

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА»

*На правах рукописи*

КИЧЕМАЗОВА НАТАЛЬЯ ВАЛЕНТИНОВНА

**ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ БАКТЕРИЙ  
РОДОВ *XANTHOBACTER* И *ANCYLOBACTER*: ХАРАКТЕРИСТИКА  
И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА**

03.02.03 Микробиология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, профессор  
**Карпунина Лидия Владимировна**

## Содержание

Введение.....	4	
1. Обзор литературы.....	10	
1.1. Общая характеристика бактерий-диссипотрофов.....	10	
1.2. Экзополисахариды микроорганизмов: свойства и функции.....	16	
1.3. Значение экзополисахаридов микроорганизмов в народном хозяйстве.....	29	
2. Экспериментальная часть.....	39	
2.1. Объекты и методы исследований.....	39	
2.1.1. Объекты исследований.....	39	
2.1.2. Среды, используемые для культивирования бактерий.....	39	
2.1.3. Выделение и очистка экзополисахаридов <i>X. xylophilus</i> Z-0055 и <i>A. abiegenus</i> Z-0056.....	40	
2.1.4. Определение белка.....	44	
2.1.5. Определение углеводов.....	44	
2.1.6. Определение нуклеиновых кислот .....	44	
2.1.7. Определение моносахаридного состава экзополисахаридов.....	44	
2.1.8. Определение молекулярных масс экзополисахаридов .....	46	
2.1.9. Определение вязкости растворов экзополисахаридов .....	46	
2.1.10. Определение влияния экзополиса харидов на рост микроорганизмов.....	46	
2.1.11. Определение токсичности экзополисахаридов.....	47	
2.1.12. Метод приготовления гистологических срезов.....	48	
2.1.13. Статистическая обработка результатов.....	48	
2.2. Результаты исследований .....	49	
2.2.1. Влияние условий внешней среды на рост и продукцию экзополисахаридов <i>X. xylophilus</i> Z-0055 и <i>A. abiegnus</i> Z-0056.....	49	
2.2.1.1. Влияние температуры на рост и продукцию экзополисахаридов <i>X. xylophilus</i> Z-0055.....	49	
2.2.1.2. Явление диауксии в процессе роста культуры <i>X. xylophilus</i> Z-0055 .....	51	66
2.2.1.3. Влияние температуры на рост и продукцию экзополисахаридов <i>A. abiegnus</i> Z-0056.....	52	
2.2.1.4. Влияние аэрации на рост и продукцию экзополисахаридов <i>X. xylophilus</i> Z-0055 и <i>A. abiegnus</i> Z-0056.....	54	
2.2.1.5. Влияние азота и фосфора на рост и продукцию экзополисахаридов <i>X. xylophilus</i> Z-0055 и <i>A. abiegnus</i> Z-0056.....	56	
2.2.1.6. Влияние источника углерода на рост и продукцию экзополисахаридов <i>X. xylophilus</i> Z-0055.....	58	
2.2.1.7. Влияние источника углерода на рост и продукцию экзополисахаридов <i>A. abiegnus</i> Z-0056.....	61	
2.2.2. Физико-химические свойства экзополисахаридов <i>X. xylophilus</i> Z-0055 и <i>A. abiegnus</i> Z-0056.....	64	
2.2.2.1. Физико-химические свойства экзополисахаридов		

<i>X.xylophilus</i> Z-0055.....	64
2.2.2.2. Физико-химические свойства экзополисахарида <i>A.abiegnus</i> Z-0056.....	67
2.2.3. Биологические свойства экзополисахаридов <i>X. xylophilus</i> Z-0055 и <i>A.abiegnus</i> Z-0056.....	69
2.2.3.1. Влияние экзополисахаридов <i>X.xylophilus</i> Z-0055 и <i>A. abiegnus</i> Z-0056 на рост микроорганизмов.....	69
2.2.3.2. Влияние экзополисахаридов <i>X. xylophilus</i> Z-0055 и <i>A.abiegnus</i> Z-0056 на инфузории <i>C.stenii</i> .....	71
2.2.3.3. Влияние экзополисахаридов <i>X.xylophilus</i> Z-0055 и <i>A.abiegnus</i> Z-0056 на организм лабораторных мышей.....	73
2.2.3.4. Влияние экзополисахаридов <i>X. xylophilus</i> Z-0055 и <i>A. abiegnus</i> Z-0056 на микрофлору толстого кишечника мышей....	80
Заключение.....	82
Выводы.....	88
Список сокращений и условных обозначений.....	89
Список литературы.....	90

## Введение

**Актуальность темы.** В последнее время возрастает роль бактериальных экзополисахаридов (ЭПС) в различных сферах человеческой деятельности: в нефтяной промышленности, медицине, косметике, пищевом производстве, сельском хозяйстве [152, 157, 185, 190, 214, 232, 239, 243, 270, 284]. В мире спрос на ЭПС превышает предложение, это связано с тем, что в каждой отрасли требуются биополимеры с различными характеристиками: как функциональными – способность растворяться в воде, создавать растворы, обладающие высокой вязкостью, так и биологическими – иммуномодулирующими, противовоспалительными, бактерицидными, радиопротекторными, ранозаживляющими, противоопухолевыми, антиканцерогенными [21, 25, 34, 129, 136, 158, 159, 170, 239]. Поэтому большое внимание уделяется поиску и изучению продуцентов полисахаридов, а также исследованию и практическому внедрению этих полимеров [38, 54, 61, 64, 91, 109, 118, 163, 198, 232, 273]. Экзопполисахариды бактерий обладают уникальными физико-химическими, биологическими и функционально-технологическими свойствами [4, 8, 25, 34, 78, 127, 146, 167, 181, 274, 285].

Бактериальные ЭПС наиболее перспективны с точки зрения биотехнологии по сравнению с полисахаридами растительного и животного происхождения. Это связано с возможностью регулирования свойств ЭПС в зависимости от условий культивирования бактерий, а также выращивания их на дешевых субстратах, таких как отходы производств [32, 50, 256, 261]. Помимо этого, в отличие от полисахаридов растительного происхождения, бактериальные не зависят от климатических условий.

**Степень разработанности темы исследования.** Бактерии родов *Xanthobacter* и *Ancylobacter* встречаются в ультрапресных кислых дистрофных водах Северных болот России. Они вносят весомый вклад в круговорот углерода в экосистеме, участвуя в начальной стадии разложения древесины [17]. О бактериях рода *Xanthobacter* и *Ancylobacter* упоминается в статьях [228, 280]. Данные о структуре и свойствах ЭПС этих бактерий немногочис-

ленны. Так, в работе [223] имеются сведения о химических свойствах ЭПС бактерий *Xanthobacter* sp., работ об ЭПС бактерий рода *Ancylobacter* нам не известны. Виды *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 впервые были описаны в 2010 году [39, 40]. ЭПС этих культур к началу наших исследований не были изучены, что определяет большую теоретическую значимость данной работы. Кроме того, интерес к этим бактериям обусловлен и экономической выгодой, так как они потребляют органический субстрат в низкой концентрации и в дальнейшем могут расширить спектр, применяемых в практических целях, биополимеров. В связи с этим исследования, посвященные изучению ЭПС бактерий *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056, являются актуальными и могут иметь важное научное и прикладное значение.

**Цель работы** состояла в выделении экзополисахаридов бактерий *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 и *Ancylobacter abiegnus* Z-0056, а также характеристике их основных физико-химических и биологических свойств.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Подобрать оптимальные условия культивирования *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 (состав питательной среды, температура, pH, время культивирования) для обеспечения максимального продуцирования экзополисахаридов в лабораторных условиях.

2. Выделить и очистить экзополисахариды *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 из культуральной жидкости.

3. Определить молекулярную массу, моносахаридный состав и вязкость растворов полученных экзополисахаридов *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056.

4. Изучить влияние экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 на микроорганизмы, встречающиеся в естественной среде обитания этих бактерий (*Singulisphaera mucilaginoso* Z-0071, *X. xylophilus* Z-0055, *A.abiegnus* Z-0056) и тест-культуры (*Pseudomonas aeruginosa* 27533, *Escherichia coli* 01, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Bacillus cereus* 8035, *Candida albicans* 230).

5. Изучить влияние экзополисахаридов *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 на инфузории *Colpoda stenii* и организм лабораторных животных.

6. Изучить влияние экзополисахаридов *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 на микрофлору толстого кишечника лабораторных мышей.

### **Научная новизна**

Впервые обнаружены и охарактеризованы ЭПС бактерий *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056, подобраны условия для оптимальной продукции ЭПС (состав питательной среды, температура, pH, время культивирования). Показано, что *X.xylophilus* Z-0055 максимально продуцируют экзополисахариды на среде МС при 31°C, pH 5,5 на 100 часов культивирования, а *A.abiegnus* Z-0056 – на среде МСО при 25°C, pH 5,5 на 100 часов культивирования. Впервые выделены и очищены ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056, определены их молекулярные массы, углеводный состав и вязкость растворов. Установлено, что ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 усиливают рост некоторых бактерий естественного местообитания лишь в концентрации 1,0 г/л, в то время как в концентрациях 0,25; 0,5 г/л такого действия не наблюдали. Показано, что в концентрациях 0,25; 0,5; 1,0 г/л исследуемые ЭПС усиливают рост *P.aeruginosa* 27533, и не влияют на рост таких микроорганизмов как *E.coli* 01, *S.aureus* 209-Р, *B.cereus* 8035, *C.albicans* 230. Получены данные о токсическом действии ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 на инфузории *C. stenii* в концентрации 1,0 г/л. Обнаружено, что ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 оказывают различное влияние на показатели белкового, углеводного, липидного, азотистого, водно-солевого обменов у лабораторных беспородных мышей. Показано, что введение ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 в организм мышей в дозе 0,06 г/кг способствует увеличению количества молочнокислых бактерий в толстом кишечнике в 2 и 4 раза, а в дозе 3,0 г/кг – в 40 и 80 раз соответственно.

**Теоретическое и практическое значение работы.** Полученные результаты расширяют представление о составе и свойствах экзогликанов и вносят существенный вклад в фундаментальные исследования экзополисахаридов бактериального происхождения. По материалам диссертационной работы получены 2 патента на изобретения «Способ получения экзополисахарида бактерий *Ancylobacter abiegnus*» (№ 2017144046 от 31.07. 2018, бюл. № 22), «Способ получения экзополисахарида бактерий *Xanthobacter xylophilus*» (№ 2017144093 от 15.08.2018, бюл. №23) и опубликованы методические рекомендации «Определение биологических свойств бактериальных экзополисахаридов» (в соавторстве с М.Н. Денисовой, Е.Н. Бухаровой, Л.В. Карпуниной, 2014) для студентов старших курсов, магистрантов, аспирантов, специалистов микробиологических и биотехнологических лабораторий, рекомендованные Учебно-методической комиссией и одобренные Ученым советом факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Саратовского государственного аграрного университета им. Н.И. Вавилова (протокол № 3 от 18.02.2014 г.). Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций по микробиологии, биотехнологии, проведении лабораторно-практических занятий и написании дипломных работ в ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» и ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

**Методология и методы исследования.** Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных исследователей по вопросам выделения и очистки экзополисахаридов, изучению их химического состава, физико-химических и биологических свойств. Основу данного исследования составляют комплексный анализ и системный подход в изучении рассматриваемой темы. При проведении исследования и изложения материала были применены общенаучные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, эмпирические методы исследования в форме наблюдения, эксперимента, описания, измерения и

сравнительно-сопоставительного анализа. Применение указанных методов, а также анализ фактического материала позволил обеспечить объективность полученных выводов и результатов.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Оптимальными условиями культивирования для наибольшей продукции экзополисахаридов для *X.xylophilus* Z-0055 являются: температура 31 °С, рН 5,5, время культивирования 100 ч на среде МС, а для *A.abiegnus* Z-0056 – 25 °С, рН 5,5, время культивирования 100 ч на среде МСО.

2. Выделенный из культуральной жидкости ЭПС *X. xylophilus* Z-0055, представлен нейтральной и кислой фракциями в равном соотношении с молекулярными массами 10-20 кДа, 30-40 кДа соответственно и характеризуются разным моносахаридным составом: нейтральная фракция является глюкогалактоманнаном с соотношении 1:2:2; кислая фракция – ксиллогалактоглюкоуронаном с соотношении 2:1:1; 1% раствор ЭПС при +25 °С имеет динамическую вязкость 58 мПа·с. Экзопполисахарид *A.abiegnus* Z-0056 обладает молекулярной массой 10-20 кДа и состоит из кислой фракции, является глюкоманногалактоуронаном с соотношении 1:2:2; 1% раствор ЭПС при +25 °С имеет динамическую вязкость 52 мПа·с.

3. Экзопполисахариды *X. xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 способствуют увеличению биомассы бактериальных клеток своих продуцентов и *S.mucilaginosa* Z-0071, обитающих в ультрапресных дистрофных водах Северных болот России в концентрации 1 г/л и бактерий *P.aeruginosa* 27533 в концентрациях 0,25; 0,5; 1,0 г/л. Экзопполисахариды *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 в концентрации 1,0 г/л оказывают токсичное действие на инфузории *C.stenii*. В дозе 0,06 и 3,0 г/кг данные ЭПС оказывают различное влияние на метаболические процессы (белковый, углеводный, липидный, азотистый, водно-солевой) у лабораторных беспородных мышей. Экзопполисахариды *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 в дозе 0,06 г/кг увеличивают количество молочнокислых бактерий в толстом кишечнике мышей в 2 и 4 раза, а в дозе 3,0 г/кг – в 40 и 80 раз соответственно.



**Работа выполнена** на кафедре микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

#### **Апробация работы:**

Материалы диссертации были представлены на: конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов по итогам работы 2010-2018 гг. (Саратов, 2011; 2012; 2013; 2014; 2016, 2018); IV Всероссийской школе-конференции «Химия и биохимия углеводов» (Саратов, 2011); IV Региональной научной конференции «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» (Саратов, 2012); 8-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2014); II Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Саратов, 2014), Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы» (Саратов, 2014).

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 19 работ, из них 5 статей из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК РФ и 2 патента.

**Личный вклад соискателя** состоит в подготовке и проведении экспериментальных исследований на всех этапах диссертационной работы, интерпретации полученных результатов, оформлении патентов, участии в подготовке публикаций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, двух глав: обзора литературы и экспериментальной части, включающей описание объектов и методов исследований, результаты исследований и их обсуждение, а также заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Работа изложена на 121 странице, содержит 19 таблиц, 25 рисунков. Список литературы включает 286 наименований, в том числе 182 зарубежных.

## 1. Обзор литературы

### 1.1. Общая характеристика бактерий-диссипотрофов

Бактерии-диссипотрофы встречаются в микобактериальных сообществах бореальной зоны России и относятся к группе омброфилов (от греч. *ómbros* – дождь и *philéo* – люблю) [17, 36]. Омброфилы встречаются в ультрапресных дистрофных водах, которые образуются на основе дождевой воды, отличающейся низкой минерализацией. К этой группе относятся также и грибы-ксилотрофы, в сообществе с которыми и обитают бактерии-диссипотрофы. Диссипотрофные бактерии используют мономеры, которые образуются при деструкции древесины грибами-ксилотрофами [17]. Таким образом, происходит расщепление древесины в лесо-болотных экосистемах северной части России.

В условиях бореальной зоны России, где большая влажность за счет частых осадков и произрастают леса, формируются лесо-болотные экосистемы. Они являются зоной водосбора болот, рек, озер. В каждом из этих водоемов обитает характерная омброфильная микробиота [36]. Источником органического вещества в лесо-болотных экосистемах является древесина [51]. Водная среда здесь образуется за счет дождевой воды. Таким образом, происходит формирование кислых темноокрашенных дистрофных вод, сопровождающееся деструкцией древесины [35].

В омброфильном сообществе лесных экосистем, ответственном за деструкцию древесины, выделяют две основные группировки микроорганизмов:

1. Грибы-ксилотрофы (*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*) [95]. Грибы осуществляют первичное разложение древесины при помощи внеклеточных ферментов (лакказы, пероксидазы) [83], за счет чего образуется доступное органическое вещество в данной экосистеме. Эти грибы развиваются в пленочной воде влажной древесины.

2. Бактерии-диссипотрофы связаны с грибами-ксилолитиками, они продолжают биологическую трансформацию в дистрофных ультрапресных

водах. Бактерии потребляют органические кислоты и олигосахариды, образующиеся при гидролизе грибами древесины. На данном этапе разложения древесины микроорганизмы представлены преимущественно ацидофильными или ацидотолерантными омброфилами. В результате деятельности ацидотрофов происходит снижение концентрации органических кислот в среде, и она становится из кислой нейтральной [35].

Бактерии в микосфере играют подчиненную роль, находясь под сильным воздействием грибов, включая их антибиотическое действие. Поэтому микотрофные бактерии обладают устойчивостью к ряду факторов микосферы. Для микроорганизмов микобактериального сообщества определяющими служат биотические взаимоотношения с грибами – устойчивость к антибиотикам, к окислительному стрессу.

Бактерии промывных вод используют преимущественно рассеиваемые продукты гидролиза древесины вне непосредственного воздействия мицелиальных организмов и образуемой ими биопленки. Такие организмы называются диссипотрофами [37].

Таким образом, на каждой стадии разложения древесины преобладают определенные виды микроорганизмов. На первом этапе формируются кислые условия, которые ранее считались неблагоприятными для развития микроорганизмов. Поэтому ацидофильные олиготрофные микроорганизмы, обитающие в совокупности с грибами-ксилотрофами, слабо изучены.

Грибы развиваются в пленочной воде увлажненной древесины, осуществляя ее твердофазную ферментацию. Бактерии-диссипотрофы развиваются в жидкой фазе промывных вод при низкой концентрации доступных органических веществ. Эти группировки связаны прямой трофической связью: к бактериям в водной фазе поступают вымываемые метаболиты, образующиеся при расщеплении древесины грибами [36].

Г.А. Заварзиным [35] было отмечено, что бактерии совместно с грибами производят расщепление древесины и производят деацидификацию среды. Они утилизируют соединения с небольшой молекулярной массой, которые остаются после процесса гидролиза древесины грибами. Таким обра-

зом, бактерии и грибы в этом сообществе занимают свойственные им трофические ниши. Микроорганизмы (например, *A. abiegnus* sp. nov., *X. xylophilus* sp. nov.), использующие продукты обмена грибов, прежде всего органические кислоты, относятся к ацидотрофам.

Выделяют следующие группы диссипотрофных бактерий, являющиеся наиболее важными представителями микрофлоры ультрапресных кислых дистрофных вод.

1. Порядок *Planctomycetales*. Это специфическая группа микроорганизмов, имеющая отличия от представителей домена *Bacteria*. Поверхность клеток этих бактерий покрыта структурами, напоминающими кратеры, функции которых пока не изучены. В мембранах клеток планктомицетов имеются гопаноиды. В клетке цитоплазма разделена на компартменты [192], нуклеоид ограничен двойной мембраной. В клетке планктомицетов присутствуют рибоплазма и парифоплазма. Рибоплазма – компартмент, который содержит белки и рибосомы, парифоплазма лишена рибосом [154]. Это термофильные или мезофильные микроорганизмы, оптимум pH для которых составляет 8-9 [275]. Планктомицеты распространены в природе повсеместно (наземные, пресноводные, морские экосистемы, промышленных источниках). Экологическая роль этих микроорганизмов не исследована.

Порядок *Planctomycetales* включает семейство *Planctomycetaceae*, которое содержит 9 родов: *Planctomyces*, *Gemmata*, *Rhodopirellula*, *Pirellula*, *Schlesneria*, *Singalisphaera*, *Zavarzinella*, *Isosphaeara*, *Blastopirellula* [242, 277].

2. Семейство *Xanthobacteraceae*. Представители этого семейства часто встречаются в дистрофных водах. В семейство *Xanthobacteraceae* входят представители родов *Xanthobacter*, *Ancylobacter*, *Azorhizobium*, *Labrys*, *Starkeya* [153].

Род *Azorhizobium*. Эти микроорганизмы в первую очередь интересны как клубеньковые азотфиксирующие бактерии, являющиеся при этом

симбионтами растений. В свободном состоянии такие бактерии в природе не встречаются.

Род *Ancylobacter* относится к классу *Alphaproteobacteria*, отряду *Rhizobiales*, семейству *Hyphobacteriaceae*. Первоначально этот род был описан J. Orskov в 1928 году и получил название *Microcyclus*, а в 1983 г. был переименован в *Ancylobacter* [229] поскольку *Microcyclus* использовалось в классификации грибов еще до работ J. Orskov [228]. В настоящее время род *Ancylobacter* включает 6 видов: *A.aquaticus*, *A.abiegnus*, *A.oerskovii*, *A.polymorphus*, *A.rudongensis*, *A.vacuolatus*. Эти бактерии играют важную экологическую роль, поскольку являются олиготрофными метилотрофами, оксалотрофами, водород использующими литотрофами [229].

Клетки бактерий *A.abiegnus* кокковидной формы, плеоморфные, неподвижные, размером 0,65 – 0,9 мкм, имеют многочисленные фимбрии (Рисунок 1).

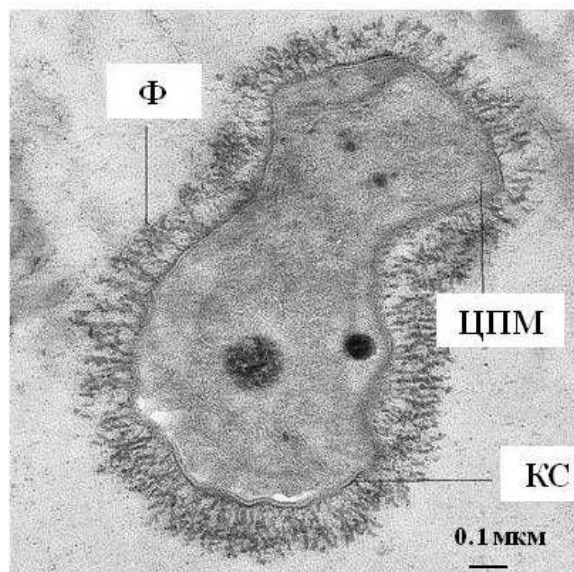


Рисунок 1 – Ультратонкий срез клетки  
*A. abiegnus* sp. nov.

Примечание – Ф – фимбрии; КС – клеточная стенка;  
ЦПМ – цитоплазматическая мембрана (цит. по [40]).

По Граму окрашиваются отрицательно. Не образуют спор. Размножение происходит при помощи неравномерного деления. Вначале деления образуются палочковидные клетки длиной 1,35 – 1,5 мкм, распадающиеся на две

клетки неравного размера. Колонии *A.abiegnus* sp. nov. круглые, с ровным краем, диаметром 4 мм, выпуклые, плотные, слизистые, молочного цвета. Облигатные аэробы. Не используют C1-соединения, моно- и дисахариды, аминокислоты. Источниками углерода и энергии являются органические кислоты: ацетат, глюконат, малат, сукцинат, цитрат, оксалат, а также ксилан и ксилоза. Не растет хемолитоавтотрофно. Является олиготрофами. Оптимальная концентрация субстрата в среде – 0,25 г/л. Для роста необходим дрожжевой экстракт (0,05 г/л). Является умеренно ацидофильным микроорганизмом (оптимум для роста составляет pH 5,0 – 5,5) [40].

Род *Labrys*. Представители этого рода имеют характерную только для данного вида морфологию. В структуре характерно наличие коротких протек. Распространены в пресноводных экосистемах. Неприхотливы к источнику питания. Могут использовать разнообразные углеводы [153, 271].

Род *Starkeya*. Об этом роде стало известно относительно недавно, в 2000 году. Единственным представителем считались бактерии *S. novella*. Представители этого рода в качестве источников энергии используют тиосульфат и тетратионат. Являются нейтрофилами, мезофилами, облигатными аэробами, способны к факультативной хемолитоавтотрофии. В случае гетеротрофного роста могут сбрасывать различные органические кислоты и углеводы. Встречаются в почвенных и пресноводных местах экосистемах [174].

