH 4,0-9,0 в присутствии нитратов, сульфатов, фосфатов, хлоридов щелочных и щелочноземельных металлов.
5. Проведена сравнительная характеристика с коммерческими образцами ксантана и ЭПС *Pseudomonas putida* ИБ 17, *Azotobacter vinelandii* ИБ 1. ЭПС штамма *Paenibacillus ehimensis* 739 обладает более высокими показателями эффективной вязкости при тех же скоростях сдвига и образует более вязкие гели при меньшей концентрации.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Логинов Я.О., Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Экзополисахариды бактерий родов *Azotobacter*, *Pseudomonas* и *Bacillus* для создания биофунгицидов пролонгированного действия //Аграрная Россия.-2009.-Специальный выпуск.-С. 125-126.
2. Четвериков С.П., Логинов Я.О., Худайгулов Г.Г., Логинов О.Н. Экзополисахариды бактерий *Azotobacter* и *Pseudomonas* – основа биополимеров для увеличения нефтеотдачи //Вестник Оренбургского государственного университета.-2009.-№ 10.-С. 509-511.
3. Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П. Высоковязкий экзометаболит бактерий *Pseudomonas putida* //Материалы докладов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов».-М.: Изд-во МГУ, 2009.-Микробиология.-С. 24.
4. Логинов Я.О., Логинов О.Н., Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П., Бактерии родов *Azotobacter*, *Pseudomonas* и *Paenibacillus* как продуценты биополимеров//Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». –М.: Изд-во МаксПресс, 2009.-С.113.
5. Худайгулов Г.Г., Логинов О.Н., Четвериков С.П., Экзополисахариды бактерий родов *Pseudomonas* и *Paenibacillus* и их реологические характеристики//Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». –М.: Изд-во МаксПресс, 2009.-С.193.
6. Худайгулов Г.Г., Влияние осмотического стресса на продукцию экзополисахаридов бактериями рода *Paenibacillus* //Материалы докладов XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов».-М.: Изд-во МГУ, 2010.-Микробиология.-С. 189.
7. Логинов Я.О., Худайгулов Г.Г., Четвериков С.П., Мелентьев А.И., Логинов О.Н. Биополимер альгинатной природы с преобладанием L-гулуруновой кислоты // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. - № 3. –С. 343–347.
8. Худайгулов Г.Г., Логинов О.Н., Мелентьев А.И., Экзополисахарид альгинатного типа *Paenibacillus ehimensis* 739 // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011.– №5. – С. 214-217.