Род *Xanthobacter*. К данному роду относятся виды: *X.autotrophicus*, *X.agilis*, *X.aminooxidans*, *X.flavus*, *X.tagetididis*, *X.viscosus*, *X.xylophilus*. Представители этих видов распространены: в водных экосистемах, влажных почвах лугов, донных отложениях озер, морей, ризосфере риса, осадках отстойников, почвах загрязнённых нефтью. Повсеместная встречаемость представителей рода *Xanthobacter* обоснована их физиологическими особенностями. Ксантобактеры являются аэробами, они способны к фиксации атмосферного азота. Эти бактерии могут расти литоавтотрофно и хемогетеротрофно [280]. В качестве источников углерода и энергии бактерии *Xanthobacter* используют C1-соединения: метанол и метилированные ами-

ны, органические кислоты, спирты, а также некоторые углеводы [57]. Некоторые бактерии этого вида могут использовать сложные органические соединения как субстрат для роста. Например, бактерии вида *X.tagetidis* используют гетероциклические соединения [29], а *X.polyaromaticivorans* – в микроаэрофильных условиях полициклические и ароматические соединения [166]. Представители рода *Xanthobacter* по морфологии являются, как правило, плеоморфными палочками, в их клетках характерно наличие пигмента жёлтый каротиноидный (дирамнозидзеаксантин), *X.polyaromaticivorans* – пигмент оранжевого цвета (зеаксантин). Ксантобактерии имеют оптимум для роста в пределах 6.8-7.8 [280].

*X. xylophilus* Z-0055 относится к семейству *Xanthobacteraceae*, порядка *Rhizobiales*, класса *Alphaproteobacteria*. Род *Xanthobacter* объединяет виды *X.agilis*, *X.aminooxidans*, *X.autotrophicus*, *X.flavus*, *X.tagetidis*, *X.viscosus* и *X.xylophilus*.

Клетки бактерий имеют овальную форму, размером 0.4×0.7мкм (Рисунок 2).

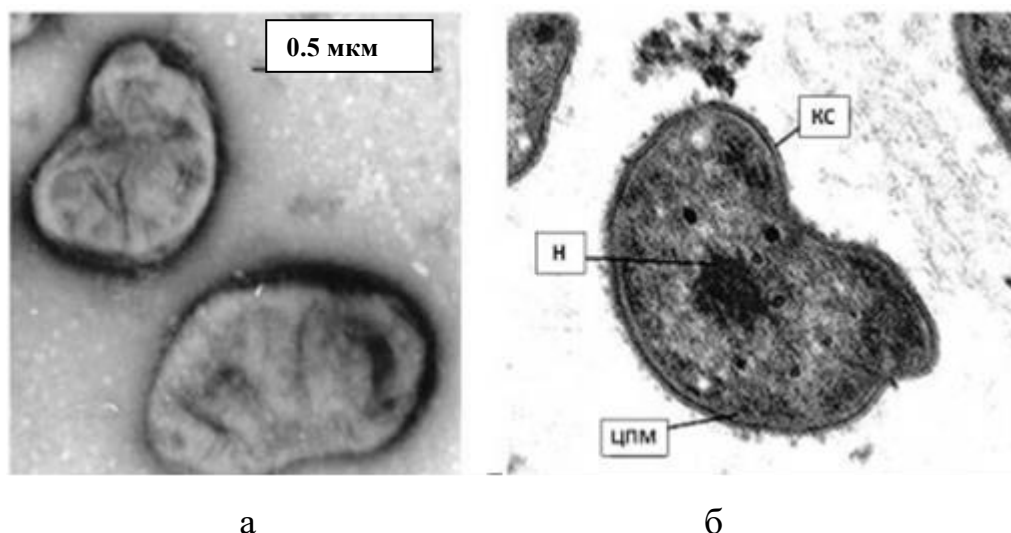


Рисунок 2– Электронно-микроскопическая фотография (а) и ультратонкий срез (б) клеток *X. xylophilus* Z-0055  
Примечание – КС – клеточная стенка; ЦПМ – цитоплазматическая мембрана; Н – нуклеоид (цит. по [39]).

Микроорганизмы не образуют капсулы, не способны к движению. Размножаются неравномерным делением. Перед началом деления происходит формирование подковообразной клетки размером 0.4 – 0.7× 0.8 –1.2 мкм,

которая впоследствии распадается на две овальные. По Граму окрашиваются отрицательно. На плотной питательной среде бактерии образуют колонии 2 мм в диаметре, округлой формы, плотные, выпуклые, слизистые, оранжевого цвета (пигмент – каротин). Бактерии рода *Xanthobacter* является облигатными аэробами. Для роста нуждаются в дрожжевом экстракте. Источником углерода в среде могут служить глюконат, сукцинат, цитрат, оксалат, ксилоза и ксилан. Не потребляют моно-, ди-, полисахариды, аминокислоты, сахароспирты. Оптимальная концентрация субстрата в среде 0,025%. Не растут литоавтотрофно. Не способны к фиксации молекулярного азота [39].

## 1.2. Экзополисахариды микроорганизмов: свойства и функции

В последние годы микробные ЭПС являются предметом усиленных теоретических и прикладных исследований. Это обусловлено уникальными свойствами этих биополимеров. Как известно из литературных источников, растворы ЭПС обладают суспендирующими, эмульгирующими свойствами, они также способны изменять реологические характеристики водных систем. Эти биополимеры применяют в пищевой, фармацевтической, нефтяной промышленности, текстильной, химической, медицине и сельском хозяйстве [1, 2, 5, 9, 112, 137, 152, 157, 190, 232, 249, 257, 270, 273].

На мировом рынке потребность в микробных ЭПС постоянно растет. Это подтверждается увеличением объемов производства бактериального ЭПС ксантана, а также появлением новых микробных ЭПС. Примерами микробных полисахаридов (ПС) могут служить: курдлан – продуцент *Alcaligenes faecalis* [32], эмульсан (*Acinetobacter calcoaceticus*) [3], декстран, продуцируемый *Leuconostoc dextranicum*, *L.mesenteroides*, занфло – *Erwinia tahitica*, ксантан – *Xanthomonas campestris*, полимиксан – *Bacillus polymyxa* [59].

К синтезу ЭПС способны многие микроорганизмы. Впрочем, выход этих биополимеров у разных продуцентов отличается в широких пределах в зависимости от условий их культивирования. Экзополисахариды



микроорганизмов отличаются локализацией их в клетках, по строению, физико-химическим, биологическим свойствам. Тем не менее, большая часть бактериальных полисахаридов обладает определенной структурой, характерной для вида [93]. У микробных полисахаридов имеются преимущества перед растительными полисахаридами. Во-первых, микробные ЭПС можно получать в нужном количестве независимо от сезона. Во-вторых, эти биополимеры получать экономически выгоднее из-за относительной дешевизны субстратов, на которых микроорганизм способен продуцировать ЭПС в большом объеме [50]. В-третьих, микробные ЭПС уникальны тем, что в них обнаруживаются моносахара, которых нет в полисахаридах другого происхождения [93].

Полисахариды – высокомолекулярные углеводы формулы  $C_nO_nH_{2m}$ , состоящие из остатков моносахаридов, которые соединены гликозидными связями. Они включают в состав один или несколько моносахидных остатков. Различают экзо- и эндополисахариды, гомо- и гетерополисахариды [254]. Наиболее многочисленная – это группа гетерополисахаридов. Гомополисахариды состоят из моносахаров одного вида. Гомополисахариды объединены в четыре группы:  $\alpha$ -D-глюканы,  $\beta$ -D-глюканы, фруктаны и полигалактаны. ЭПС этой группы обладают большой молекулярной массой [16, 125, 260].

Гетерополисахариды состоят, главным образом, из повторяющихся моносахаридов, количество которых может составлять в биополимере от двух до восьми. Молекулярная масса таких полисахаридов достаточно большая и колеблется от  $5 \cdot 10^5$  до  $2 \cdot 10^6$  Да. Мономерами, входящими в состав гетерополисахаридов являются галактоза, манноза, глюкоза, рамноза, N-ацетилглюкозамин, уроновые кислоты. В состав могут входить фосфаты, ацетил и глицерин [140, 237].

Моносахаридные остатки в полисахаридах могут быть в фуранозной или пиранозной форме. Моносахарид образует одну гликозидную связь с рядом стоящим моносахаридом. Но для присоединения других моносахаридов этот же моносахарид может предоставить несколько

гидроксильных групп. Поэтому полисахариды могут иметь разветвленную или линейную структуру. В составе полисахаридов преобладают D-манноза, D-глюкоза, D-галактоза, не редко в составе ЭПС присутствует D-глюкуроновая кислота, L-рамноза, реже – L-фукоза, а D-маннуриновая и L-гулуриновая кислоты – очень редко. Хотя в состав ЭПС могут входить одни и те же мономеры, свойства этих биополимеров могут значительно различаться из-за своего композиционного состава, а, следовательно, и по физико-химическим свойствам [196]. Состав и структура часто определяет пространственное ориентирование полисахаридов [33, 186, 266].

Полисахариды всегда входят в состав микроорганизмов, присутствуя как в комплексах с липидами, нуклеиновыми кислотами, белками, так и изолированно [120, 243, 285].

Распределение в клетке полисахаридов определяет их иммунохимические, физиологические, биохимические свойства [21, 42, 93, 114].

В зависимости от локализации в клетке полисахариды микроорганизмов принято делить на внеклеточные (экзогликаны) и внутриклеточные (эндогликаны) [33, 42, 250].

Полисахариды мембран, цитоплазмы и клеточных стенок являются внутриклеточными. Полисахариды капсул, свободных слизей, чехлов относят к внеклеточным. Существует также термин «экзогликаны», его применяют для полисахаридов свободной слизи [21].

В соответствии с классификацией микробных ЭПС, их принято разделять на пять групп [255]. В первую группу входят декстраны. Это гомополисахариды, так как состоят из одного моносахара. Особенностью синтеза ЭПС является присутствие в среде сахарозы как специфического субстрата. На средах с другими сахарами не происходит синтеза. Представителями бактерий-продуцентов в этой группе являются роды *Leuconostoc* и *Streptococcus* [125].

Ко второй группе относят гетерополисахариды, образование которых возможно на средах с определенным углеродным субстратом [140]. Бактерии-продуценты в этой группе – псевдомонады.

В третью группу входят гомополисахариды, синтез которых осуществляется на различных углеродных субстратах. В структуру этих ПС могут входить как углеводные остатки, так и ацетильные группы. Примером полисахаридов, содержащих только углеводные остатки, является курдлан (продуценты *Agrobacterium radiobacter* и *Alcaligenes faecalis*). К полисахаридам, содержащим в составе ацетильные группы, относят ЭПС, синтезированные некоторыми видами *Agrobacterium* [155, 180, 205, 220].

Самой большой группой микробных полисахаридов является четвертая. В нее входят гетерополисахариды, построенные из повторяющихся звеньев. Это гелан, эмульсан, ксантан [173, 205, 215].

В пятую группу микробных полисахаридов входят гетерополисахариды, которые состоят из D-маннуроновой и L-гулууроновой кислот. Особенностью таких полисахаридов является то, что в их структуре нет повторяющихся звеньев. Примером полисахаридов этой группы является бактериальный альгинат, продуценты которого – *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Paenibacillus ehimensis* [54, 61, 101, 144, 164, 169].

По химической природе ЭПС подразделяют на нейтральные и кислые. У нейтральных полисахаридов в состав входят только спиртовые и карбонильные группы и аminosахара, в которых также присутствуют карбонильные, спиртовые, аминогруппы. Присутствие аминогруппы определяет основные свойства этих соединений. Кислые в своем составе содержат карбоксильные группы.

ПС, входящие в состав бактериальной капсулы и слизи межклеточного пространства (капсульные полисахариды, экзогликаны, или экзополисахариды), принадлежат к одной группе бактериальных антигенов, которая получила название «К-антигены». Результаты изучения их структуры и свойств описаны во множестве работ, большая часть которых

приходится на 80-е годы двадцатого века [67]. В капсулах гидратированные ПС могут быть в полутвердом состоянии [285].

Полисахаридам свойственна первичная, вторичная, третичная и четвертичная структура. Первичная структура полисахаридов – это природа, расстановка в структуре со связями мономеров. Она бывает линейной или в разной степени разветвленной. Линейные цепи характерны для таких гликанов как хитин, целлюлоза, а также структурных животных гликанов в тканях, выполняющих вспомогательную функцию (гликозаминогликаны). Разветвленные цепи встречаются у запасных гликанов (амилопектин, декстран, гликоген) и гликанов, выполняющих вспомогательную структурную функцию в тканях у растений (гемицеллюлоза, пектин) [149, 282].

Вторичная структура – ориентация цепей полимера в пространстве с учетом ковалентных связей между мономерными единицами, валентных углов гликозидных связей. Ленточные структуры встречаются у целлюлозы и хитина. Их образование обосновано двумя причинами. Эти полимеры дают жесткие линейные цепи, жесткость которых объясняется расположением ОН-групп  $\beta$ -D-глюкозы и многочисленными водородными связями вдоль цепи. Подвижность всей цепи полисахарида определяется соотношением гибких и жестких участков в нем [230, 257]. Спиральные структуры образуются следующими гликанами:  $\alpha$ -амилоза, гиалуроновая кислота, агароза, карагинан.

Третичная структура – это пространственная укладка спиралей полисахаридов или расположение полимерных цепей в пространстве. Можно выделить несколько распространенных третичных структур гликанов. Жесткие волокна формируются у целлюлозы и хитина из свернутых двухцепочечных лент. Гибкие волокна в клеточных стенках некоторых водорослей образованы из правых тройных спиралей D-ксилана, со стабилизацией также за счет межцепочечных водородных связей. Сложноразветвленные компактные структуры глобулярной формы образуют запасные полисахариды, такие, как амилопектин, гликоген,

декстраны. Сложноразветвленные рыхлые неупорядоченные структуры характерны для вспомогательных структурных гликанов растений, таких, как гемицеллюлозы и протопектины. Пространственно-сетчатые рыхлые структуры, нити которых состоят из множества спиралей, присущи гельобразующим кислым полисахаридам, таким, как агар-агар, карагинан, альгин, растворимые пектины, камеди. Пространственно-неупорядоченные подвижные структуры характерны для гиалуроновой кислоты.

Четвертичная структура – следующий этап пространственной организации полисахаридов, который характеризуется образованием агрегатов посредством взаимодействия полисахарида между собой с третичной структурой гликана.

Первостепенная функция ПС – защитная, но помимо нее эти полимеры выполняют ряд других немаловажных функций: энергетическая, механическая, транспортная, модифицирующая и др. Поэтому была создана классификация микробных ПС, отражающая выполняемые ими функции в клетке.

Первая группа – это клеточные ПС, которые по функционально-топологическим признакам делятся на структурные и структурно-метаболические (присутствуют в клеточной стенке) и резервные.

Ко второй группе относят внеклеточные ПС, в том числе и структурно-метаболические ПС [32, 211].

Структурные полисахариды формируют срединную пластинку, первичную и вторичные стенки, различающиеся функциональным назначением, строением и составом. Они генетически детерминированы. Структурные полисахариды определяют антигенные особенности вида бактерий [118]. В результате производства большого количества структурно-метаболических полисахаридов образуется капсула и гликаны, которые могут выходить в культуральную жидкость. Такие полисахариды называют внеклеточными (ВПС) [253].

Полисахариды наружной мембраны, а также капсульные полисахариды обуславливают серологическую специфичность бактерий. По причине нахождения на поверхности клетки таких гликанов, они вступают в реакции с иммунными клетками организма человека и животных. Полисахариды, находящиеся в наружной мембране, обладают достаточной резистентностью, поэтому они устойчивы к фагоцитозу и расщеплению ферментами. Посредством молекулярно-биологических исследований установлено, что гликаны, локализующиеся в наружной мембране клеток бактерий, принимают участие в таких процессах как клеточное узнавание. Этим полисахаридам присущи уникальные иммунохимические и фармакологические свойства, они – рецепторы бактериофагов. Помимо своей основной запасной функции, которые выполняют внутриклеточные полисахариды (такие как гликоген), они участвуют в механизмах, регулирующих деление и рост клеток [21, 42].

У непатогенных бактерий распространено капсулообразование как видовой признак. Это говорит о наличии у капсульных полисахаридов многочисленных функций. Капсула таких микроорганизмов предохраняет клетки бактерий-продуцентов от воздействия антибиотиков, которые продуцируются конкурентными штаммами. Таким образом, капсулообразование как признак, обеспечивает выбор потребления разнообразных веществ из среды обитания и удаление за пределы бактериальной клетки ненужных продуктов метаболизма [16].

Т.П. Пирог с соавт. [73] выявлена защитная роль собственных ЭПС для бактерий *Acinetobacter* sp., проявляющаяся в устойчивости клеток культуры к действию высоких и низких значений рН, высушиванию, повышению температуры, замораживанию, к воздействию биоцидов и детергентов.

Авторами [122, 131, 203] было показано, что ЭПС психрофильных бактерий *Colwellia psychrerythraea* 34H, *Pseudomonas* sp. ID1, *Phormidesmis priestleyi* обладают хорошими криопротекторными свойствами при температурах от -20 °С до -80 °С как для самих штаммов-продуцентов, так и для других бактерий, таких как *Escherichia coli*. Кроме того, ЭПС

*C. psychrerythraea* 34Н проявляет осмопротекторные свойства, что помогает в сохранении микробного сообщества в морских льдах. Структурные особенности уникального ЭПС *C. psychrerythraea* 34Н напоминают присутствующие в антифризе белки и гликопротеины, он состоит из тетрасахаридного повторяющегося блока, содержащего две аминокислоты и две уроновые кислоты, треонин в качестве заместителя одной из них [123].

Питательная функция – одна из важнейших у ЭПС. Так, некоторые бактерии потребляют и собственные, и находящиеся в окружающей среде полисахариды других бактерий, грибов [57].

Экзополисахариды бактерий относятся к вторичным метаболитам, они являются продуктами метаболизма, которые образуются впоследствии действия первичных метаболитов-ферментов. Следовательно, условия для выращивания бактерий-продуцентов этих веществ оказывает прямое влияние на количество выделяемого полимера и его свойства [164].

Эффективным способом сохранения экзополисахаридов является лиофильная сушка. При этом не теряются свойства биополимеров и их биологическая активность. Высушивание при высоких температурах приводит к тому, что полимеры становятся гигроскопичны, теряют многие свои свойства: плохо расщепляются ферментами, не растворяются в воде, утрачивают биологическую активность. Лиофильно высушенные препараты ЭПС хорошо растворимы в воде, а такие растворители как спирты переводят их из растворенного состояния в осадок [33].

Вязкость растворов ЭПС – важная реологическая характеристика. Показатель вязкости – это признак, который зависит от природы продуцента, химического состава, структуры молекулы ЭПС и внешних факторов, при которых был синтезирован биополимер (рН, аэрация, концентрации веществ, температуры, давления и др.) [22].

Экзогликаны являются активными соединениями, это подтверждено физико-химическими и иммунохимическими экспериментами. Они легко вступают во взаимодействие с различными соединениями, особенно если у таковых имеются участки в структуре, с которыми связывается ЭПС

водородными и ионными связями, а также путем гидрофобного взаимодействия. Следует отметить, что заряд молекул ЭПС достаточно небольшой, поэтому взаимодействие с другими веществами, приводящие к образованию комплекса, может происходить путем создания различных химических связей (водородных, ковалентных, Ван-дер-Ваальса) [21].

Экзополисахариды бактерий активизируют защитные силы организма, повышая его устойчивость к вирусным и бактериальным инфекциям [34, 165, 168, 171]. Биологически активные ПС, как правило, разветвленные или  $\beta$ -линейные 1,3-D-глюканы, гетероглюканы или комплексы  $\beta$ -D-глюкана с белками [104]. Эти глюканы – полифункциональные вещества и присутствуют в клеточных стенках многих растений [188], грибов и водорослей [49, 104, 235, 278], продуцируются бактериями в виде экзополисахаридов [110, 240]. Биологическая активность  $\beta$ -D-глюканов заключается в основном в иммуностимулирующих свойствах, но эти ЭПС проявляют ряд других биологических свойств. Способность экзополисахаридов к связыванию свободных радикалов определяет их радиопротекторное действие, а появление фактора, регрессирующего опухоль в ответ на введение биополимера – противоопухолевое действие. Противовоспалительное действие обусловлено возникновением в сыворотке крови фактора, активизирующего продукцию транспортных белков острой фазы [8].

Исследованием противоопухолевых, радиозащитных и иммуномодулирующих свойств  $\beta$ -маннанов и  $\beta$ -глюканов из дрожжей занимается школа Н.П. Елинова [1, 32, 99]. Много известно о зимозане – биополимере, выделенного из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [6]. Зимозан – биополимер оболочки этих дрожжей, в составе которого большую часть занимают полисахариды. Установлено, что биологическая активность зимозана обусловлена наличием глюканов в его структуре. Зимозан способен повышать противоопухолевую и антиинфекционную резистентность организма. Это определяется индукцией гиперреактивности мононуклеарной фагоцитирующей системы (МФС). Зимозан стимулирует



МФС у животных и человека. Зимозан активизирует образование Т- и (в меньшей степени) В-лимфоцитов. Зимозан применяют в лечении онкологии, так как этот биополимер обладает комплексным воздействием на организм. Зимозан стимулирует лейкопоз, увеличивает активность макрофагов и лейкоцитов, способствует увеличению числа и активности лимфоцитов, увеличивает канцеролитическую и комплементарную активность сыворотки крови, повышает уровень пропердина. В то же время зимозан способен угнетать рост индуцированных и трансплантированных опухолей, подавлять процесс метастазирования, усиливать эффективность и ослаблять токсичность цитостатических антибластомных препаратов, тем самым увеличивть продолжительность жизни человека [8].

В медицине успешно нашли применение полисахариды микроорганизмов такие как сальмозан, пирогенал и продигиозан [10, 15, 26, 46, 56, 63, 82, 89, 90, 98, 103].

$\beta$ -1,3-D-глюканами активизируют неспецифическую резистентность организма, поэтому эти препараты используются как в профилактических целях, так и в качестве вспомогательных лекарственных средств при различных заболеваниях, сопровождающихся общим снижением иммунитета [104]. Структура и состав глюкана определяют воздействие на те или иные составляющие иммунной системы и на степень ее активации. Особенно важна конформация молекулы такого полисахарида при взаимодействии с элементами иммунной системы. Тип и конфигурация связей между остатками сахаров, молекулярная массы полисахаридов, степень разветвленности боковых цепей, растворимость в воде при этом также играют немаловажную роль [8, 32, 133, 148, 191].

К примеру, курдлан является линейным 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканом и стимулирует цитотоксичность полиморфноядерных лейкоцитов *in vitro*. В то же время лентинан и шизофиллан, являющиеся 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ -D-глюканами, но, имеющие наряду с  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3 связями  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6 связанные остатки глюкозы в виде боковых цепей, не обладают таким действием. Биологическая активность  $\beta$ -D-гликанов также связана с оптимальным содержанием (около

30 %)  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-связанных остатков глюкозы в молекулах  $\beta$ -D-глюканов. Наличие  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-связей определяет пространственную структуру  $\beta$ -D-глюканов, от которой зависит проявление биологического действия полисахаридов [8].

Неспецифическая резистентность организма осуществляется комплексом клеточных и гуморальных факторов, взаимодействующими для достижения конечного эффекта – катаболизма чужеродной субстанции. Исследователями обнаружено свойство некоторых микробных ПС оказывать влияние на иммунную систему организма. Они запускают многоступенчатую защитную реакцию в организме, увеличивая сопротивляемость [26, 34, 159, 165, 170, 177].

$\beta$ -1,3-О-глюканы активизируют иммунную систему гуморальными и клеточными факторами. При воздействии на гуморальные факторы иммунитета повышается уровень интерлейкинов 1 и 2, иммуноглобулинов (IgM и IgG), активатора плазминогена, интерферона,  $H_2O_2$ , колониестимулирующего фактора, опсонинов, фактора некроза опухоли, белков плазмы, включая белки острой фазы (комплемента С3, гомопексина, церулоплазмина, и т.д.); увеличивается включение глюкозамина (до 10 раз), происходит ингибирование простагландинов и иммуносупрессивных веществ, возрастает потребление глюкозы клетками.

Под влиянием глюканов на клеточные факторы иммунитета происходит усиление фагоцитоза, увеличение числа антителообразующих клеток, рост цитотоксичности макрофагов, пролиферация, ингибирование миграции макрофагов, реакция гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ), активация Т-киллеров, Т-хелперов и нормальных киллеров (NK), эффект кооперации Т- и В-лимфоцитов, реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), увеличение лимфоузлов и других кроветворных органов, стимуляция экзо- или эндогенного колониобразования в селезенке или костном мозге, образование лимфоцитами розеток с эритроцитами барана, митостатическое действие, увеличение числа выживших животных в эксперименте [8]. Экзополисахариды молочнокислых бактерий обладают

также антионкологическими, противовирусными и иммуномодулирующими и пробиотическими свойствами [77, 78, 79, 80, 106, 128, 141, 145, 184, 231, 260].

Антиканцерогенными свойствами обладают экзополисахариды *B.bifidum* YIT 4007, *B.breve* YIT4014, *L.lactis* ssp. *cremoris* KVS 20, *B.breve* 4043 и [184, 216]. Некоторые ЭПС молочнокислых бактерий способны понижать уровень холестерина в крови [216, 218, 225, 226].

Экзополисахариды, синтезируемые некоторыми молочнокислыми бактериями, оказывают стимулирующее действие на иммунную систему животных [168, 194, 217, 269]. ЭПС, выделяемые молочнокислыми бактериями, активизируют иммунный ответ организма, индуцируя цитокины, при этом происходит активизация лимфоцитов и макрофагов [135, 168, 176, 200].

Известны бактерии, ЭПС которых обладают иммуномодулирующими свойствами: *Paenibacillus jamilae* CP-7 [236], *Bacillus* spp. [160], *Bacillus licheniformis* [110], *Bacillus amyloliquefaciens* sp. [129] *Geobacillus thermodenitrificans* [111]. ЭПС *P. jamilae* CP-7 способен активизировать пролиферацию спленоцитов *in vitro* и синтез цитокинов. Было показано, что данный ЭПС приводил к подавлению пролиферативных и цитокиновых ответов при его воздействии на Т- и В-клетки, которые были стимулированы общепринятыми митогенами [236]. Имеются сведения о том, что лечение ЭПС *G.thermodenitrificans* нарушает репликацию вируса простого герпеса 2 типа в мононуклеарах периферической крови человека (ПБМК) [106].

Показано, что для ЭПС грибов рода *Tremella* [138], *Ganoderma lucidium* [276] характерно антивирусное действие.

Имеются сведения, что ЭПС бактерий рода *Bacillus* оказывают противоопухолевое и антивирусное действие [72, 105, 129], кроме того, эти биополимеры способствуют защите от стафилококковой инфекции и усиливают действие лекарственных препаратов [4], при этом неспецифическая реактивность организма увеличивается.

*Pseudomonas* sp. WAK1 продуцирует сульфатированный полисахарид [204]. Этот полимер проявляет цитотоксическое действие на раковые клетки человека линии МТ-4. ЭПС *P. stutzeri* 273 обладает антиоксидантной активностью [281].

*Flavobacterium uliginosus* МР-55 продуцируют водорастворимый полисахарид маринактан, состоящий из глюкозы, маннозы и фукозы с молекулярной массой выше, чем  $1 \cdot 10^6$  Да. Было показано, что маринактан обладает противоопухолевыми свойствами против саркомы 180 [267].

Экзополисахариды, продуцируемые бактериями *P. polymyxa* JB115, рекомендованы в качестве пищевой добавки для животных для активизации иммунитета [139, 171].

Микробные полисахариды – активные стимуляторы антителогенеза. Механизм их адьювантного действия обуславливается общим комплексом реакций, возникающих в организме при парентеральном введении ПС: стимуляцией синтеза иммуноглобулинов, усиленной пролиферацией иммунокомпетентных клеток, изменениями проницаемости сосудов и т.д. [34].

Было показано, что ЭПС некоторых штаммов *B. thermoacidophilum* имеют сильную пролиферативную активность относительно спленоцитов и ИФ- $\gamma$ . Отмечено стимулирование ими секреции ИЛ-10.

G. Vinderola и сотр. [274] было выявлено, что ЭПС *Lactobacillus kefiranofaciens* индуцируют синтез цитокинов макрофагами. При этом в сыворотке крови и кишечной жидкости изменялись концентрации цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12). Значение концентрации ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12 превышало значения в контроле, а концентрация ФНО- $\alpha$  и ИФ- $\gamma$  оставались равными контрольным значениям. В кишечнике увеличивалась концентрация ИЛ-12 и ИЛ-4. Определено, что ЭПС, индуцированные молочнокислыми бактериями, находящимися в кишечнике, влияют на защитный иммунитет, обладают способностью поддерживать равновесие кишечной микрофлоры и оказывают влияние на иммунитет, воздействуя на цитокины, повышая их концентрацию в крови.

Сообщалось, что ЭПС *L.rhamnosus* RW-9595M стимулируют иммунитет, оказывая влияние на спленоциты лабораторных мышей. Это действие обусловлено активизацией синтеза макрофагами ИЛ-12, ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ , ИФ- $\gamma$  [127].

В работах Н. Kitazawa и Ciszek-Lenda и сотр. [126, 177, 178] описано, что ЭПС молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KVS 20 и *L.rhamnosus* KL37 обладают способностью к стимуляции макрофагов, что приводит к индукции цитокинов и регуляции их синтеза.

В литературе имеются сведения о том, что степень очистки ЭПС влияет на иммуномодулирующий эффект, оказываемый при введении экзополисахаридов. Так, был получен ЭПС *L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 1073 R-1 [231], состоящий из кислой и нейтральной фракций. Интересно, что ЭПС кислой природы увеличивали митогенные ответы спленоцитов у мышей. Выявлено понижение митогенной активности у лимфоцитов при введении дефосфорилированных ЭПС. Этот эффект объясняется потерей свойства ЭПС стимулировать пролиферацию клеток крови в силу особенностей выделения полигликана.

### **1.3. Значение экзополисахаридов микроорганизмов в народном хозяйстве**

Микробные ПС имеют большое промышленное значение [12, 31, 43, 64, 92, 117, 152, 157, 180, 238]. Эти биополимеры часто используются в нефтяной промышленности (улучшение производительности нефтедобычи, переработка и обогащение руд) [241], пищевом производстве (биопленки, загустители, эмульгаторы) [132, 182, 183, 190], медицине (пролонгатор действия, заменитель плазмы крови, составляющие медицинских препаратов) [270, 284], сельском хозяйстве (удобрения почв и увеличение урожайности культур), природопользовании как биодегранты для очищения загрязненных нефтяными отходами почв, косметике (эмульсии). Области применения микробных ПС постоянно расширяются по мере изучения новых полисахаридов и их продуцентов [19].

В различных отраслях требуются полисахариды с определенными свойствами. Широкий спектр продуцентов биополимеров и разнообразие их свойств делают эти вещества востребованными. Поэтому в мире продолжается поиск микроорганизмов-продуцентов ЭПС и исследование их свойств с дальнейшим применением. Микробные внеклеточные ЭПС обладают разнообразными физико-химическими свойствами, что позволяет применять их в различных отраслях человеческой деятельности. Формы их применения также разнообразны: волокно, высоковязкие растворы, гранулы, пленка, порошок.

Основными продуцентами полисахаридов среди микроорганизмов являются: дрожжи и нитчатые грибы, ксантомонады, псевдомонады, молочнокислые, уксуснокислые бактерии и др. [23, 32].

Преимуществом микробных полисахаридов является и то, что их производство и качество не зависят от условий природы. Из этого следует, что производство микробных полисахаридов является перспективным и экономически выгодным процессом по сравнению с производством растительных и синтетических полимеров [25, 185]. В России находятся множество месторождений с трудноизвлекаемыми запасами нефти. Поэтому важным и перспективным является внедрение экзополисахаридов, облегчающих нефтедобычу [47]. Бактериальные полисахариды обладают уникальными свойствами: способностью загущать водные растворы, даже с высокой концентрацией солей, обеспечивая им нужные реологические свойства, стабилизировать суспензии [2], образовывать гели при взаимодействии с глюко- и галактоманнанами и ионами металлов [220]. Бактериальные полисахариды совместимы с другими полисахаридами и низкомолекулярными соединениями [25, 33].

Ниже приведены некоторые из известных в мире микробных полисахаридов.

Альгинат (продуценты *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Raenibacillus ehimensis* 739) обладает способностью образовывать прочные коллоидные растворы, которые отличаются кислотоустойчивостью. Раство-

ры этих ПС не коагулируются при нагревании, не меняют свойств при охлаждении, замораживании и последующей разморозке. Альгинат способен поглощать трехсоткратное количество воды и образовывать, лишенные цвета, вкуса и запаха, вязкие стабильные гели [54, 100, 101, 107, 108, 144, 172, 175, 246, 248, 258].

Бактериальная целлюлоза обладает рядом преимуществ по сравнению с ее растительным аналогом. Этот гликополимер способны синтезировать представители родов *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Salmonella* и *Mycoderma*. Но классическим производителем этого материала считается бактерия *Gluconoacetobacter xylinum*. Материал, полученный в результате синтеза, отличается повышенной эластичностью и отсутствием примесей лигнина и гемицеллюлоз, которые, как правило, присутствуют после очистки растительной целлюлозы. Бактериальная целлюлоза образует прочную гелевую пленку с определенной структурой из кристаллических микрофибрилл. Это позволяет удерживать недоступное для растительной целлюлозы количество воды. Если в ходе биосинтеза добавить желатин, то образуется плотная и однородная пленка с улучшенной оптической прозрачностью и повышенной гигроскопичностью [180, 260]. Бактериальную целлюлозу используют в медицине для производства искусственной кожи. Этот биополимер обладает уникальными свойствами: играет активную роль в активации регенеративных процессов, помогая восстановлению базальной мембраны, ускоряя при этом эпителизацию и рубцевание ран [268]. В текстильной промышленности бактериальную целлюлозу рассматривают как материал для создания новых тканей.

Велан, продуцентами которого являются бактерии рода *Alcaligenes*, находит применение в нефтяной промышленности для добычи нефти и природного газа. С этиленгликолем велан образует соединения, которые применяются в изготовлении материалов, использующихся для теплоизоляции [119].

Геллан (продуцент *Sphingomonas paucimobilis* (*Pseudomonas paucimobilis*)) способен к образованию гелей, вступая в реакцию с водой. Это свойство определяется содержанием О-ацетильных групп в молекуле геллана [260]. Эти гели находят применение в качестве дополнительного материала при перевозке лекарственных веществ, используемых для лечения глаз [13, 113, 124, 172, 205, 207].

Геллановая камедь способна формировать гели с различными ионами. С ионами марганца и калия образует прочные студни. Геллановые гели устойчивы к перепадам температуры и разложению ферментами, устойчивы к изменению рН (3,5 – 8,0) [279]. Геллановую камедь используют для приготовления молочных десертов, джемов [58, 118].

Декстран продуцируется бактериями *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptobacterium dextranicum* В-1254. Он обладает низкой вязкостью в растворе, вследствие чего находит применение в медицине [125, 231, 245].

Декстран, продуцируемый *L.mesenteroides* NRRL В-512, в концентрации 6% близок по своим осмотическим и реологическим свойствам к плазме крови человека [270]. На основе декстрана изготавливают множество препаратов, применяемых в медицине (полиглюкин, полиглюсолевый полифер, реополиглюкин, реомакродекс, реоглюман, промит). Полиглюкин представляет собой 6% раствор декстрана с молекулярной массой  $6 \cdot 10^4$  Да. Этот препарат не проникает через мембраны сосудов, поэтому может присутствовать в крови 3-4 суток. Полиглюкин способен восстанавливать и поддерживать артериальное давление, объем циркулирующей крови, улучшать сердечную деятельность. На основе декстрана и эпихлоргидрина образуется высокомолекулярный комплекс нерастворимый в воде. Этот препарат назван искусственной кожей и способствует быстрому заживлению ран [195]. Показано, что другие ЭПС бактериального происхождения, такие как (1→3)-β-D-глюкан [189] и (1→3)-β-D-маннан [182] стимулирует заживление ран.

Полисахариды молочнокислых бактерий *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* проявляют противомутагенную актив-



ность. Поэтому эти ЭПС применяются на химических производствах, атомных станциях и других объектах, где возможно возникновение мутаций [263].

Дипсан, продуцируемый *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* HYD 657 [121, 187], используется в косметике, благодаря его защитному действию на кератиноциты кожи.

Занфло (продуцент *Erwinia tahitica*) сходен по своим свойствам с ксантаном, то есть его растворы не реагирует на повышение температуры. Этот полисахарид устойчив к действию ферментов. Занфло обладает хорошей текучестью и ровно наносится на поверхность. Эти свойства позволяют применять данный полисахарид для разметки дорог, в лакокрасочной промышленности [261].

Крилан (продуцент *Cryptococcus laurentii* 1803 – К) – стабилизатор дисперсных систем в косметической, пищевой, фармацевтической промышленности [96].

Ксантан (ксантановая камедь) – продуценты рода *Xanthomonas*: *X.campestris*, *X.phaseoli*, *X.malvacearum*, *X.carotae* [64, 161, 215, 233, 272]. Ксантан способен к образованию вязких растворов даже в очень низких концентрациях. Растворы ксантана псевдопластичны, при изменении температуры и рН не меняют реологических свойств [58, 115, 230]. Биополимеры, входящие в группу ксантановых ЭПС, достаточно изучены, определены их физико-химические свойства, структура и модель биосинтеза [22, 115, 147, 206, 209, 210, 213, 234, 251, 255, 262, 265].

Ксантан широко используется в пищевой промышленности. Этот биополимер применяют для замораживания и оттаивания продуктов. Было замечено, что обработка продуктов растворами ксантана предохраняет их от образования льда.

Этот гликополимер применяется в составе аэрозолей, которые являются носителями гербицидов, химикалий, инсектицидов. Ксантан обеспечивает прикрепление к объектам обработки и помогает в регулировании скорости диффузии [22, 64, 173, 264].

На основе ксантановой камеди создают saniрующие гелеобразные препараты. Таким образом, происходит стабилизация хлорной добавки и улучшаются моющие свойства. Этот биополимер используют и в фармацевтической промышленности, поскольку он совместим с электролитами (бурой, дубильной кислотой, хлоридами, цитратами) и сахарами. Ксантан используется в медицине как иммуноадьювант. В косметологии ксантан входит в состав зубных паст, обеспечивая их однородность и стабильность. В пищевой промышленности добавление ксантана улучшает качество муки [88]. У ксантана повышается желирующая способность путем комплексования с ионами трехвалентных металлов ( $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ). Такие комплексы находят применение в качестве флокулянтов при очистке воды, а также бумажной и текстильной промышленности в составе клея, при производстве некапающих красок [22, 64, 69, 173, 233, 268, 272]. Помимо того, ксантан применяется также при химическом синтезе каучука [173]. Этот экзогликан стабилизирует, улучшает текучесть синтетических водорастворимых и эмульсионных красок в лакокрасочной промышленности. Обладая термостабильностью, ксантан входит в состав силикатных покрытий, огнеупорных керамических глазурей. В сельском хозяйстве этот биополимер используется как суспендирующий агент в жидких кормовых добавках в животноводстве и растениеводстве, и кроме того, как стабилизатор при производстве искусственного молока для молодняка [31, 69, 139].

Продукт БП – 92 (коммерческое название ЭПС, относящегося к ксантанам) является экологически безопасным, нетоксичным и применяется на нефтепромыслах России. Относительно других препаратов, такие как полиакриламиды, используемых в нефтедобывающей промышленности, микробные полимеры являются более устойчивы к высоким температурам, сдвиговой деградации. Помимо этого они экологически безопасны, для них разработана упрощенная схема применения. Применение Продукта БП – 92 и других ЭПС в нефтедобывающей промышленности обосновано отсутствием ресурсных ограничений, низкой стоимостью, технологической эффективностью [12].

Ксантомонан (продуцент *X.campestris* 610/1) [85] в количестве 0,45 % к массе муки улучшает ее качество. Кроме того, экспериментально было показано, что ксантомонан 610/1 можно использовать и для изготовления пищевых пленочных покрытий [86].

Курдлан (продуценты – бактерии родов *Rhizobium*, *Agrobacterium* и *Alcaligenes faecalis* var. *typhogenes*) [162, 199, 260]. Этот полисахарид хорошо растворим в холодной воде, а при температуре выше 64 °С переходит в упругий гель. Повышение температуры приводит к гелеобразованию. Гель сохраняет стабильность от 60 °С до 80 °С. Прочность геля при увеличении температуры свыше 120 °С возрастает, при этом в структуре полисахарида одиночная спираль переходит в тройную. В жидкое состояние этот гель переходит в щелочной среде [260]. В Японии курдлан используется в пищевой промышленности как влагоудерживающий агент в продуктах питания (колбасы, крахмальные желе); связующего агента в желе и макаронных изделиях; желирующего агента в десертах [2]. Курдлан находит применение в биотехнологии при образовании волокон, пленок и носителей для иммобилизации клеток и ферментов. Противоопухолевая активность курдлана позволяет применять его в медицине [239, 244].

Лаксараны (продуценты *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* В-1596, *L. delbrueckii* В-1936, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) способны к стимуляции роста некоторых молочнокислых бактерий и подавлению роста энтеропатогенной кишечной палочки и стафилококков в толстом кишечнике, к регуляции активности факторов естественной резистентности, под их действием происходит быстрое заживление ран [76, 77, 78, 79].

Леваны (продуценты *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Aerobacter*, *Arthrobacter* *Halomonas* sp. Аад6 (JCM 15723)) относятся к нейтральным разветвленным полисахаридам. Леван в концентрации 6% образует пастообразный гель [25]. Этот полисахарид вносится в почву для повышения урожайности и улучшения хранения семян. Леван используют в пищевой промышленности в качестве фиксатора цвета, стабилизатора и загустителя [94].

Экзополисахарид, выделяемый *Halomonas eurihalina*, обладает хорошими эмульгирующими свойствами и поэтому нашел применение в качестве биоремедиатора загрязняющих веществ [202].

Пирогенал (продуцент *Pseudomonas aeruginosa*) [10, 46, 56, 70, 98, 103] оказывает иммуномодулирующее и пирогенное действие на организм. Влияние пирогенала на иммунную систему малоизучено. Пирогенал вызывает повышение температуры тела, увеличивается проницаемость тканей, наблюдаются лейкопения, сменяющаяся лейкоцитозом, при этом происходит подавление роста рубцовой ткани, происходит стимуляция восстановительных процессов в нервной ткани. Препарат улучшает проницаемость химиотерапевтических веществ в очаг поражения. Пирогенал применяют для стимулирования восстановительных процессов после заболеваний и повреждений нервной системы; для рассасывания рубцов, травм, спаек после ожогов, в комплексном лечении инфекционных заболеваний, при некоторых аллергических заболеваниях.

Полимиксан 1459–В и полимиксан 88А (продуцент *Paenibacillus polymyxa*). Эти биополимеры характеризуются высокой удельной вязкостью, устойчивостью к биодegradации и термостабильностью [14, 60]. При нанесении пищевых пленок с полимиксаном 88А на хлебобулочные изделия происходит сохранение свежести длительное время [14]. Полимиксан используется в качестве студневой основы для кондитерских изделий [69].

Продигиозан (продуцент *Bacterium prodigiosum*) [28, 34] стимулирует ретикулоэндотелиальную систему и фагоцитарную активность лейкоцитов, активизирует систему гипофиз-кора надпочечников, повышает содержание гамма-глобулинов в крови и активность опсонинов, способствует образованию интерферона. Действие продигиозана обусловлено тем, что он стимулирует иммунную систему организма, активируя образование интерферона. Продигиозан улучшает регенеративные процессы в организме, снижая при этом экссудативный компонент воспалительной реакции, приводя в норму проницаемость и тонус кровеносных сосудов в центре воспаления. Данный

препарат находит применение в медицине в качестве стимулятора при хронических воспалительных процессах, в антибиотикотерапии, для лечения дерматозов, ожогов, пародонтоза, труднозаживающих ран и язв. Продигиозан назначают пациентам при лечении противоопухолевыми препаратами, при лучевой терапии. Этот препарат активен при лечении лучевой болезни и лейкозов. Продигиозан применяют для стимуляции защитных сил организма при простудных заболеваниях в раннем детском возрасте. Доказана эффективность этого препарата в форме аэрозолей при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний органов дыхания.

Сараксан (продуцент *X.campestris* NRRL – В 1459) применяют в строительстве, нефтегазовой отрасли, химической промышленности для производства моющих и чистящих средств. В сельском хозяйстве сараксан обеспечивает экономию удобрений и повышение урожайности культур [65, 71].

Сальмозан продуцируется бактериями рода *Salmonella* [16, 89, 90]. Этот препарат выполняет роль иммуномодулятора в организме. Сальмозан увеличивает неспецифическую резистентность организма к инфекциям, способствует активизации макрофагов, стимулирует гуморальный и клеточный иммунитет. Применяют сальмозан в ветеринарии для лечения инфекционных заболеваний животных совместно с антибиотиками, что позволяет значительно повысить терапевтическую эффективность последних.

Симусан (продуцент *Acinetobacter* sp. (штамм 12)) используют в пищевой промышленности как биоэмульгатор. Это обусловлено тем, что этот полисахарид имеет в своем составе жирные кислоты, что придает ему поверхностно-активные свойства [2, 3, 25].

Этаполан (продуцент *Acinetobacter* sp. В-7005) обладает способностью поглощать воду в большом количестве [226], что представляет интерес для нефтедобывающей промышленности [75].

*Polaribacter* sp. SM1127 выделяет экзополисахарид, входящий в состав крема для защиты кожи человека от холода, поскольку этот биополимер при 4 °С обладает криопротекторными свойствами для дермальных фибробластов [252].

Экзополисахарид морской бактерии *Vibrio alginolyticus* выпускается в промышленных масштабах в качестве косметического ингредиента, благодаря своим противовоспалительным свойствам [142].

Авторами [53] предложено использование биополимеров на основе бактериальных ЭПС *Azotobacter*, *Pseudomonas* и *Bacillus* в сельскохозяйственной практике. Совместное использование ЭПС с биопрепаратами фунгицидного действия позволяют пролонгировать действие последних. Подобные результаты были получены при использовании в качестве прилипателей растворов ЭПС *Azotobacter vinelandii* ИБ 1 (Азопол), *Paenibacillus ehimensis* 739 [5,9] для предпосевной обработки семян ячменя и пшеницы биофунгицидами. Подобный положительный эффект может быть обусловлен защитным действием, который оказывает раствор ЭПС, предохраняя от высушивания и гибели бактериальных клеток.

Экзополисахариды бактерий-диссипотрофов малоизучены. Имеются некоторые сведения лишь об ЭПС *Xanthobacter* sp. (АТСС 53272) [223]. По данным авторов ЭПС является кислым, основная цепь которого состоит из галактозы и маннозы в соотношении 3:1. В составе имеются кислые группировки.

Таким образом, как видно из литературного обзора, микробные полисахариды находят применение в промышленности, медицине, сельском хозяйстве и т.д. Современная отечественная промышленность нуждается в новых микробных экзополисахаридах. Поэтому важной задачей остается поиск микроорганизмов-продуцентов этих биополимеров, изучение их физико-химических свойств, подбор условий для максимальной продукции ЭПС, выяснение их биологической активности с дальнейшей перспективой применения.

## 2. Экспериментальная часть

### 2.3. Объекты и методы исследований

#### 2.1.1. Объекты исследований

Объектами исследования явились бактерии *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 и *Ancylobacter abiegnus* Z-0056, предоставленные сотрудниками лаборатории реликтовых микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН<sup>1</sup>. Эти бактерии, получены из мико-бактериального сообщества дистрофных гумифицированных вод северных болот России, являются диссипотрофами, то есть способны к утилизации растворимого органического вещества в низкой концентрации.

В работе использовали бактерии *S. mucilaginosa* Z-0071, полученные из лаборатории реликтовых микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН; тест-штаммы бактерий *Pseudomonas aeruginosa* 27533, *Escherichia coli* 01, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Bacillus cereus* 8035, полученные из музея микроорганизмов кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» и грибы *Candida albicans* 230, полученные из музея культур Саратовского научно-исследовательского ветеринарного института – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии».

#### 2.1.2. Среда, используемые для культивирования бактерий

Для исследования роста клеток и выделения ими ЭПС культуры *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 выращивали на жидких

---

<sup>1</sup> Выражаем глубокую благодарность сотрудникам Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН д.б.н. Л.В. Васильевой и к.б.н. Ю.Ю. Берестовской за предоставление культур бактерий

ультрапресных минеральных средах с сукцинатом (0,1%) в качестве субстрата [41, 134]:

**Среда МС:** на 1 л: 1 мл основы АТСС; 1 г сукцината; 0,1 г дрожжевого экстракта; 1 мкл витаминов, pH 5,5-5,6.

Основа АТСС: модифицированные соли Хартнера ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 29,7 г;  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  – 3,34 г,  $NH_4MoO_4$  – 9,25 г,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 99,0 мг; раствор микроэлементов – 50,0 мл),  $H_2O$  – 1000 мл.

Раствор микроэлементов: ЭДТА – 0,25 г;  $ZnSO_4$  – 1,1 г;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,5 г;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  – 0,15 г;  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 0,04 г;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  – 20,8 г.

Витамины: биотин – 20 мг, фолиевая кислота – 20 мг, тиамин – 25 мг, пантотен – 25 мг,  $B_{12}$  – 1 мг, рибофлавин – 25 мг, никотинамид – 25 мг, п-аминобензойная кислота – 25 мг, бензоатная кислота – 25 мг, пиридоксин – 20 мг, этанол (70%) – 100 мл.

**Среда МСО** имеет тот же состав, что среда МС, но содержит дополнительные источники азота и фосфора: 0,250 г  $NH_4NO_3$  и 0,071 г  $KH_2PO_4$ .

### 2.1.3. Выделение и очистка экзополисахаридов

#### *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056

Выделение ЭПС проводили по общепринятому методу в нашей модификации [125]. Модификация метода состояла в изначальном выпаривании культуральной жидкости (так как она имела большой объем и обладала небольшой вязкостью) и добавлении нескольких циклов пересадки ЭПС с целью очистки биополимера от примесей (белков, нуклеиновых кислот и др.). Для выделения ЭПС культуры *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 выращивали в колбах при встряхивании на «Шейкер-инкубаторе ES-20» (Литва) при температуре 25 °С. Посевным материалом служила культура, выращенная на том же субстрате и отобранная в логарифмической фазе роста. Рост бактерий контролировали по оптической плотности (длина волны – 425 нм). Измерения проводили на спектрофотометре «Cary 100 Scan» (Varian, США). Выделение и очистку экзополисахаридов из культуральной жидкости проводили в соответствии со схемами, представленными на ри-



сунках 3, 4 на 100 часов культивирования на обеих средах. Методы выделения обоих ЭПС состояли из следующих этапов (Рисунок 3, 4). Сначала культуральную жидкость упаривали на роторном испарителе, после чего центрифугировали при 10 000 g и осаждали 3 объемами 96% этанола, оставляли в течение 12 ч при температуре 4 °С. Затем центрифугировали при 2500 g, суспендировали полученный осадок в 96% этаноле, центрифугировали при 2500 g, высушивали на воздухе. После чего растворяли осадок в дистиллированной воде, центрифугировали при 2500 g, осадок повторно растворяли в дистиллированной воде, осаждали 3 объемами этанола, после чего полученный ЭПС растворяли в воде и лиофильно высушивали. Следует отметить, что для выделения ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 бактериальную взвесь после упаривания на роторном испарителе предварительно неоднократно пропускали через шприц с диаметром иглы 0,06 мм. Это связано с тем, что ЭПС данной культуры локализуется вокруг клетки в виде слизи, а клетка окружена многочисленными фимбриями [40], которые и затрудняют выделение биополимера.

Полученные экзополисахариды представляли собой порошки белого цвета, не имеющие запаха, не содержащие белка, нуклеиновых кислот и клеток продуцента. ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 были условно названы нами ксилофилян и анцилан соответственно.

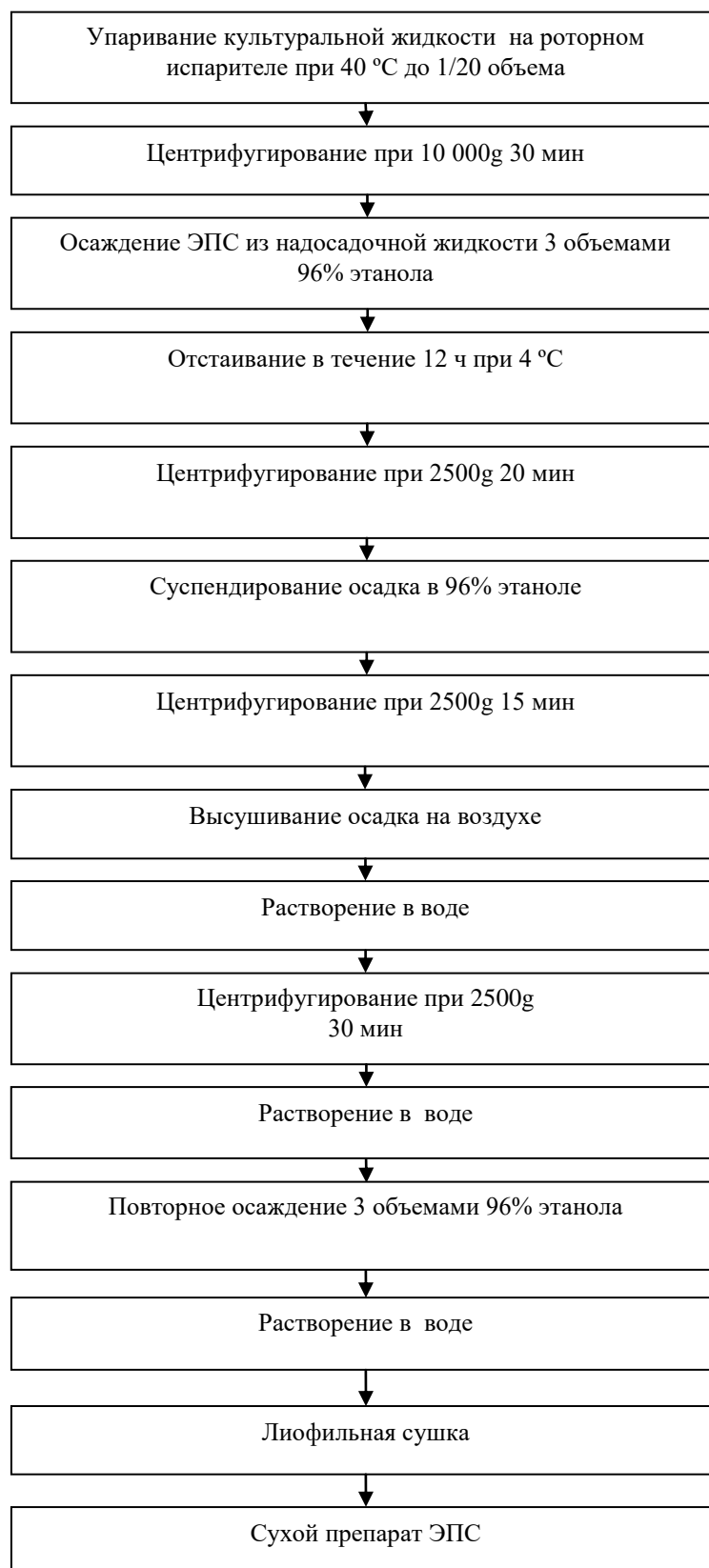


Рисунок 3 – Схема выделения и очистки экзополисахаридов из культуральной жидкости *X.xylophilus* Z-0055

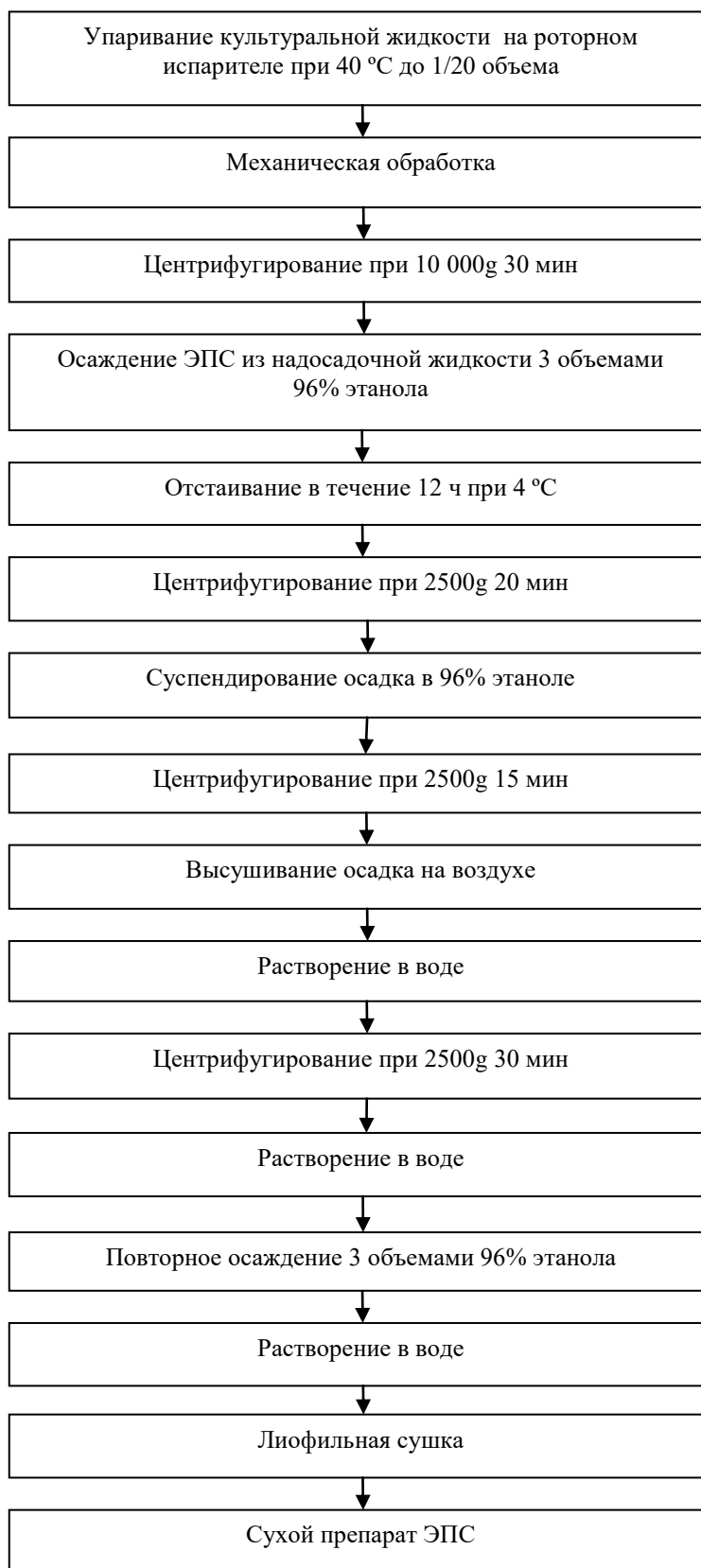


Рисунок 4 – Схема выделения и очистки экзополисахаридов из культуральной жидкости *A.abiegnus* Z-0056

#### **2.1.4. Определение белка**

Для определения белка использовали метод М. Bradford [116]. Количество белка в исследуемых пробах определяли по калибровочному графику, который строили в интервале концентраций от 6,25 до 100,00 мкг/мл альбумина (Albumin from bovine serum, «Merck», Германия).

#### **2.1.5. Определение углеводов**

Общее содержание углеводов определяли фенол-серным методом [143]. Количество углеводов определяли по калибровочному графику, который строили по D-глюкозе в интервале концентраций от 10 до 100 мкг/мл.

#### **2.1.6. Определение нуклеиновых кислот**

Содержание нуклеиновых кислот в экзополисахаридах определяли по поглощению в ультрафиолете при 260 нм на спектрофотометре «Cary 100 Scan» (Varian, США) [68].

#### **2.1.7. Определение моносакхаридного состава экзополисахаридов**

Для разделения полисахаридов на фракции использовали метод ионообменной хроматографии с последующей гель-хроматографией кислой и нейтральной фракций [18, 68]. Образец экзополисахарида (150 мг) растворяли в 2 мл элюирующего раствора и наносили на колонку. Хроматографию проводили на колонке размером 15,0×1,5 см с носителем Toyopearl DEAE 650(M) (Tosoh Bioscience, Япония). Элюирующий раствор – 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6.8). Кислые фракции элюировали NaCl в градиенте концентрации 0 - 1 М. Скорость потока – 1,2 мл/мин. Выходящий из колонки раствор собирали по фракциям и в каждой фракции определяли экзополисахариды фенол-серным методом. Кислую и нейтральную фракции по отдельности наносили на колонку размером 75,0×2,5 см с носителем Toyopearl HW 55(F) (Tosoh Bioscience, Япония), в качестве элюента применяли 2% уксусную кислоту, скорость потока 0,75 мл/мин, детекцию проводили с дифференциальным рефрактометром RIDK 101 (Чехия). Полученные фракции обоих экзополисахаридов упаривали и лиофилизировали.

Гидролиз полисахаридов проводили следующим образом: к навескам по 3 мг кислого и нейтрального полисахаридов в пробирки Eppendorf добавляли по 1 мл 4 М  $C_2F_3O_2H$  и нагревали при 105 °С 1,5 часа для нейтрального и 3 часа для кислого. Гидролизат упаривали на вакуумном центрифужном концентраторе и использовали для анализа.

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинках DC-Alufolien Cellulose (Fluka) или Polygram Cell 300 (Macherey-Nagel) в системе пиридин - этилацетат - уксусная кислота - вода в соотношении 5:5:1:3. Для проявления хроматограмм использовали 1% спиртовой раствор кислого анилин-фталата с последующим нагреванием при 105 °С [18, 68].

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили для анализа нейтральных моносахаридов<sup>2</sup>. Анализ проводили на жидкостном хроматографе Smartline 1000 (Knauer, Германия) с пульсирующим амперометрическим детектором Dekade II (Antec Leiden, Голландия) на колонке CarboPac 10 (Dionex, США) размером 4x250 мм в растворе 0,0125 М NaOH, скорость потока 0,7 мл/мин; чувствительность метода 10-50 нг/мл.

Для проведения газожидкостной хроматографии (ГЖХ) гидролизат нейтрального полисахарида растворяли в 2 мл воды и обрабатывали 2 мг боргидрида натрия в течение 1 часа. Катионы удаляли катионитом Dowex 50x4, раствор упаривали и борную кислоту удаляли упариванием с метанолом. Восстановленные моносахариды переносили в пробирки Eppendorf, добавляли по 0,5 мл пиридина и 0,5 мл уксусного ангидрида и нагревали при 100 °С 1 час. Пробы упаривали на вакуумном концентраторе Scan Speed 32 (Scanvac, Швеция) досуха и затем ещё раз упаривали с толуолом.

Гидролизат кислого полисахарида растворяли в 2 мл воды и добавляли 0,1 мл 0,5 М раствора бикарбоната натрия. Раствор инкубировали 20 мин при 50 °С (для гидролиза глюкуроно-3,6-лактона), после чего его

---

<sup>2</sup> Выражаем глубокую благодарность к.б.н., с.н.с. ФГБУН Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов) Селиванову Н.Ю. за практическую помощь при определении углеводного состава экзополисахаридов

обрабатывали 2 мг боргидрида натрия, обессоливали катионитом и упаривали. Образовавшаяся альдоновая кислота превращалась в лактон путем нагревания при 90 °С 1 час в вакууме. Остаток растворяли в 0,5 мл пиридина и 0,5 мл н-бутиламина и нагревали 30 мин при 60°С. Далее смесь упаривали и затем ацетилювали вышеописанным методом до ацетатов полиолов и бутиламида альдоновой кислоты. Аналогично готовили стандарты нейтральных сахаров и уроновой кислоты [265].

Хроматографию проводили на газожидкостном хроматографе Shimadzu 2010 (Япония), капиллярная колонка Equity - 1 (Supelco, США). Газ-носитель – гелий, скорость потока 1 мл/мин, температура испарителя – 250 °С, интерфейса – 280 °С, градиент температуры термостата – 185 – 280 °С со скоростью 5 °С/мин.

#### **2.1.8. Определение молекулярных масс экзополисахаридов**

Молекулярные массы ЭПС бактерий определяли гель-хроматографией на колонке (7500x250 мм) с Toyopearl HW-55F («Tosoh Bioscience», Япония), используя установку с перистальтическим насосом Bromma 2132 («LKB», Швеция), рефрактометром RIDK 101 и самописцем linerecorder TZ 4620 («Laboratorni pristroje», Чехия). Элюцию осуществляли 2%-ной уксусной кислотой со скоростью потока 1,4 мл/мин. В качестве маркеров молекулярной массы использовали декстраны с молекулярными массами 1,5, 5, 15, 110 и 2000 кДа.

#### **2.1.9. Определение вязкости растворов экзополисахаридов**

Динамическую вязкость 1% растворов ЭПС измеряли при помощи ротационного вискозиметра Viscotester 7R (производства Германии) при температуре 25 °С с ротором R1.

#### **2.1.10. Определение влияния экзополисахаридов на рост микроорганизмов**

Влияние ЭПС на бактерии и грибы изучали методами диффузии в агар и серийных разведений [44, 52]. Для проведения экспериментов брали тест-штаммы бактерий *P.aeruginosa* 27533, *E.coli* 01, *S.aureus* 209-P, *B. cereus* 8035 и гриба *C.albicans* 230 и культуры бактерий тех же мест обитания, что

и изучаемые бактерии (*X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056), *S.mucilaginoso* Z-0071.

### 2.1.11. Определение токсичности экзополисахаридов

Токсичность ЭПС определяли согласно ГОСТ 13496.7 – 97. [24] на инфузориях *C. stenii* и лабораторных мышах. Инфузории и мыши были получены из Пензенской областной ветеринарной лаборатории.

Определение токсичности ЭПС на лабораторных мышах проводили посредством однократного перорального введения в дозировках 0,06 и 3 г на 1 кг массы тела животного<sup>3</sup>. Для исследования были взяты беспородные белые лабораторные мыши, массой тела 22- 25 г, самцы в возрасте 1,5 месяца, которых распределяли в клетки по 5 особей. Лабораторных животных содержали по общепринятым методикам [7]. Перед началом эксперимента выдерживали карантин – 21 день. Животные были разделены на 5 групп по 5 мышей: контрольная, получавшая физиологический раствор (0,85 % NaCl) в объеме 1 мл; опытные получали ксилофилян и анцилан в дозе 0,06 г/кг и 3,00 г/кг в объеме 1 мл.

Физиологический раствор и растворы ЭПС вводили мышам перорально через катетер натошак. За животными проводили наблюдения в течение 3 суток. В течение эксперимента проводили контроль динамики массы мышей. В завершении времени наблюдений у животных контрольной и опытных групп брали кровь из хвостовой вены для общего анализа крови, после чего мышей подвергли эвтаназии с применением эфирного наркоза, осуществляли вскрытие и определение морфометрических характеристик внутренних органов. Кровь собирали в пробирки марки «Impromini» с ЭДТА-К2 и исследовали с помощью автоматического гематологического анализатора «Рерс Vet» [45].

Общий анализ мочи проводили по стандартной методике [48].

---

<sup>3</sup> Выражаем глубокую благодарность к.в.н. ООО Научно-инновационная компания «Викдог» (г. Саратов) Суровцовой И.В. и к.б.н., доц. Сметаниной М.Д. ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» (г. Саратов) за консультации и большую помощь в экспериментах с животными.

Количество бактерий в толстом кишечнике мышей определяли методом серийных разведений [52]. Готовили десять десятикратных разведений в физиологическом растворе каждого образца. После чего производили высеивание трех последних разведений на среды КМАФАнМ и лактобакагар для определения общего микробного числа (ОМЧ) и количества молочнокислых бактерий в кишечнике исследуемых мышей. При этом 1мл разведения вносили в стерильные чашки Петри и заливали 10-12 мл теплой (44 °С) расплавленной питательной средой. Среду аккуратно перемешивали, после чего закрывали крышкой и оставляли до застывания. Посевы инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 часов. После чего подсчитывали общее количество колоний, выросших в чашках Петри, и определяли среднее значение.

Экспериментальные исследования выполняли в соответствии с требованиями Федерального закона от 01.01.1997 г. «О защите животных от жестокого обращения» и положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 18.03.1986 г.).

#### **2.1.12. Метод приготовления гистологических срезов**

Гистологические исследования проводили по методу Г.А. Меркулова [62] и окрашивали гематоксилином и эозином.

#### **2.1.13. Статистическая обработка результатов**

Результаты экспериментов подвергали статистической обработке с оценкой достоверности по критерию Стьюдента – Фишера [20]. Использовали параметрический t-критерий Стьюдента, достоверными считали различия при вероятности ошибки  $p < 0,05$ .



## 2.2. Результаты исследований и их обсуждение

### 2.2.1. Влияние условий внешней среды на рост и продукцию экзополисахаридов *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056

#### 2.2.1.1. Влияние температуры на рост и продукцию экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055

По литературным данным известно [25], что, как правило, температура, оптимальная для роста клеток оказывается оптимальной и для биосинтеза ЭПС. Однако у некоторых микроорганизмов повышение температуры оказывает положительный эффект на синтез ЭПС, в то время как у других такой эффект оказывает снижение температуры ниже оптимальной для роста. Первоначальным этапом наших исследований было выяснение влияния температуры на рост *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 для продукции этими культурами ЭПС на средах МС и МСО. Известно, что оптимальной температурой для роста данных культур является  $t=25^{\circ}\text{C}$  [39, 40]. Температура  $31^{\circ}\text{C}$  была выбрана на основании предварительных экспериментов, проведенных в диапазоне температур  $10-40^{\circ}\text{C}$ . Было показано, что изменения в синтезе ЭПС клетками *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 происходили в интервале температур  $31-35^{\circ}\text{C}$ , причем значительного отличия в синтезе ЭПС клетками этих культур в указанном диапазоне температур не наблюдали.

При построении кривой роста *X.xylophilus* Z-0055, бактерии культивировали 150 ч. При температуре  $25^{\circ}\text{C}$  экспоненциальная фаза роста культуры продолжалась до 50-55 часов на среде МС и 80-85 часов на среде МСО, после чего культура переходила в стационарную фазу. Продукция экзополисахаридов начиналась с 20 ч и продолжалась до 50-55 часов на среде МС и до 80-85 часов на среде МСО (Рисунок 5), продукция ЭПС была стабильна до 120 ч роста культуры на среде МС и 145 ч на среде МСО, после чего происходил ее спад.

Количество экзополисахаридов на 100 часов роста составило  $0,1 \pm 0,01$  г/л культуральной жидкости на среде МС и  $0,25 \pm 0,01$  г/л на среде МСО.

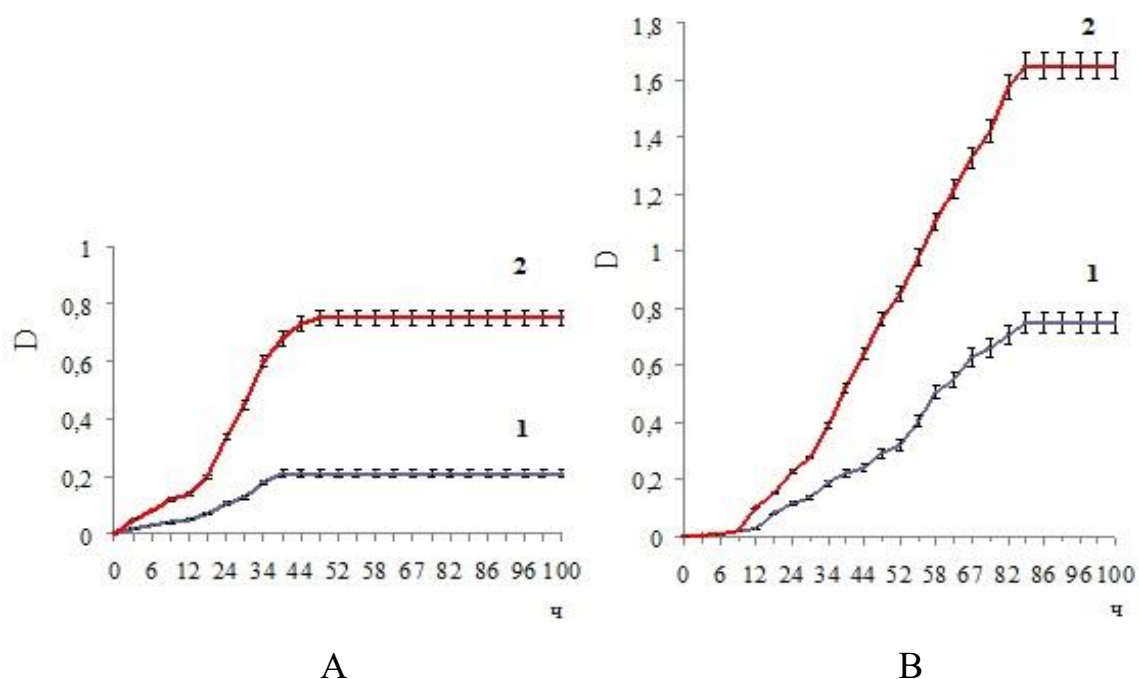


Рисунок 5 – Динамика роста и выхода ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 при 25 °С на средах МС (А) и МСО (В)  
Примечание – 1- рост ( $\lambda_{425 \text{ нм}}$ ), 2- выделение ЭПС ( $\lambda_{490 \text{ нм}}$ ).

Пересчёт количества ЭПС на 1 г сырых клеток показал, что количество ЭПС при выращивании на среде МСО составило 0,10 – 0,15 г, что было приблизительно в два раза меньше, чем при выращивании на среде МС (0,20 – 0,25 г ЭПС на г клеток).

При температуре 31°С экспоненциальная фаза роста культуры *X. xylophilus* Z-0055 продолжалась до 27 часов на среде МС и 58 часов на среде МСО, после чего культура переходила в стационарную фазу. Продукция экзополисахаридов на среде МС начиналась с 5 часов и продолжалась до 90 часов, на среде МСО – с началом роста культуры и до 65-70 часов (Рисунок 6), продукция ЭПС была стабильна до 110 ч роста культуры на среде МС и 105 ч на среде МСО, после чего происходил ее спад.

Количество экзополисахаридов на 100 часов роста было равно  $0,30 \pm 0,01$  г/л культуральной жидкости на среде МС и  $0,10 \pm 0,01$  г/л на среде МСО. Пересчёт количества ЭПС на 1 г сырых клеток показал, что на среде МС продукция ЭПС составила 0,6 г с 1 г клеток, а на среде МСО – 0,1 ЭПС с 1 г клеток.

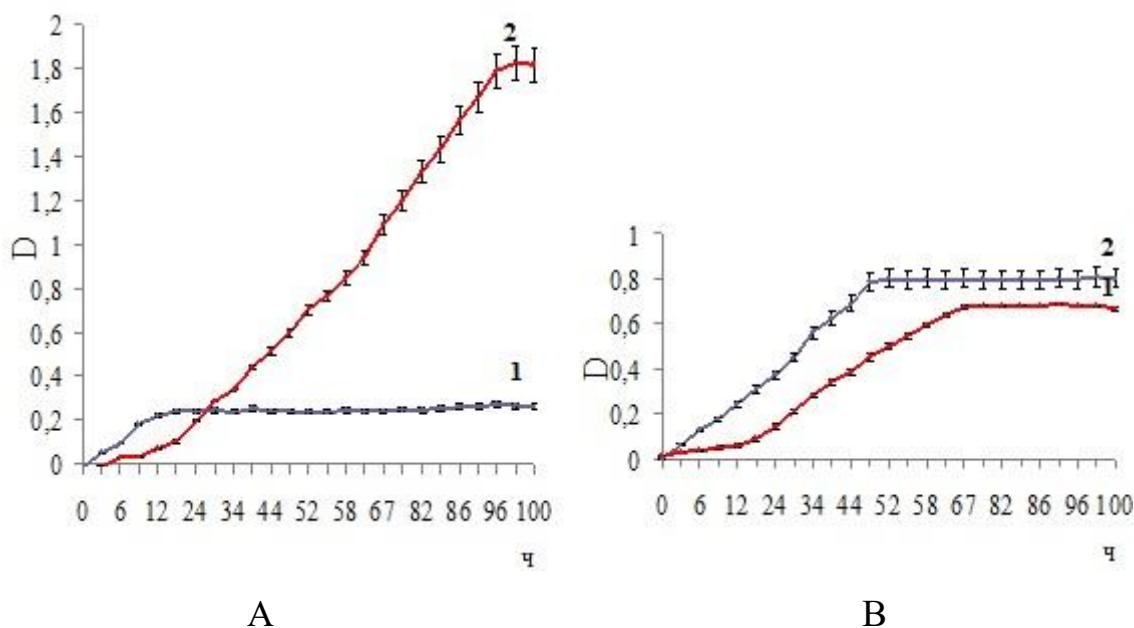


Рисунок 6 – Динамика роста и выхода ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 при 31 °С на средах МС (А) и МСО (В)

Примечание – 1- рост ( $\lambda_{425 \text{ нм}}$ ), 2- выделение ЭПС ( $\lambda_{490 \text{ нм}}$ ).

Таким образом, было установлено, что на среде с меньшим количеством азота и фосфора (МС) наблюдается образование меньшего количества клеток и увеличивается продукция экзополисахарида на единицу биомассы.

#### 2.2.1.2. Явление диауксии в процессе роста культуры

##### *X. xylophilus* Z-0055

Изучение роста культуры и продукции ЭПС бактериями *X. xylophilus* Z-0055 показало, что в условиях недостатка питательных веществ (в поздней стационарной фазе роста культуры) на среде МС клетки питаются за счет накопленного в среде полисахарида, что вызывает повторение фазы экспоненциального роста культуры в период 146-154 часов культивирования (Рисунок 7), т.е. наблюдается явление диауксии.

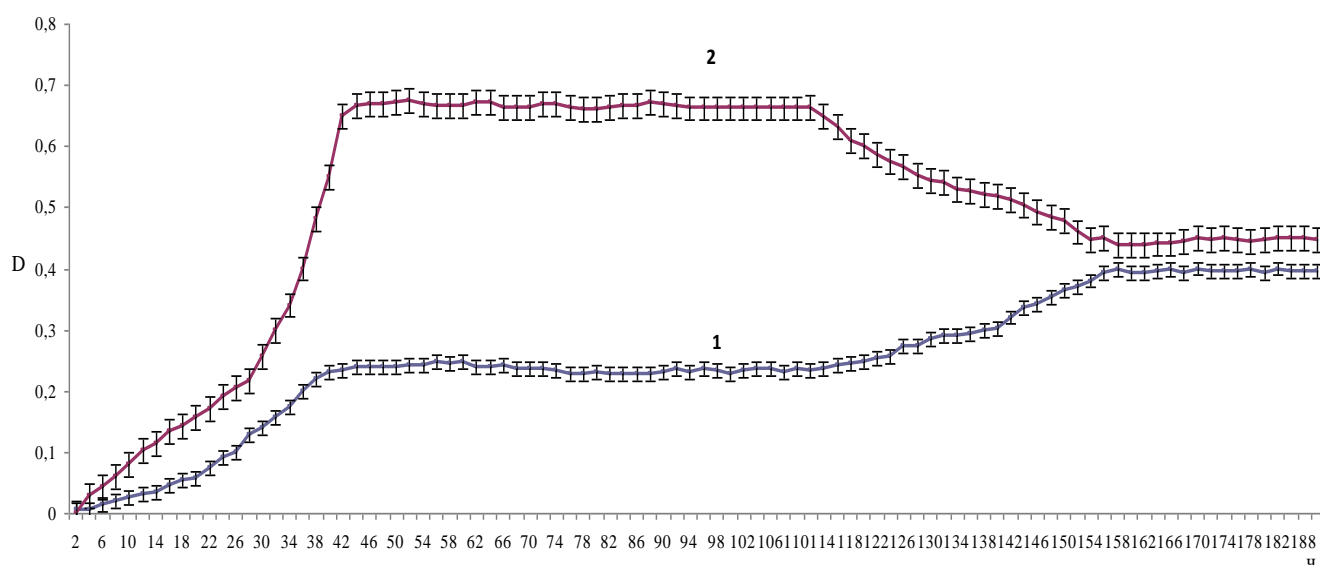


Рисунок 7 – Динамика роста культуры и продукции экзополисахаридов *X.xylophilus*Z-0055  
Примечание – 1- рост ( $\lambda_{425 \text{ нм}}$ ), 2- выделение ЭПС ( $\lambda_{490 \text{ нм}}$ ).

Таким образом, можно предположить, что экзополисахариды играют роль запасного питательного вещества для культуры *X. xylophilus* Z-0055.

### 2.2.1.3. Влияние температуры на рост и продукцию экзополисахаридов *A. abiegnus* Z-0056

При выращивании культуры *A.abiegnus* Z-0056 при температуре 25°C наблюдали продолжительную стационарную фазу, которая начиналась на обеих средах (МС и МСО) с 50-60 часа (Рисунок 8). Однако, характер выделения ЭПС на среде МС и МСО был разный. На среде МС выделение ЭПС бактериями происходило с 45 до 100 часов роста культуры, а на среде МСО, содержащей в своем составе большее количество азота и фосфора, максимальное выделение биополимера наблюдали с 40 до 60 часов.

Количество экзополисахаридов на 100 часов роста было равно  $0,20 \pm 0,01$  г/л культуральной жидкости на среде МС, а на среде МСО  $0,30 \pm 0,01$  г/л. Пересчёт количества ЭПС на 1 г сырых клеток показал, что на среде МС продукция ЭПС составила 0,1 г ЭПС с 1 г клеток, а на среде МСО – 0,2 г ЭПС с 1 г клеток.

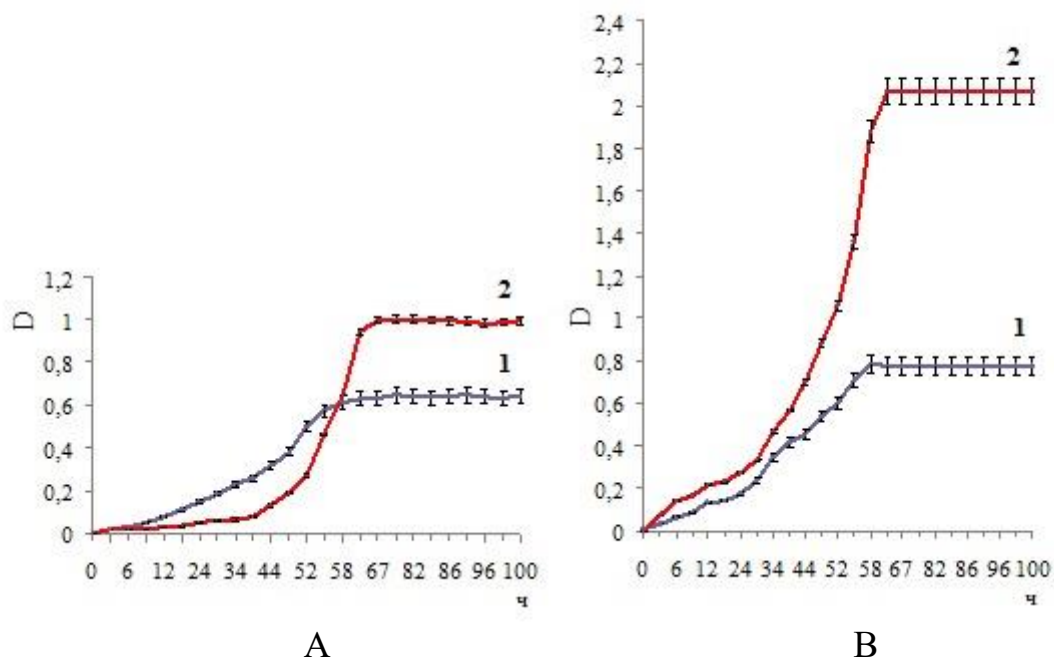


Рисунок 8 – Динамика роста и выхода ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 при 25° С на средах МС (А) и МСО (В)

Примечание – 1- рост ( $\lambda_{425 \text{ нм}}$ ), 2- выделение ЭПС ( $\lambda_{490 \text{ нм}}$ ).

При температуре 31°С культура *A.abiegnus* Z-0056 одинаково хорошо росла на обеих средах, при этом продолжительность стационарной фазы на средах МС и МСО составила 20 часов (Рисунок 9). Выделение культурой ЭПС на обеих средах продолжалось с 25 до 45 часов. Максимальное количество экзополисахаридов было  $0,03 \pm 0,001$  г/л культуральной жидкости на обеих средах. Пересчёт количества ЭПС на 1 г сырых клеток показал, что на обеих средах продукция ЭПС составила 0,1 г с 1 г клеток.

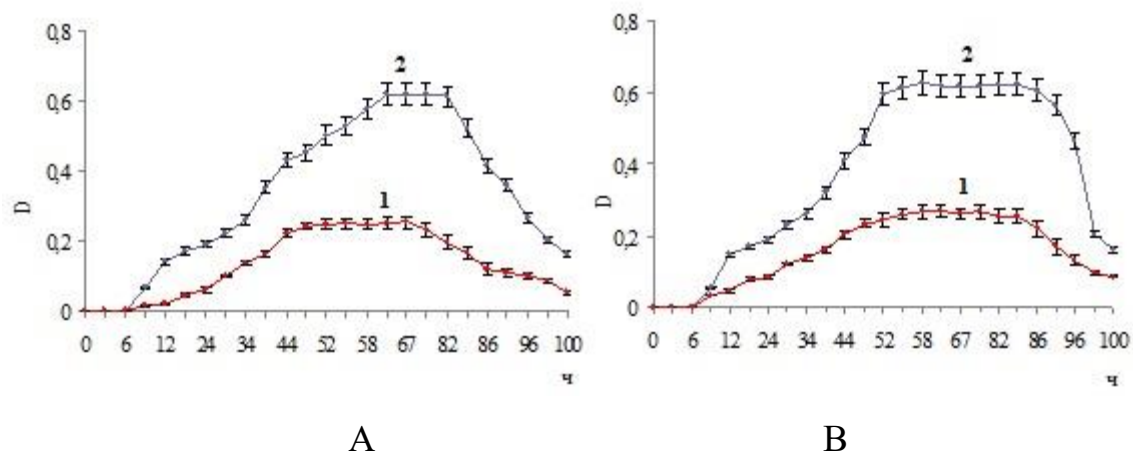


Рисунок 9 – Динамика роста и выхода ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 при 31°C на средах МС (А) и МСО (В)

Примечание – 1 - рост ( $\lambda_{425 \text{ нм}}$ ), 2 - выделение ЭПС ( $\lambda_{490 \text{ нм}}$ ).

Таким образом, повышение температуры до 31 °С приводило к уменьшению продолжительности стационарной фазы роста *A.abiegnus* Z-0056, а также уменьшению продолжительности выделения ЭПС и общей продукции ЭПС бактериальными клетками.

#### 2.2.1.4. Влияние аэрации на рост и продукцию экзополисахаридов

##### *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056

Следующим этапом исследований было выяснение влияния аэрации на рост *X.xylophilus* Z-0055, *A.abiegnus* Z-0056 и продукцию этими бактериями ЭПС. Для этого бактерии выращивали на шейкер-инкубаторе при встряхивании с частотой 200 об/мин, 100 об/мин и без встряхивания на средах МС и МСО. Максимальная продукция ЭПС была получена при выращивании клеток культур с аэрацией при встряхивании со скоростью 200 об/мин на среде МСО (Таблица 1, 2). Как видно из таблиц 1 и 2 от встряхивания зависит и количество клеток микроорганизмов. Максимальное количество клеток наблюдали на среде МСО при встряхивании 200 об/мин.

Таблица 1 – Влияние аэрации на рост *X.xylophilus* Z-0055  
и продукцию ЭПС

Частота встряхивания, об/мин	Время культивирования, ч	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл		Количество ЭПС мг/л	
		МС	МСО	МС	МСО
		М $\pm$ m	М $\pm$ m	М $\pm$ m	М $\pm$ m
200	24	10,00 $\pm$ 0,50	13,00 $\pm$ 0,40	28,00 $\pm$ 0,90	34,00 $\pm$ 1,20
	46	18,00 $\pm$ 0,90	30,00 $\pm$ 1,00	82,00 $\pm$ 3,40	42,00 $\pm$ 1,40
	100	58,00 $\pm$ 2,30	120,00 $\pm$ 4,80	98,00 $\pm$ 3,80	110,00 $\pm$ 4,80
	136	58,00 $\pm$ 2,30	124,00 $\pm$ 4,90	99,00 $\pm$ 4,00	112,00 $\pm$ 4,90
100	24	8,00 $\pm$ 0,30	9,00 $\pm$ 0,30	11,00 $\pm$ 0,50	12,00 $\pm$ 0,60
	46	8,00 $\pm$ 0,30	24,00 $\pm$ 0,90	65,00 $\pm$ 2,50	36,00 $\pm$ 1,00
	100	30,00 $\pm$ 1,00	42,00 $\pm$ 1,60	78,00 $\pm$ 3,80	42,00 $\pm$ 1,60
	136	52,00 $\pm$ 2,00	83,00 $\pm$ 4,40	72,00 $\pm$ 3,00	64,00 $\pm$ 2,40
без встряхивания	24	1,00 $\pm$ 0,01	3,00 $\pm$ 0,10	18,00 $\pm$ 0,90	12,00 $\pm$ 0,50
	46	4,00 $\pm$ 0,10	12,00 $\pm$ 0,50	36,00 $\pm$ 1,20	15,00 $\pm$ 0,60
	100	20,00 $\pm$ 0,90	30,00 $\pm$ 1,00	38,00 $\pm$ 1,50	34,00 $\pm$ 1,20
	136	24,00 $\pm$ 0,90	56,00 $\pm$ 2,30	24,00 $\pm$ 1,00	32,00 $\pm$ 1,00

Таблица 2 – Влияние аэрации на рост *A.abiegnus* Z-0056  
и продукцию ЭПС

Частота встряхивания, об/мин	Время культивирования, ч	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл		Количество ЭПС мг/л	
		МС	МСО	МС	МСО
		М $\pm$ m	М $\pm$ m	М $\pm$ m	М $\pm$ m
200	24	4,20 $\pm$ 0,20	4,20 $\pm$ 0,20	14,00 $\pm$ 0,70	14,00 $\pm$ 0,70
	46	14,00 $\pm$ 0,70	14,20 $\pm$ 0,70	20,00 $\pm$ 0,90	14,00 $\pm$ 0,70
	100	14,00 $\pm$ 0,70	21,50 $\pm$ 1,00	118,00 $\pm$ 5,90	88,00 $\pm$ 4,40
	136	11,80 $\pm$ 0,60	20,50 $\pm$ 1,00	96,00 $\pm$ 4,80	200,00 $\pm$ 10,00
100	24	2,00 $\pm$ 0,10	2,00 $\pm$ 0,10	6,00 $\pm$ 0,30	6,00 $\pm$ 0,30
	46	7,50 $\pm$ 0,40	9,50 $\pm$ 0,50	14,00 $\pm$ 0,70	8,00 $\pm$ 0,40
	100	9,40 $\pm$ 0,50	12,80 $\pm$ 0,60	76,00 $\pm$ 3,80	56,00 $\pm$ 2,30
	136	10,40 $\pm$ 0,50	18,20 $\pm$ 0,90	94,00 $\pm$ 4,70	118,00 $\pm$ 3,50
без встряхивания	24	2,30 $\pm$ 0,08	1,0 $\pm$ 0,05	4,00 $\pm$ 0,20	5,00 $\pm$ 0,20
	46	5,60 $\pm$ 0,30	4,20 $\pm$ 0,20	28,00 $\pm$ 1,40	48,00 $\pm$ 2,40
	100	6,6 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 0,3	52,0 $\pm$ 3,1	56,0 $\pm$ 2,8
	136	6,6 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,3	64,0 $\pm$ 3,2	68,0 $\pm$ 3,4

### 2.2.1.5. Влияние азота и фосфора на рост и продукцию экзополисахаридов *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056

Дальнейшие исследования были связаны с изучением влияния азота и фосфора на рост и продукцию ЭПС. В качестве источника азота и фосфора были взяты различные концентрации нитрата аммония (0,125; 0,25; 0,5 г/л) и дигидрофосфата калия (0,035; 0,07; 0,14 г/л).

Рост культуры *X.xylophilus* Z-0055 на среде МС при добавлении различных концентраций нитрата аммония незначительно отличался друг от друга, причем максимальным ( $2,5 \cdot 10^9$  клеток/мл) он был при концентрации в среде МС 0,5 г/л (Рисунок 10). Наибольшую продукцию ЭПС (144 мг/л) наблюдали при концентрации нитрата аммония в среде 0,25 г/л (Рисунок 10).

При добавлении в среду МС различных концентраций дигидрофосфата калия наилучший рост культуры *X.xylophilus* Z-0055, а также продукцию ЭПС наблюдали при концентрации 0,14 г/л (Рисунок 11).

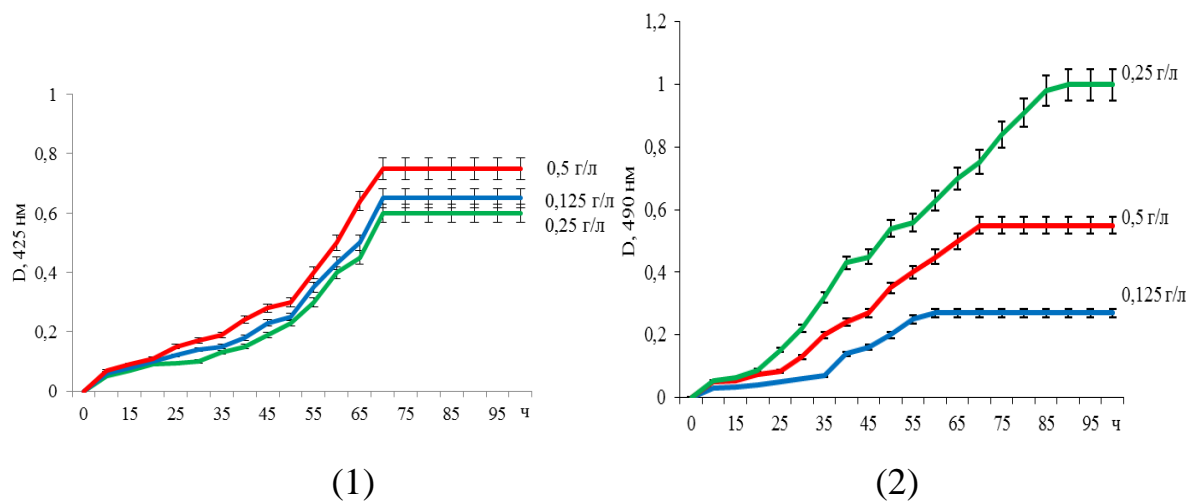


Рисунок 10 – Динамика роста (1) и продукции ЭПС (2) *X. xylophilus* Z-0055 на среде МС при 25 °С с добавлением нитрата аммония в различных концентрациях



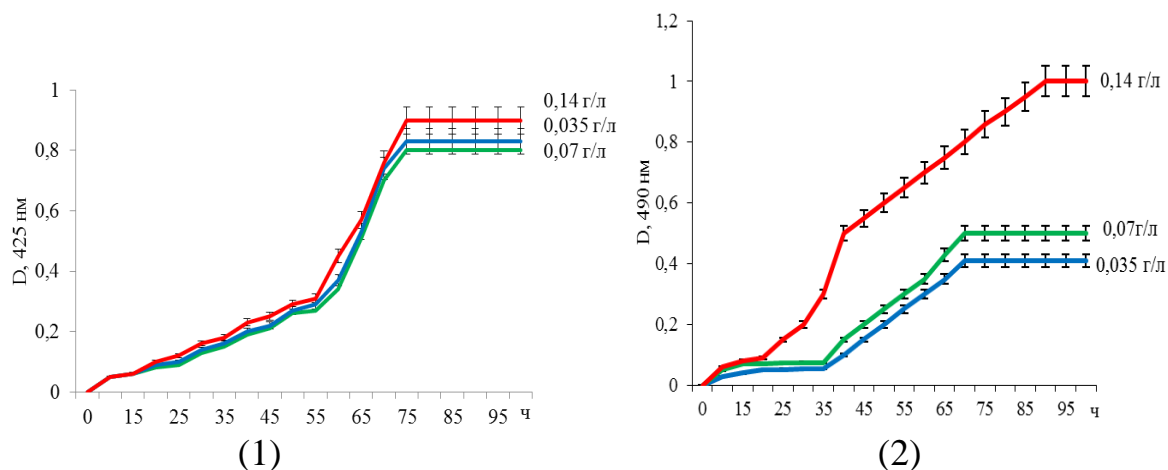


Рисунок 11 – Динамика роста (1) и продукции ЭПС (2) *X. xylophilus* Z-0055 на среде МС при 25°C с добавлением дигидрофосфата калия в различных концентрациях

Рост культуры *A. abiegnus* Z-0056 на среде МС при добавлении нитрата аммония был максимальным ( $5,0 \cdot 10^9$  клеток/мл) при концентрации в среде 0,25 г/л (Рисунок 12). Наибольшую продукцию ЭПС (140 мг/л) наблюдали при этой же концентрации нитрата аммония в среде (Рисунок 12). При добавлении в среду МС различных концентраций дигидрофосфата калия культура одинаково хорошо росла при 0,035; 0,07; 0,14 г/л (Рисунок 13). Однако продукция ЭПС была максимальной (160 мг/л) при концентрации дигидрофосфата калия в среде 0,14 г/л.

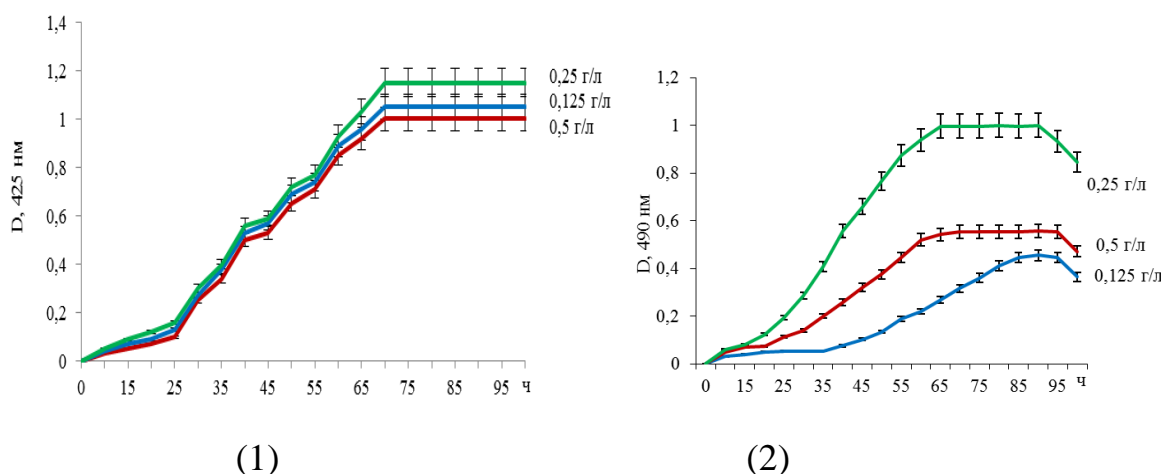


Рисунок 12 – Динамика роста (1) и продукции ЭПС (2) *A. abiegnus* Z-0056 на среде МС при 25°C с добавлением нитрата аммония в различных концентрациях

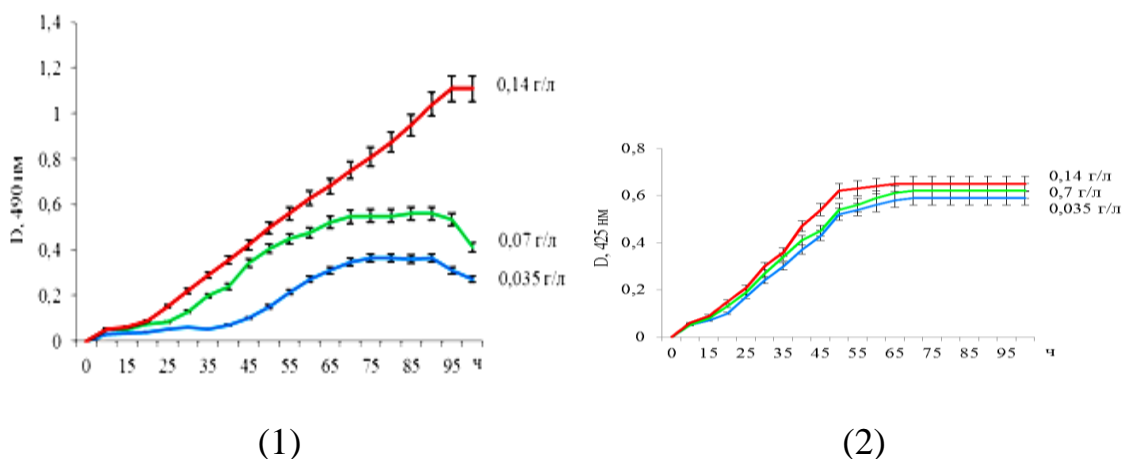


Рисунок 13 – Динамика роста (1) и продукции ЭПС (2) *A. abiegnus* Z-0056 на среде МС при 25°C с добавлением дигидрофосфата калия в различных концентрациях

Таким образом, как свидетельствуют результаты исследований, увеличение содержания азота и фосфора (среда МСО) приводило к увеличению продолжительности экспоненциального роста клеток, а также к выделению большего количества полисахарида.

#### 2.2.1.6. Влияние источника углерода на рост и продукцию экзополисахарида *X.xylophilus* Z-0055

Известно, что источники углерода также влияют на продукцию ЭПС [25]. Поэтому последующие исследования были связаны с изучением влияния различных источников углерода и их концентрации на продукцию ЭПС. В качестве источников углерода в среду МС добавляли одно из следующих соединений: сукцинат, цитрат, оксалат, ксилозу и ксилан в концентрациях 1,0 и 3,0 г/л.

Концентрация 1,0 г/л была первоначальной в среде, рекомендуемой для роста культуры по литературным данным [39, 40]. Мы исследовали влияние увеличения концентрации углерода в среде на продукцию ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056. Источники углерода были выбраны

в соответствии с работами исследователей, которые впервые выделили эти культуры [39, 40].

При культивировании *X.xylophilus* Z-0055 на средах с различными источниками углерода наблюдали, что наилучший рост был на средах с ксиланом (1,0 г/л), сукцинатом (3,0 г/л) (Таблица 3). Несколько хуже культура росла на средах с оксалатом 1,0 г/л и 3,0 г/л и сукцинатом 1,0 г/л. Незначительным был рост на средах с цитратом и ксилозой в концентрации 1,0 г/л, а также цитратом, ксилозой и ксиланом в концентрации 3,0 г/л. Продукция ЭПС была наибольшей на средах сукцинатом 3,0 и 1,0 г/л. Менее выраженную продукцию наблюдали на средах с оксалатом 3,0 г/л, цитратом 1,0 г/л, ксиланом 1,0 г/л. Незначительную продукцию наблюдали на средах с оксалатом 1,0 г/л и цитратом 3,0 г/л. Не наблюдали продукции ЭПС на средах с ксилозой 1,0 и 3,0 г/л и ксиланом 3,0 г/л.

Таблица 3 – Влияние различных источников углерода  
на рост *X.xylophilus* Z-0055 и продукцию ЭПС

Источник угле- рода, г/л		Время выращивания, ч	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС мг/л
			М $\pm$ m	М $\pm$ m
Сукцинат	1,0	24	1,30 $\pm$ 0,06	10,00 $\pm$ 0,50
		46	2,10 $\pm$ 0,10	46,00 $\pm$ 2,00
		72	3,80 $\pm$ 0,10	80,00 $\pm$ 4,00
		96	4,60 $\pm$ 0,20	105,00 $\pm$ 5,00
	3,0	24	1,00 $\pm$ 0,050	18,00 $\pm$ 0,50
		46	16,00 $\pm$ 0,80	78,00 $\pm$ 0,70
		72	16,00 $\pm$ 0,80	114,00 $\pm$ 1,00
		96	16,00 $\pm$ 0,80	124,00 $\pm$ 1,00
Оксалаат	1,0	24	1,20 $\pm$ 0,05	5,00 $\pm$ 0,10
		46	2,10 $\pm$ 0,10	10,00 $\pm$ 0,50
		72	3,20 $\pm$ 0,10	16,00 $\pm$ 0,50
		96	4,70 $\pm$ 0,20	18,00 $\pm$ 0,50
	3,0	24	1,20 $\pm$ 0,05	18,00 $\pm$ 0,50
		46	2,00 $\pm$ 0,10	30,00 $\pm$ 1,00
		72	2,60 $\pm$ 0,10	44,00 $\pm$ 1,00
		96	3,00 $\pm$ 0,20	32,00 $\pm$ 1,00
Цитрат	1,0	24	1,20 $\pm$ 0,06	10,00 $\pm$ 0,50
		46	1,40 $\pm$ 0,06	40,00 $\pm$ 2,00
		72	1,40 $\pm$ 0,06	40,00 $\pm$ 2,00
		96	1,40 $\pm$ 0,06	40,00 $\pm$ 2,00
	3,0	24	1,00 $\pm$ 0,05	12,00 $\pm$ 0,30
		46	1,30 $\pm$ 0,05	18,00 $\pm$ 0,50
		72	1,50 $\pm$ 0,05	18,00 $\pm$ 0,50
		96	1,50 $\pm$ 0,05	18,00 $\pm$ 0,50
Ксилоза	1,0	24	1,10 $\pm$ 0,05	0
		46	1,50 $\pm$ 0,06	0
		72	1,50 $\pm$ 0,06	0
		96	1,50 $\pm$ 0,06	0
	3,0	24	1,20 $\pm$ 0,05	0
		46	1,40 $\pm$ 0,05	0
		72	1,40 $\pm$ 0,05	0
		96	1,40 $\pm$ 0,05	0
Ксилан	1,0	24	2,50 $\pm$ 0,10	0
		46	4,80 $\pm$ 0,20	0
		72	12,00 $\pm$ 0,60	30,00 $\pm$ 1,00
		96	12,00 $\pm$ 0,60	30,00 $\pm$ 1,00
	3,0	24	1,20 $\pm$ 0,05	0
		46	1,40 $\pm$ 0,05	0
		72	1,40 $\pm$ 0,05	0
		96	1,40 $\pm$ 0,05	0

Примечание – «0» не наблюдали продукции экзополисахаридов.

Таким образом, оптимальным источником углерода является сукцинат натрия, так как его содержание в среде способствует наилучшему росту бактериальных клеток и максимальной продукции ЭПС *X.xylophilus* Z-0055.

#### **2.2.1.7. Влияние источника углерода на рост и продукцию экзополисахарида *A.abiegnus* Z-0056**

При культивировании *A.abiegnus* Z-0056 на средах с различными источниками углерода наблюдали, что наилучший рост был на средах с ксилозой (3,0 г/л), сукцинатом (3,0 г/л) (Таблица 4). Несколько хуже культура росла на средах с ксилозой (1,0 г/л), сукцинатом (1,0 г/л) и цитратом (1,0 г/л). Незначительным был рост на средах с оксалатом, ксиланом в обеих концентрациях и цитратом (3,0 г/л). Продукция ЭПС была наибольшей на средах с сукцинатом в концентрации 1,0 г/л. Менее выраженную продукцию наблюдали на средах с сукцинатом (3,0 г/л), цитратом (1,0 г/л). Незначительную продукцию наблюдали на средах с оксалатом в обеих концентрациях, цитратом (3,0 г/л). Продукция ЭПС практически не наблюдалась на средах с ксилозой и ксиланом.

Таблица 4 – Влияние различных источников углерода  
на рост *A.abiegnus* Z-0056 и продукцию ЭПС

Источник угле- рода		Время выращивания, ч	Количество клеток $\times 10^8$ кл./мл	Количество ЭПС г/л
			$M \pm m$	$M \pm m$
Сукцинат	1,0	24	6,50±0,30	52,00±2,60
		46	12,80±0,60	76,00±3,80
		72	12,80±0,60	96,00±4,80
		96	13,80±0,70	118,00±5,90
	3,0	24	6,50±0,30	43,00±2,10
		46	12,80±0,10	56,00±2,80
		72	13,00±0,10	68,00±3,40
		96	15,40±0,80	66,00±3,30
Оксалат	1,0	24	2,50±0,10	14,00±0,70
		46	3,50±0,20	14,00±0,70
		72	3,50±0,20	14,00±0,70
		96	3,50±0,20	14,00±0,70
	3,0	24	2,40±0,12	14,00±0,70
		46	3,60±0,20	14,00±0,70
		72	3,60±0,20	14,00±0,70
		96	3,60±0,20	14,00±0,70
Цитрат	1,0	24	2,00±0,10	14,00±0,70
		46	3,00±0,10	16,00±0,80
		72	6,40±0,30	34,00±1,70
		96	9,50±0,50	56,00±2,80
	3,0	24	2,00±0,10	14,00±0,70
		46	2,10±0,10	14,00±0,70
		72	2,10±0,10	14,00±0,70
		96	2,10±0,10	14,00±0,70
Ксилоза	1,0	24	5,40±0,30	0
		46	9,60±0,50	0
		72	11,40±0,60	0,6±0,03
		96	13,50±0,70	0,6±0,03
	3,0	24	7,30±0,40	0
		46	11,90±0,60	0,10±0,05
		72	17,00±0,80	0
		96	17,00±0,80	0
Ксилан	1,0	24	2,00±0,10	0
		46	3,60±0,20	0,5±0,02
		72	3,60±0,20	0,5±0,02
		96	3,60±0,20	0,5±0,02
	3,0	24	1,00±0,050	0
		46	2,00±0,10	0,08±0,01
		72	2,00±0,10	0,08±0,01

Примечание – «0» не наблюдали продукции экзополисахаридов.

По результатам данного эксперимента, оптимальным источником углерода для роста и продукции ЭПС культурой *A.abiegnus* Z-0056 является сукцинат натрия.

В таблицах 5,6 представлены биотехнологические характеристики роста и продукции экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056.

Таблица 5 – Влияние температуры и состава среды на рост и продукцию ЭПС *X.xylophilus* Z-0055

Условия	Абсолютно сухая биомасса (АСБ) клеток, г/л	Сухой ЭПС, г/л	Выход ЭПС / АСБ	Выход ЭПС / субстрат
МС, 25 °С	0,25	0,10	0,40	0,10
МС, 31 °С	0,14	0,30	2,14	0,30
МСО, 25 °С	0,40	0,25	0,63	0,25
МСО, 31 °С	0,30	0,10	0,33	0,10

Примечание: АСБ – абсолютно сухая биомасса клеток.

Таблица 6 – Влияние температуры и состава среды на рост и продукцию ЭПС *A.abiegnus* Z-0056

Условия	Абсолютно сухая биомасса (АСБ) клеток, г/л	Сухой ЭПС, г/л	Выход ЭПС / АСБ	Выход ЭПС / субстрат
МС, 25 °С	0,29	0,20	0,70	0,20
МС, 31 °С	0,27	0,03	0,11	0,03
МСО, 25 °С	0,38	0,30	0,80	0,30
МСО, 31 °С	0,27	0,03	0,11	0,03

Примечание: АСБ – абсолютно сухая биомасса клеток.

Как видно из представленных данных, продукция экзополисахаридов культурой *X. xylophilus* Z-0055 была оптимальна на среде МС при температуре 31 °С и сравнима с продукцией ЭПС другими продуцентами [25]. Продукция ЭПС культуры *A. abiegnus* Z-0056 достигает максимума при 25 °С на среде МСО и была относительно невысока, но превышает приводимую в литературе продукцию биологически активных веществ [97]. Так, продукция ЭПС *Methylomonas*, *Methylococcus* составляет 0,05-0,23 г/л [55].

## 2.2.2. Физико-химические свойства экзополисахаридов

### *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056

#### 2.2.2.1. Физико-химические свойства экзополисахарида

##### *X.xylophilus* Z-0055

Используя метод ионнообменной хроматографии было показано, что экзополисахарид *X.xylophilus* Z-0055 состоял из двух фракций: нейтральной и кислой примерно в равном соотношении (Рисунок 14).

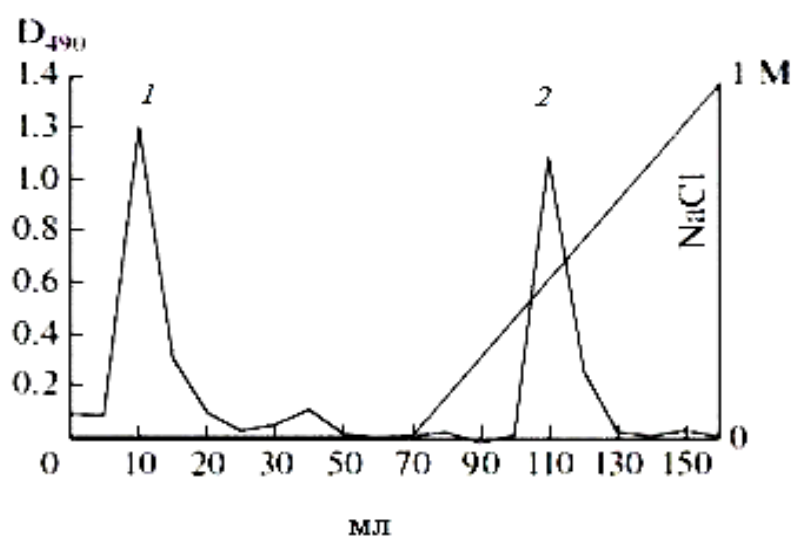


Рисунок 14 – Профиль элюции ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 при ионообменной хроматографии на колонке DEAE-C Toyopearl 650M (детекция по углеводам)

Примечание – 1- нейтральная фракция, 2 - кислая фракция.

Молекулярная масса нейтральной фракции ЭПС составила 10-20 кДа, кислой – 30-40 кДа (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты гель-хроматографии фракций ЭПС *X.xylophilus* Z-0055

Калибровочный график	Вещества	Время выхода, мин	Молекулярная масса, кДа
	Декстран	18,623	1,5
	Декстран	16,923	5
	Декстран	14,942	15
	Декстран	13,073	110
	Декстран	11,607	2000
Опыт	Нейтральная фракция	14,940	10-20
	Кислая фракция	14,549	30-40



Анализ моносахаридного состава нейтральной фракции методом ВЭЖХ показал наличие в её составе глюкозы, галактозы и маннозы в соотношении - 1:2:2 (Таблица 8, Рисунок 15).

Таблица 8 – Площади пиков (ед.) нейтральной фракции  
ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 (ВЭЖХ)

Показания прибора	Моносахариды	Глюкоза	Галактоза	Манноза
Калибровочный график (соотношение 1:1:1)		98,389	85,709	44,755
Нейтральная фракция		50,417	95,952	47,856
Соотношение		1	2	2

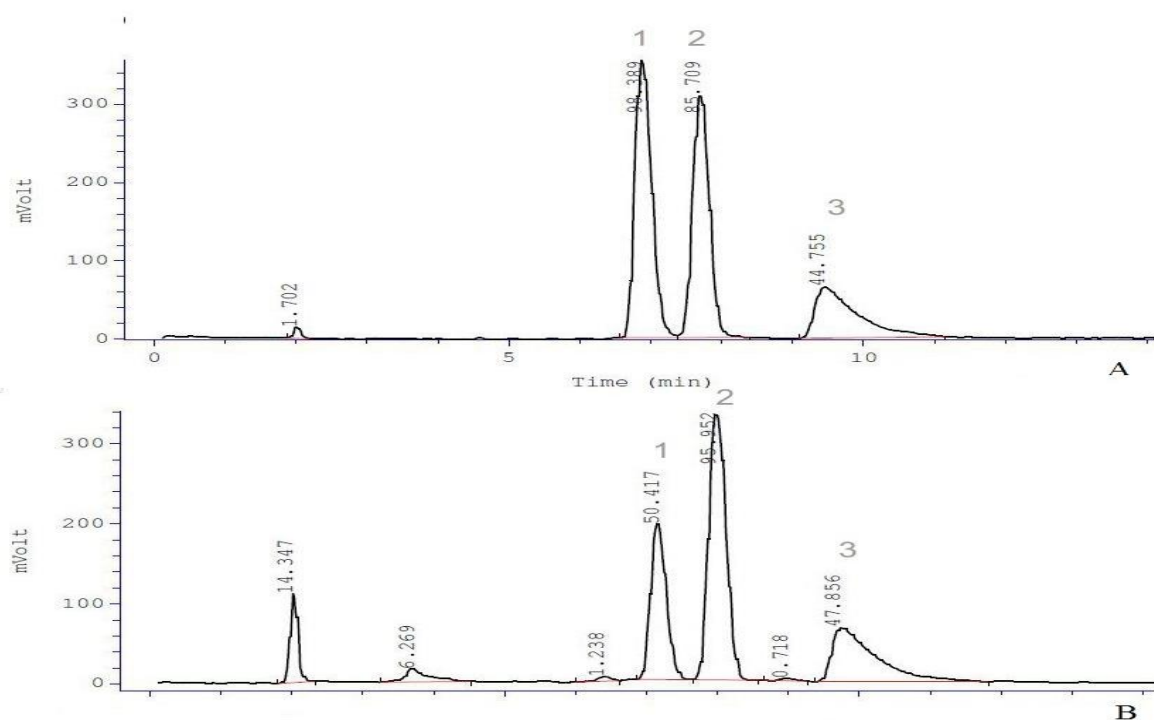


Рисунок 15 – Высокоэффективная жидкостная хроматография  
нейтральной фракции ЭПС *X.xylophilus* Z-0055

Примечание – А – калибровочный график;  
В – нейтральная фракция ЭПС *X.xylophilus* Z-0055;  
1 - глюкоза; 2 - галактоза; 3 - манноза.

Анализ кислой фракции проводили методом ГЖХ, который подтвердил данные ТСХ о том, что экзополисахарид является кислым (Рисунок 16) , и

установил наличие в нём ксилозы, галактозы и глюкуроновой кислоты в соотношении - 2:1:1 (Таблица 9).

Таблица 9 – Площади пиков (ед.) кислой фракции  
ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 (ГЖХ)

Показания прибора \ Моносахариды	Ксилоза	Галактоза	Глюкуроновая кислота
Калибровочный график (соотношение 1:1:1)	3,1	4,9	6,4
Кислая фракция	6,4	5,1	6,2
Соотношение	2	1	1



1 2 3 4 5

Рисунок 16 – Тонкослойная хроматография ЭПС

*X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056

Примечание – 1 - углеводы маркеры: глюкоза, манноза; 2, 3 - ЭПС *A.abiegnus* Z-0056; 4 - ЭПС *X.xylophilus* Z-0055; 5 - углеводы маркеры: галактуроновая кислота, галактоза, глюкуроновая кислота (снизу вверх).

Динамическая вязкость 1% раствора ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 при +25° С составила 58 мПа·с.

### 2.2.2.2. Физико-химические свойства экзополисахарида

#### *Ancylobacter abiegnus* Z-0056

Методом ионнообменной хроматографии было показано, что экзополисахарид *A.abiegnus* Z-0056 состоял из одной кислой фракции (Рисунок 17).

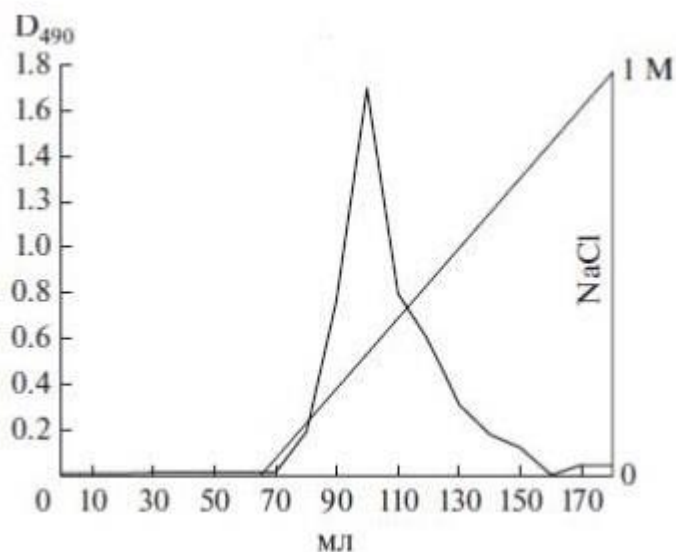


Рисунок 17 – Профиль элюции ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 при ионообменной хроматографии на колонке DEAE-C Toyopearl 650M (детекция по углеводам)

Методом гель-хроматографии было показано, что молекулярная масса ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 равна 10-20 к Да (Таблица 10).

Таблица 10 – Результаты гель-хроматографии фракций ЭПС *A.abiegnus* Z-0056

	Вещества	Время выхода, мин	Молекулярная масса, кДа
Калибровочный график	Декстран	18,623	1,5
	Декстран	16,923	5
	Декстран	14,942	15
	Декстран	13,073	110
	Декстран	11,607	2.000
Опыт	ЭПС	14,750	10-20

Анализ моносахаридного состава ЭПС *A.abiegnus* Z-0056 методом тонкослойной хроматографии показал наличие в нем глюкозы, маннозы и галактуроновой кислоты (см. Рисунок 16). Для уточнения моносахаридного состава был использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в модификации для одновременного определения кислых и нейтральных сахаров [208, 286].

Методом ВЭЖХ было показано, что исследуемый ЭПС *A. abiegnus* Z-0056 имеет в составе глюкозу, маннозу, галактуроновую кислоту в соотношении 1:2:2 (Рисунок 18, таблица 11), а также следовые количества галактозы, арабинозы и фукозы.

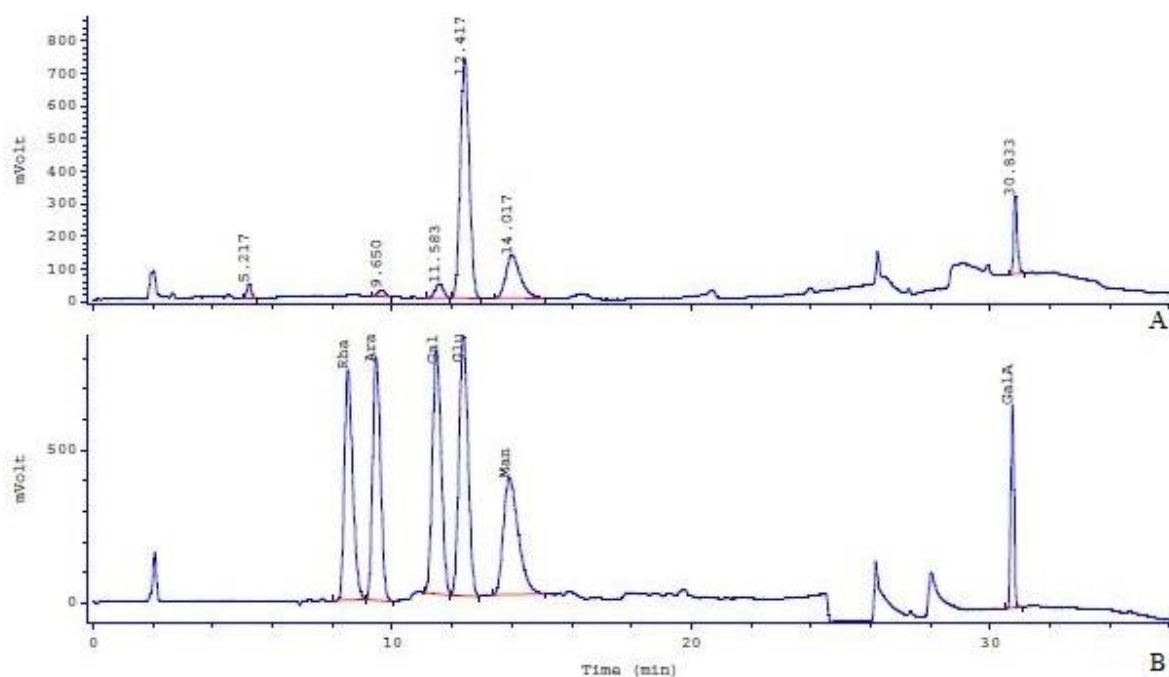


Рисунок 18 – Высокоэффективная жидкостная хроматография  
ЭПС *A.abiegnus* Z-0056

Примечание – А – калибровочный график; В – ЭПС *A.abiegnus* Z-0056.

Таблица 11 – Площади пиков (ед.) кислой фракции  
ЭПС *A.abiegnus* Z-0056 (ВЭЖХ)

Показания прибора \ Моносахариды	Манноза	Галактуроновая кислота	Глюкоза
Калибровочный график (соотношение 1:1:1)	14,017	30,833	12,419
ЭПС	30,042	62,166	13,769
Соотношение	2	2	1

Динамическая вязкость 1% раствора ЭПС *A.abiegnus* Z-0056 при +25° С составила 52 мПа·с.

### 2.2.3. Биологические свойства экзополисахаридов

#### *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056

##### 2.2.3.1. Влияние экзополисахаридов *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 на рост микроорганизмов

Для изучения влияния ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 на рост микроорганизмов использовали методы серийных разведений и диффузии в агар [52]. Влияния экзополисахаридов *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 на микроорганизмы проводили в концентрациях 0,25; 0,5 и 1,0 г/л.

В результате было показано, что добавление ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 в концентрации 1 г/л усиливало рост бактерий сходных местообитаний *S.mucilaginoso* Z-0071, *A.abiegnus* Z-0056, а также своего продуцента *X.xylophilus* Z-0055 (Таблица 12).

Таблица 12– Влияние ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 в концентрации 1 г/л на рост микроорганизмов сходных местообитаний

Штамм	D, ( $\lambda=425$ нм), без добавления ЭПС	D, ( $\lambda=425$ нм), с добавлением ЭПС	Результат
<i>S.mucilaginosa</i> Z-0071	0,295	0,323	Усиление роста
<i>A.abiegnus</i> Z-0056	0,551	0,600	Усиление роста
<i>X.xylophilus</i> Z-0055	0,379	0,443	Усиление роста

Добавление ЭПС в концентрации 1,0 г/л *A.abiegnus* Z-0056 усиливало рост *S.mucilaginosa* Z-0071 и своего продуцента, на рост *X.xylophilus* Z-0055 препарат влияния не оказывал (Таблица 13).

Таблица 13 – Влияние ЭПС *A.abiegnus* Z-0056 в концентрации 1 г/л на рост микроорганизмов сходных местообитаний

Штамм	D, ( $\lambda=425$ нм), без добавления ЭПС	D, ( $\lambda=425$ нм), с добавлением ЭПС	Результат
<i>S.mucilaginosa</i> Z-0071	0,295	0,353	Усиление роста
<i>A.abiegnus</i> Z-0055	0,551	0,574	Усиление роста
<i>X.xylophilus</i> Z-0055	0,379	0,374	Не влияет на рост

Добавление ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 стимулировало рост *P.aeruginosa* 27533, а на рост таких микроорганизмов как *E.coli* 01, *S.aureus* 209-Р, *B.cereus* 8035, *C.albicans* 230 в таких же концентрациях влияния не оказывал (Таблица 14).

Добавление ЭПС *A.abiegnus* Z-0056 усиливало рост *P.aeruginosa* 27533, однако на рост некоторых других микроорганизмов (*E.coli* 01, *S.aureus* 209-Р, *B.cereus* 8035, *C.albicans* 230) экзополисахарид в таких же концентрациях влияния не оказывал (Таблица 14).

Таблица 14 – Влияние ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на рост микроорганизмов других местообитаний

Концентрация ЭПС г/л	Микроорганизмы	Зона усиления роста вокруг лунки, мм	
		ЭПС <i>X. xylophilus</i> Z-0055	ЭПС <i>A. abiegnus</i> Z-0056
0,25	<i>E.coli</i> 01	-	-
	<i>S.aureus</i> 209-P	-	-
	<i>P.aeruginosa</i> 27533	2	3
	<i>B.cereus</i> 8035	-	-
	<i>C.albicans</i> 230	-	-
0,5	<i>E.coli</i> 01	-	-
	<i>S.aureus</i> 209-P	-	-
	<i>P.aeruginosa</i> 27533	5	5
	<i>B.cereus</i> 8035	-	-
	<i>C.albicans</i> 230	-	-
1,0	<i>E.coli</i> 01	-	-
	<i>S.aureus</i> 209-P	-	-
	<i>P.aeruginosa</i> 27533	7	10
	<i>B.cereus</i> 8035	-	-
	<i>C.albicans</i> 230	-	-

Примечание – «-» не наблюдали усиление роста.

Исходя из приведенных данных, можно предположить, что ЭПС бактерий-диссипотрофов *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 в микробном сообществе могут быть использованы некоторыми бактериями как источник углерода.

### 2.2.3.2. Влияние экзополисахаридов

#### *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 на инфузории *C. stenii*

Изучение влияния экзополисахаридов на инфузории *C.stenii* проводили в концентрации 1,0 г/л в соответствии с ГОСТ 13496.7–97 [24]. Было показано, что при добавлении ксилофилана в культуру инфузорий через 3-5 минут наблюдали хаотичное движение инфузорий, при этом некоторые клетки сталкивались или вращались на месте. Начиная с десятой минуты, наблюдали остановку отдельных клеток (Таблица 15). При добавлении анцилана в культуру инфузорий через 3 минуты наблюдали хаотичное движение инфузорий. Начиная с пятой минуты, происходило замедление движения отдельных клеток. Через 10 минут в поле зрения появлялись «мертвые» клетки.

Через 30 минут наступала гибель 100% инфузорий, которые находились в растворах изучаемых ЭПС. Через 50 минут в поле зрения наблюдали только фрагменты клеток (Таблица 15). Клетки инфузорий, помещенные в физиологический раствор (контроль), двигались спокойно и оставались живы в течение всего эксперимента (3 часа).

Таким образом, результаты исследования свидетельствовали о том, что экзополисахариды *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 токсичны для инфузорий.

Таблица 15 – Действие ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 на инфузории

Время, мин	Поведение инфузорий		
	с ЭПС <i>X.xylophilus</i> Z-0055	с ЭПС <i>A.abiegnus</i> Z-0056	без ЭПС
3	активное хаотичное движение	активное хаотичное движение	спокойное движение
5	активное хаотичное движение	замедленное движение	спокойное движение
10	хаотичное движение, остановка некоторых клеток	замедленное движение, некоторые клетки мертвые	спокойное движение
30	100% мертвых клеток	100% мертвых клеток	спокойное движение
40	10% мертвых клеток, 90% разрушенных клеток	10% мертвых клеток, 90% разрушенных клеток	спокойное движение
50	в поле зрения только фрагменты клеток	в поле зрения только фрагменты клеток	спокойное движение

Из литературы известно, что некоторые ЭПС бактерий оказывают разное токсичное действие на простейших [80, 86]. Так, ксантомонаны 610/1, 610/4, 610/11, 610/16, 610/23 (продуценты *Xanthomonas campestris* 610/1, *X.campestris* 610/4, *X.campestris* 610/11, *X.campestris* 610/16 и *X.campestris* 610/23) не токсичны для инфузорий, в то время как клебсилан (продуцент *Klebsiella pneumoniae* К-2) был слаботоксичен для них.

Токсичность изучаемых экзополисахаридов бактерий-диссипотрофов для инфузорий позволяет говорить об их защитной роли. Возможно, ЭПС способствуют защите бактерий от поедания простейшими в естественной среде обитания.



Таким образом, биологическая роль экзополисахаридов *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 может состоять в том, что они защищают клетки бактерий-продуцентов от простейших, а также служат запасным питательным веществом для своего продуцента и других бактерий в сообществе, о чем свидетельствуют результаты наших исследований, представленных в разделе 2.2.3.1.

### **2.2.3.3. Влияние экзополисахаридов *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 на организм лабораторных мышей**

Исследование токсичности экзополисахаридов на лабораторных мышах проводили, руководствуясь ГОСТ 13496.7–97 [24] для оценки степени опасности однократного перорального введения малой и относительно высокой доз – 0,06 и 3,0 г на 1 кг массы тела животного. Для исследования были взяты беспородные белые лабораторные мыши. Животные были разделены на 5 групп: 1 группа – контрольная, получавшая физиологический раствор (0,85 % NaCl); 2 группа получала ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 в дозе 0,06 г/кг; 3 группа – ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 в дозе 3,0 г/кг; 4 группа получала ЭПС *A.abiegnus* Z-0056 в дозе 0,06 г/кг; 5 группа – ЭПС *A.abiegnus* Z-0056 в дозе 3,0 г/кг. Животные всех групп получали препарат перорально. Затем проводили наблюдение в течение 3-х дней за поведением мышей с последующей эвтаназией и вскрытием.

Исследование токсичности ЭПС на лабораторных мышах выявило следующие особенности в каждой из групп мышей:

В 1 группе (контрольной) на протяжении всего времени эксперимента мыши были активны, поведение было характерно для здоровых животных. После вскрытия отмечено, что состояние внутренних органов (сердце, печень, почки, семенники, желчный пузырь) также соответствовало клинически здоровым животным.

При вскрытии мышей, получавших ксилофилян в дозе 3 г/кг, визуально были выявлены следующие патологические изменения со стороны внутренних органов: неравномерно окрашенная и увеличенная печень, а также уве-

личение объема желчного пузыря по сравнению с контрольными животными. На гистологических срезах органов мышей, получавших ксилофилан, были обнаружены следующие нарушения (Рисунок 19): стенка соединительнотканной капсулы почек нарушена, корковое и мозговое вещество не четкие.

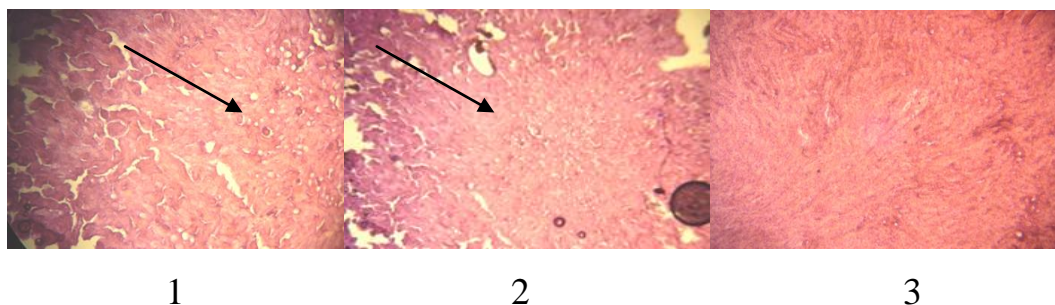


Рисунок 19 – Гистологические срезы почки после введения мышам ксилофилана ( $\times 40$ ): 1 - 0,06 г/кг; 2 - 3,0 г/кг; 3 – контроль (без ксилофилана)

В мозговом веществе видны измененные почечные тельца, извитые канальца нефрона, между ними просматривалось разрастание соединительной ткани. Петли нефронов и собирательные трубочки просматривались не четко. В почках, печени и сердце наблюдали экссудат, что свидетельствовало о воспалении, идущем в организме животного (Рисунок 19, 20, 21).

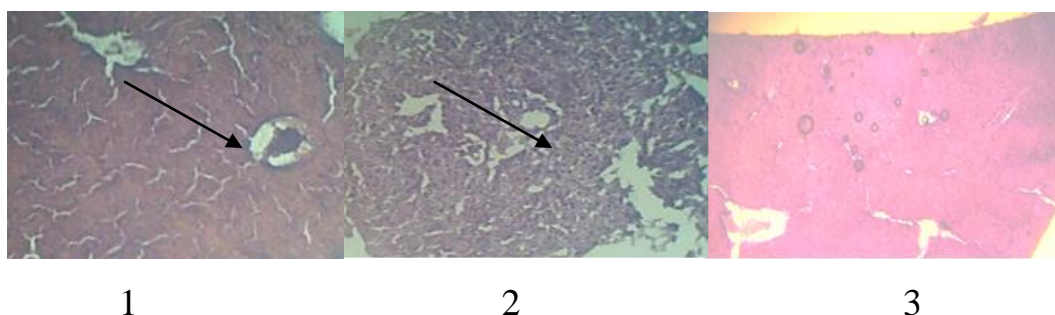


Рисунок 20 – Гистологические срезы печени после введения мышам ксилофилана ( $\times 40$ ): 1 - 0,06 г/кг; 2 - 3,0 г/кг; 3 – контроль (без ксилофилана)

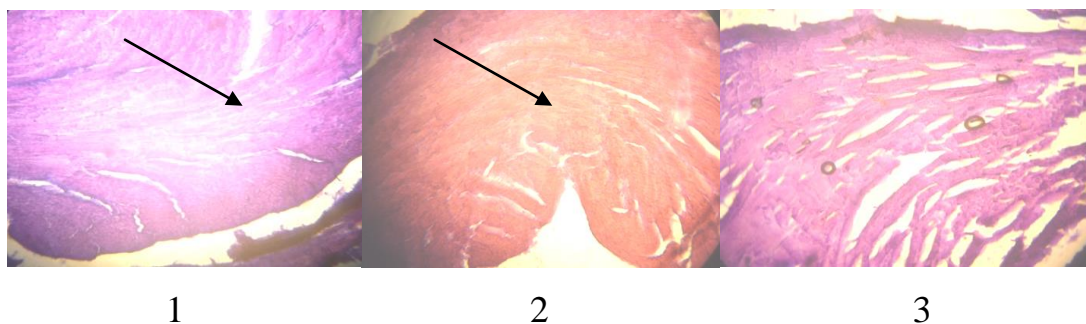


Рисунок 21 – Гистологические срезы сердца после введения мышам ксилофила (×40): 1 - 0,06 г/кг; 2 - 3,0 г/кг; 3 – контроль (без ксилофила)

В группе животных, которым вводили анцилан, поведение мышей в ходе эксперимента было угнетенным в течение 2 суток, затем постепенно приходило в норму, но иногда проявлялись признаки агрессии. При вскрытии мышей, получавших анцилан в дозе 3,0 г/кг, визуально были выявлены патологические изменения со стороны печени: орган был увеличен и неравномерно окрашен. На гистологических срезах наблюдали следующие нарушения во внутренних органах. Тканевый материал печени у мышей, получавших анцилан в дозе 3,0 г/кг, имел более бледную и неоднородную окраску по сравнению с контролем, клетки органа были более крупные по сравнению с контролем (Рисунок 22).

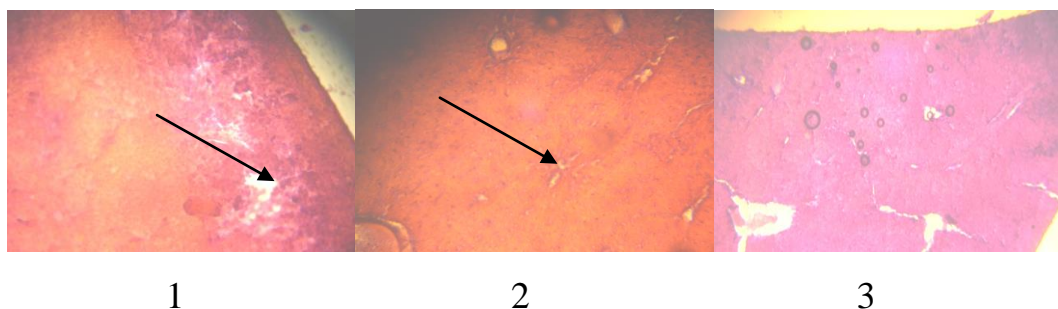


Рисунок 22 – Гистологические срезы печени после введения мышам анцилана (×40): 1 - 0,06 г/кг; 2 - 3,0 г/кг; 3 – контроль (без анцилана)

У мышей, которым вводили анцилан, стенки эндокарда сердца не просматривались, кардиомиоциты миокарда были не четкие, соединялись друг с другом не плотно, между последними располагалась интерстициальная соединительная ткань (Рисунок 23).

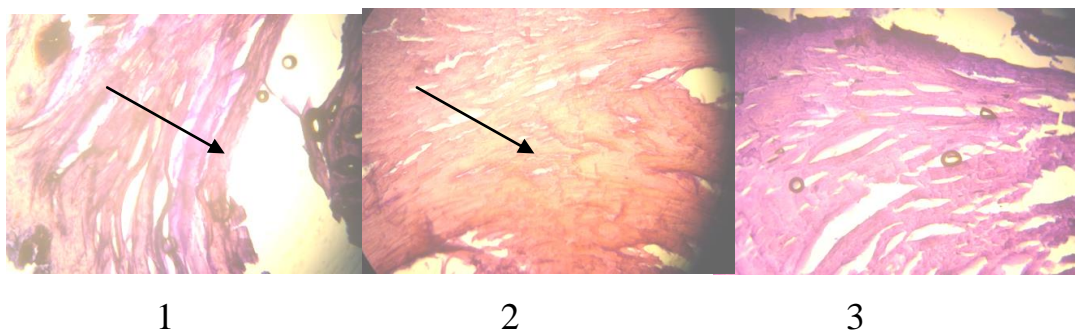


Рисунок 23 – Гистологические срезы сердца после введения мышам анцилана ( $\times 40$ ): 1 - 0,06 г/кг; 2 - 3,0 г/кг; 3 – контроль (без анцилана)

Серозная и плотная соединительнотканная белочная оболочки семенников были не четкие, стенки их были изменены, целостность извитых канальцев не просматривалась, наблюдалась их десквамация, между ними была плохо развитая интерстициальная ткань (Рисунок 24). В сердце и семенниках наблюдали воспалительный процесс (экссудат).

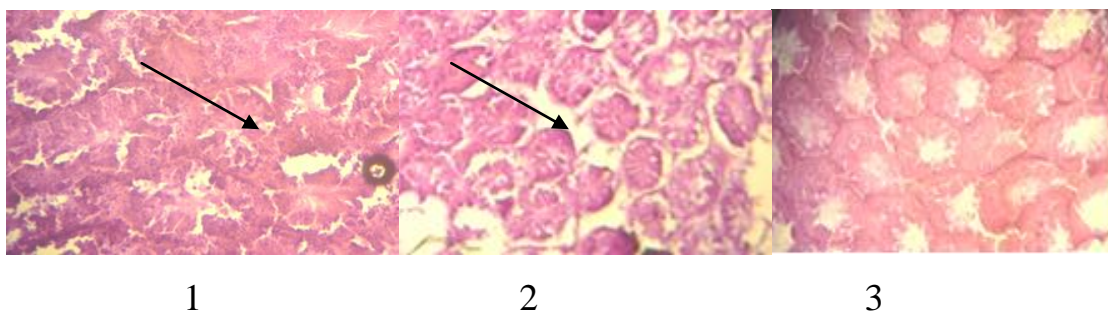
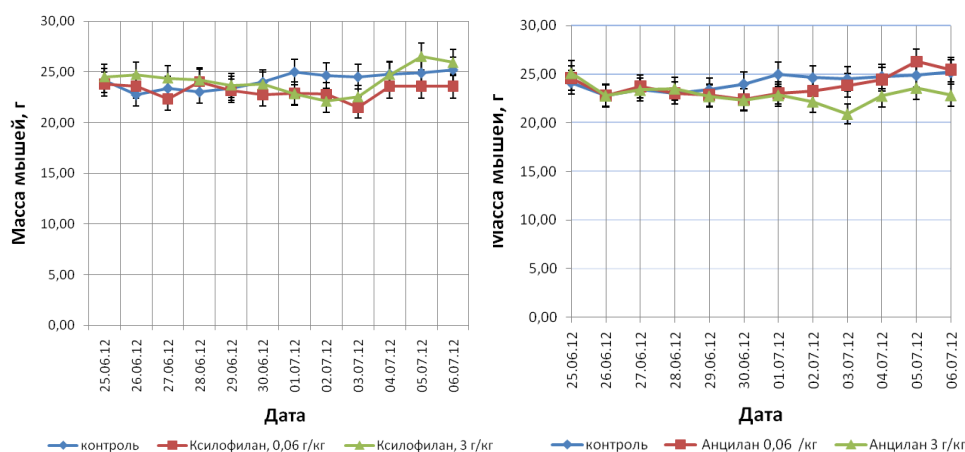


Рисунок 24 – Гистологические срезы семенников после введения мышам анцилана ( $\times 40$ ): 1 - 0,06 г/кг; 2 - 3,0 г/кг; 3 – контроль (без анцилана)

В процессе исследований не происходило увеличения массы как опытных, так и контрольных животных (Рисунок 25). Это свидетельствовало о том, что на данном временном отрезке пероральное поступление экзополисахаридов в организм животных не отразилось на их росте.



1

2

Рисунок 25 – Влияние ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 (1) и *A.abiegnus* Z-0056 (2) на массу мышей

Анализ крови показал, что у экспериментальных животных (мыши) происходило повышение содержания общего белка на 33% при введении им анцилана в дозах 0,06 г/кг и 3,0 г/кг, а при введении ксилофилана этот параметр крови не отличался от контроля (Таблица 16). Предположительно это было вызвано обезвоживанием организма [48]. Содержание билирубина возрастало на 29% при введении ксилофилана в дозе 3,0 г/кг. При введении анцилана содержание билирубина возрастало на 35% и 39% у животных, получавших ЭПС в дозах 0,06 г/кг и 3,0 г/кг соответственно.

Таблица 16 – Влияние ксилофилана и анцилана на некоторые биохимические показатели крови мышей

Характер воздействия	Показатели крови						
	Белок общ., г/л	Билирубин общ., ммоль/л	Холестерин, ммоль/л	Щелочная фосфатаза, ед/л	Натрий, ммоль/л	Креатинин, ммоль/л	
Контроль	56,2±1,4	4,3±0,3	2,4±0,4	103,5±4,4	107,2±5,2	91,6±4,4	
Ксилофилан, г/кг	0,06	59,6±0,5	5,2±0,4*	2,2±0,3	93,3±3,4	149,3±5,7*	110,1±5,6
	3,0	64,3±0,7*	6,1±0,3*	2,1±0,4	91,6±4,3	151,2±6,5*	120,4±6,5*
Анцилан, г/кг	0,06	83,6±3,7*	6,6±0,4*	4,8±0,4*	73,3±3,6*	148,3±4,4*	54,8±2,8*
	3,0	84,1±2,8*	6,9±0,3*	5,1±0,4*	71,6±2,6*	161,2±5,7*	55,1±3,7*

Примечание –  $p < 0,05$  \* - относительно контроля; \* - относительно дозы 0,06 г/кг.

У животных, получавших ксилофилан в дозе 3,0 г/кг, наблюдали повышение креатинина в крови на 24%. При введении анцилана в организм мышей уровень креатинина снижался на 40%. Активность щелочной фосфатазы снижалась у мышей, получавших анцилан в дозах 0,06 г/кг и 3,0 г/кг на



29% и 31% соответственно. У мышей, которые получали ксилофилян, активность щелочной фосфатазы не отличалась от контроля. Уровень холестерина при введении анцилана мышам в дозах 0,06 г/кг и 3,0 г/кг возрастал на 50% и 53% соответственно. У животных, которым вводили ксилофилян, уровень холестерина соответствовал норме. Во всех опытных группах наблюдали повышение содержания натрия в крови. Так, у мышей, получавших ксилофилян в дозировках 0,06 г/кг и 3,0 г/кг, содержание натрия возрастало на 28% и 29% соответственно. При введении анцилана мышам, содержание натрия возрастало на 27% для минимальной дозировки (0,06 г/кг) и на 33% для максимальной дозировки (3,0 г/кг). При введении анцилана в дозировке 3,0 г/кг содержание гемоглобина в крови снижалось на 9,5%. У животных опытных групп наблюдали уменьшение количества тромбоцитов (Таблица 17).

Таблица 17 – Влияние ксилофилана и анцилана на гематологические показатели крови мышей

Характер воздействия		Эритроциты, $10^{12}/л$	Гемоглобин, %	Лейкоциты, $10^9/л$	Гранулоциты, %	Лимфоциты, %	Моноциты, %	Тромбоциты, $10^9/л$
Контроль		8,0±0,6	126,0±4,1	7,1±0,4	12,4±1,8	82,6±3,1	5,0±0,6	538±14,2
Ксилофилян, г/кг	0,06	7,6±0,7	123,0±2,4	7,6±0,6	10,0±2,1	88,0±3,5	2,0±0,1*	453±13,7*
	3,0	7,9±0,6	121,0±3,0	8,5±0,4*	7,4±1,4	91,5±7,1	1,1±0,1*	307±12,1*
Анцилан, г/кг	0,06	7,8±0,5	121,0±3,7	8,4±0,5*	13,1±2,1	82,6±4,7	4,3±0,4*	342±12,9*
	3,0	7,6±0,4	114,0±2,6*	8,6±0,7*	13,7±2,4	82,5±3,6	3,8±0,5*	210±13,1*

Примечание –  $p < 0,05$  \* - относительно контроля; \* - относительно дозы 0,06 г/кг.

При введении ксилофилана и анцилана животным в дозировке 0,06 г/кг и 3,0 г/кг количество тромбоцитов заметно уменьшалось на 16% и 43% ,и на 36% и 61% соответственно. При введении ксилофилана наблюдали и понижение содержания моноцитов в крови на 60% при дозировке 0,06 г/кг и на 78% при дозировке 3,0 г/кг.

У всех животных опытных групп наблюдали повышение содержания белка в моче (Таблица 18), что может быть связано с нарушением водно-солевого обмена, обусловленного функциональными нарушениями почек. При введении мышам анцилана, наблюдали появление глюкозы в моче.

Таблица 18 – Влияние ксилофила и анцилана на физико-химические и биохимические показатели мочи мышей

Характер воздействия		Относительная плотность	pH	Белок, г/л	Глюкоза, ммоль/л	Уробелиноген, мкмоль/л	Билирубин, мкмоль/л
Контроль		1,01± 0,02	5,50	-	-	17,00	-
Ксилофила, г/кг	0,06	1,03± 0,04	5,00	1,00± 0,01	-	33,00*	100,00
	3,0	1,03± 0,04	5,00	1,00 ± 0,04	-	33,00*	100,00
Анцилан, г/кг	0,06	1,03± 0,04	5,00	1,00 ± 0,03	2,80	66,00*	100,00
	3,0	1,03± 0,04	5,50	3,00± 0,10	2,80	66,00*	100,00

Примечание:  $p < 0,05$  \* - относительно контроля.

Для животных, получавших ксилофила и анцилан, было характерно повышение билирубина и уробелиногена в моче. Это можно объяснить обезвоживанием организма под действием ЭПС и разрушением эритроцитов.

Неоднородную окраску печени у мышей, получавших ксилофила можно связать с разрушением эритроцитов, об этом говорит факт снижения времени лизиса эритроцитов у животных опытных групп [81]. На это указывает и тромбоцитопения (см. Таблица 17), появление билирубина в крови и моче, уробелиногена в моче у опытных животных, получавших исследуемые ЭПС (см. Таблицы 16, 18). У мышей, получавших анцилан в указанных дозах, наблюдали повышение уровня холестерина в крови, которое сопровождалось уменьшением уровня щелочной фосфатазы (см. Таблица 16). Это говорит о нарушении функции печени. По данным эксперимента, во всех опытных группах происходило повышение общего содержания белка в крови и моче, что свидетельствует об обезвоживании организма животных (см. Таблицы, 16,17). В пользу этого говорит и то, что в крови исследуемых мышей наблюдалась гипернатриемия (см. Таблица 16). Также у мышей, получавших ксилофила, повышался уровень креатинина, что в свою очередь свидетельствует о нарушениях функции печени и почек. Все описанные изменения можно связать с возможной способностью ЭПС связывать воду.

Таким образом, результаты наблюдений и гистологических исследований внутренних органов лабораторных мышей, получавших изучаемые ЭПС перорально, показывают различное влияние на показатели крови и на основные показатели белкового, углеводного, липидного, азотистого, вод-

но-солевого обменов в организме мышей. Причем, в малых дозах это влияние менее выражено.

#### **2.2.3.4. Влияние экзополисахаридов *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 на микрофлору толстого кишечника мышей**

Как известно, нормальная микрофлора желудочно-кишечного тракта выполняет ряд важнейших функций в организме, таких как межмикробный антагонизм патогенной микрофлоры, активизация иммунной системы, усиление работы желудочно-кишечного тракта, производство витаминов и других необходимых веществ для организма [102]. В силу некоторых причин нормальная микрофлора может быть нарушена, возникает дисбактериоз, что вызывает нежелательные последствия для организма. Поэтому современная медицина разрабатывает необходимые препараты, такие как инулин, лактулоза для лечения дисбактериоза, содержащие сахара. Одними из таких препаратов являются экзополисахариды бактерий. В литературе имеются сведения о влиянии некоторых бактериальных ЭПС на микрофлору кишечника животных [66, 77]. В связи с этим интересно было изучить влияние ЭПС бактерий-диссипотрофов (*X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056) на микрофлору кишечника мышей.

Исследование микрофлоры толстого кишечника проводили на самцах белых беспородных мышей со средней массой 22-25 г. Экзополисахариды *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 в дозах 0,06 г/кг и 3,0 г/кг вводили по 1 мл на животное перорально с помощью зонда. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в том же объеме. Через 3 суток после введения полисахаридов животных умерщвляли, производили забор содержимого толстого кишечника и проводили посев содержимого на чашки Петри со средами для молочнокислых бактерий (лактобакагар) и для подсчета общемикробного числа бактерий (среда КМАФАНМ). Посевы культивировали в термостате при 37 °С в течение трех суток. Далее производили подсчет колоний и определяли морфологические признаки вырос-



ших бактерий. Количество бактерий определяли методом серийных разведений [52]. Результаты опыта представлены в таблице 19.

В процессе исследования было показано, что ЭПС *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 оказывают влияние на микрофлору толстого кишечника. Так, при введении ксилофила в организм мышей в дозе 0,06 г/кг ОМЧ уменьшалось в 3,5 раз, а количество молочнокислых бактерий возрастало в 2 раза по сравнению с контролем. В дозе ксилофила 3,0 г/кг ОМЧ в толстом кишечнике мышей уменьшалось в 1,4 раз, в это же время количество молочнокислых бактерий возрастало в 40 раз. При дозе анцилана 0,06 г/кг ОМЧ уменьшалось в 3,5 раза по сравнению с контролем, а число молочнокислых бактерий увеличивалось в 4 раза (Таблица 19). При введении анцилана мышам в дозе 3,0 г/кг происходило увеличение как ОМЧ, так количества молочнокислых бактерий в 1,1 раз и 80 раз соответственно относительно контроля.

Таблица 19 – Влияние ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 на микрофлору толстого кишечника мышей

ЭПС		ОМЧ, $\times 10^{11}$	Количество молочнокислых бактерий, $\times 10^9$
Контроль		7,00±0,23	1,00±0,03
Ксилофила, г/кг	0,06	2,00±0,09*	4,00±0,09*
	3,0	5,00±0,23**	40,00±1,95**
Анцила, г/кг	0,06	2,00±0,09*	5,00±0,23*
	3,0	8,00±0,35**	80,00±3,45**

Примечание –  $p < 0,05$ : \* - относительно контроля; \*\* - относительно дозы 0,06 г/кг.

Таким образом, пероральное введение ксилофила и анцилана способствует увеличению количества молочнокислых бактерий в кишечнике мышей. Полученные данные хорошо согласуются с результатами других исследователей [27, 66, 77, 87], согласно которым, бактериальные ЭПС *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. delbrueckii* В-1596, *L. delbrueckii* В-1936, *Xanthomonas campestris* В-610/1 также увеличивали количество молочнокислых бактерий в толстом кишечнике мышей.

## Заключение

Одним из перспективных направлений современной микробиологии и биотехнологии является получение, изучение и применение микробных экзополисахаридов. В мире постоянно растет спрос на эти биополимеры, так как они находят применение в ветеринарии, пищевой промышленности, медицине, сельском хозяйстве и др. Важной задачей остается поиск новых микроорганизмов-продуцентов экзополисахаридов, подбор условий для максимальной продукции этих веществ для дальнейшего применения их в определенной отрасли.

Целью работы явилось выявление ЭПС бактерий-диссипотрофов *Xanthobacter xylophilus* Z-0055 и *Ancylobacter abiegnus* Z-0056, подбор условий культивирования для максимального выхода экзополисахаридов, а также исследование физико-химических и некоторых биологических свойств этих биополимеров.

Первоначальным этапом исследований явился подбор условий культивирования бактерий. Был изучен рост культур *X. xylophilus* Z-0055 и *A. abiegnus* Z-0056 и выход экзополисахаридов на различных средах (МС и МСО) с различным содержанием количеств азота, фосфора и источников углерода (сукцинат, оксалат, цитрат, ксилан, ксилоза) при различных режимах культивирования (температура, рН, встряхивание на шуттель-аппарате).

Нами была разработана методика выделения ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056, за основу был взят метод J. Cerning [125].

Было показано, что продукция экзополисахарида *X.xylophilus* Z-0055 при 25 °С начиналась с 20 ч и продолжалась до 50-55 часов на среде МС и до 80-85 часов на среде МСО.

Количество экзополисахарида на 100 часов роста составило  $0,1 \pm 0,01$  г/л культуральной жидкости (МС) и  $0,25 \pm 0,01$  г/л на среде МСО.

Количество ЭПС на 1 г сырых клеток составило для среды МСО 0,1 – 0,15 г, что было приблизительно в два раза меньше, чем при росте на среде МС (0,2 – 0,25 г ЭПС на г клеток).

При температуре 31 °С продукция ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 на среде

МС начиналась с 5 ч и продолжалась до 90 часов, на среде МСО с началом роста культуры и до 65-70 ч.

Количество экзополисахарида на 100 часов роста было  $0,3 \pm 0,01$  г/л культуральной жидкости (МС) и  $0,1 \pm 0,01$  г/л на среде МСО. Количество ЭПС на 1 г сырых клеток на среде МС составило 0,6 г с 1 г клеток, на среде МСО – 0,1 ЭПС с 1 г клеток.

Таким образом, на среде с меньшим количеством азота и фосфора (МС) наблюдалось образование меньшего количества клеток и увеличивалась продукция экзополисахарида на единицу биомассы.

Исследования роста культуры и продукции ЭПС бактерией *X.xylophilus* Z-0055 показали, что при недостатке питательного вещества на среде МС клетки питаются за счет собственного полисахарида, что обуславливает повторение экспоненциальной фазы роста культуры (явление диауксии). Исходя из полученных данных, можно предположить, что ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 играет роль запасного питательного вещества у своего продуцента.

При выращивании культуры *A.abiegnus* Z-0056 при температуре 25 °С на среде МС выделение ЭПС происходило с 45 до 100 часов роста культуры, а на среде МСО – с 40 до 60 ч. Количество экзополисахарида на 100 часов роста составило на среде МС  $0,2 \pm 0,01$  г/л и  $0,3 \pm 0,01$  г/л на среде МСО. На среде МС продукция составила 0,1 г ЭПС с 1 г клеток, на среде МСО – 0,2 г ЭПС с 1 г клеток.

При температуре 31 °С выделение культурой ЭПС *A.abiegnus* Z-0056 обеих средах продолжалось с 25 ч до 45 ч. Наибольшее количество экзополисахарида было  $0,030 \pm 0,001$  г/л культуральной жидкости на обеих средах. На обеих средах продукция составила 0,1 г ЭПС с 1 г клеток.

Следующим этапом исследований было выяснение влияния аэрации на рост *X.xylophilus* Z-0055, *A.abiegnus* Z-0056 и продукцию клетками ЭПС. Максимальная продукция ЭПС была получена при выращивании клеток культур с аэрацией при встряхивании со скоростью 200 об/мин на среде МСО.

Дальнейшие исследования были связаны с изучением влияния различных концентраций нитрата аммония (0,125; 0,25; 0,5 г/л) и дигидрофосфата калия (0,035; 0,07; 0,14 г/л) на рост и продукцию ЭПС культурами.

Рост культуры *X.xylophilus* Z-0055 на среде МС при добавлении различных концентраций нитрата аммония незначительно отличался друг от друга, причем максимальным ( $2,5 \cdot 10^9$  клеток/мл) он был при концентрации в среде МС 0,5 г/л. Наибольшую продукцию ЭПС (144 мг/л) наблюдали при концентрации нитрата аммония в среде 0,25 г/л. При добавлении в среду МС различных концентраций дигидрофосфата калия наилучший рост культуры *X.xylophilus* Z-0055, а также продукцию ЭПС наблюдали при концентрации 0,14 г/л.

Рост культуры *A.abiegnus* Z-0056 на среде МС при добавлении различных концентраций нитрата аммония также незначительно, как и в случае *X.xylophilus* Z-0055, отличался друг от друга, причем максимальным ( $5,0 \cdot 10^9$  клеток/мл) он был при концентрации в среде 0,25 г/л. Однако наибольшую продукцию ЭПС (140 мг/л) наблюдали при этой же концентрации нитрата аммония в среде. При добавлении в среду МС различных концентраций дигидрофосфата калия культура одинаково хорошо росла при 0,035; 0,07; 0,14 г/л. Однако продукция ЭПС была максимальной (160 мг/л) при концентрации дигидрофосфата в среде 0,14 г/л.

При культивировании *X.xylophilus* Z-0055 на средах с различными источниками углерода было обнаружено, что наилучший рост был на средах с ксиланом в концентрации 1,0 г/л и сукцинатом в концентрации 3,0 г/л. Продукция ЭПС была наибольшей на средах сукцинатом 3,0 г/л и 1,0 г/л ( $124 \pm 1,0$  мг/л и  $105 \pm 5,0$  мг/л соответственно). При культивировании *A.abiegnus* Z-0056 на средах с различными источниками углерода наблюдали, что наилучший рост был на средах с ксилозой (3,0 г/л) и сукцинатом (1,0 и 3,0 г/л). Продукция ЭПС была наибольшей на средах с сукцинатом в концентрации 1,0 г/л ( $118,00 \pm 5,9$  мг/л).

Далее было проведено определение физико-химических свойств экзополисахаридов, используя методы ионнообменной, гель-хроматографии, высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии.

Было показано, что экзополисахарид *X.xylophilus* Z-0055 состоит из двух фракций: кислой и нейтральной примерно в равном соотношении. Молекулярная масса нейтральной фракции ЭПС составила 10-20 кДа, кислой – 30-40 кДа. Нейтральная фракция состоит из глюкозы, галактозы и маннозы в соотношении 1:2:2. Кислая фракция представлена ксилозой, галактозой и глюкуроновой кислотой в соотношении 2:1:1. Динамическая вязкость 1% раствора ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 при +25 °С составляет 58 мПа·с.

ЭПС *A.abiegnus* Z-0056 состоит из одной кислой фракции. Молекулярная масса ЭПС составила 10-15 кДа. ЭПС состоит из глюкозы, маннозы, галактуроновой кислоты в соотношении 3:1:4. Отмечалось наличие следовых количеств галактозы, арабинозы и фукозы. Анализ динамической вязкости 1% раствора ЭПС *A.abiegnus* Z-0056 показал, что при +25 °С она составляет 52 мПа·с.

Дальнейшим этапом наших исследований явилось изучение биологических свойств ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056.

Для рассмотрения вопроса о биологической роли экзополисахаридов, а также с целью оценки возможности их практического применения были проведены эксперименты на биотест-объектах.

Было показано, что добавление обоих ЭПС усиливало рост бактерий сходных местообитаний (*S.mucilaginosa* Z-0071, *A.abiegnus* Z-005), а также *P.aeruginosa* 27533. На рост некоторых других микроорганизмов (*E.coli* 01, *S.aureus* 209-P, *B.cereus* 8035, *C.albicans* 230) экзополисахариды в концентрации 1 г/л влияния не оказывали.

Определение действия экзополисахаридов на инфузории показало, что оба препарата приводят к гибели инфузории *Colpoda*.

Таким образом, биологическая роль экзополисахаридов исследуемых бактерий-диссипотрофов может состоять в том, что они защищают клетки

бактерий от простейших, а также служат запасным питательным веществом для своего продуцента и других бактерий в сообществе.

Далее были проведены исследования по влиянию экзополисахаридов бактерий-диссипотрофов на организм лабораторных мышей. Выявлено, что ЭПС бактерий-диссипотрофов оказывают в разной степени влияние на все метаболические процессы у мышей.

При однократном *per os* введении ксилофилана и анцилана мышам в дозировке 3,0 г/кг визуально были выявлены патологические изменения со стороны печени (увеличенная и неравномерно окрашенная), а у мышей, получавших ксилофилан в максимальной дозировке (3,0 г/кг) – увеличение объема желчного пузыря по сравнению с контрольными животными. На гистологических срезах органов мышей, получавших ксилофилан, были обнаружены нарушения в сердце, почках и печени. У животных, получавших анцилан, на гистологических срезах наблюдали нарушения в печени, сердце и семенниках.

По результатам анализа крови, у мышей при введении им анцилана происходило повышение содержания общего белка. Возможно, это было вызвано обезвоживанием организма. У мышей, получавших ксилофилан содержание общего белка, активность щелочной фосфатазы и уровень холестерина соответствовал показателям контрольной группы. Содержание билирубина возрастало при введении анцилана и ксилофилана в дозировке 3,0 г/кг. Это явление может быть связано с лизисом эритроцитов. У животных, получавших ксилофилан в дозировке 3,0 г/кг, наблюдали повышение креатинина на 24%. При введении анцилана уровень креатинина снижался на 40%. Активность щелочной фосфатазы снижалась у групп мышей, получавших анцилан в дозировках 0,06 г/кг и 3,0 г/кг на 29% и 31% соответственно. Уровень холестерина при введении анцилана мышам в дозировках 0,06 г/кг и 3,0 г/кг возрастал на 50% и 53% соответственно. У всех животных, получавших ксилофилан и анцилан, наблюдали повышение содержания натрия в крови. При введении ксилофилана и анцилана наблюдали уменьшение количества тромбоцитов. У мышей, получавших ксилофилан,

наблюдала понижение уровня моноцитов в крови. У всех животных опытных групп наблюдали повышение белка в моче, что возможно связано с нарушением водного обмена и функции почек. У мышей, получавших анцилан, наблюдали появление глюкозы в моче. У всех животных опытных групп наблюдали повышение билирубина и уробилиногена в моче. Возможно, это связано с обезвоживанием организма под действием ЭПС и разрушением эритроцитов.

В результате исследования влияния ЭПС на микрофлору толстого кишечника мышей было обнаружено, что ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 увеличивают количество молочнокислых бактерий. Что согласуется с результатами других исследователей, изучавших влияние бактериальных ЭПС на микрофлору толстого кишечника животных [27, 66, 77, 87].

Таким образом, впервые обнаружены ЭПС у бактерий-диссипотрофов *X.xylophilus* Z-0055, *A.abiegnus* Z-0056 и подобраны условия их получения. Изучены физико-химические и биологические свойства данных ЭПС.

## Выводы

1. Впервые обнаружена способность *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 к продукции ЭПС; подобраны оптимальные условия культивирования (среда МС, 31 °С, рН=5,5; 100 ч – *X.xylophilus* Z-0055 и среда МСО, 25 °С, рН=5,5; 100 ч – *A.abiegnus* Z-0056) для обеспечения максимального продуцирования ими экзополисахаридов в лабораторных условиях.

2. Впервые выделены, очищены и охарактеризованы экзополисахариды *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056. Установлено, что ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 представлен нейтральной и кислой фракциями в равном соотношении с молекулярными массами 10-20 кДа и 30-40 кДа соответственно и с разным моносахаридным составом: нейтральная фракция состоит из глюкозы, галактозы и маннозы в соотношении - 1:2:2; кислая фракция – из ксилозы, галактозы и глюкуроновой ксилоты в соотношении 2:1:1; 1% раствор ЭПС при +25 °С обладает динамической вязкостью 58 мПа·с. ЭПС *A.abiegnus* Z-0056 представлен кислой фракцией, обладает молекулярной массой 10-20 кДа и состоит из глюкозы, маннозы, галактуроновой кислоты в соотношении 1:2:2; 1% раствор ЭПС при +25 °С обладает динамической вязкостью 52 мПа·с.

3. Показано, что ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 оказывают положительное влияние на рост бактерий их естественного местообитания в концентрации 1,0 г/л и на *P.aeruginosa* 27533 в концентрациях 0,25 г/л; 0,5 г/л; 1,0 г/л.

4. Обнаружено, что ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 в концентрации 1,0 г/л оказывают токсичное действие на инфузории *C.stenii*.

5. Показано, что в дозах 0,06 г/кг и 3,0 г/кг ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 оказывают различное влияние на основные показатели белкового, углеводного, липидного, азотистого, водно-солевого обмена в организме мышей.

6. Установлено, что введение per os ЭПС *X.xylophilus* Z-0055 и *A.abiegnus* Z-0056 способствует увеличению количества молочнокислых бактерий в толстом кишечнике экспериментальных животных (мышей) в дозе 0,06 г/кг в 4 и 5 раз, а в дозе 3,0 г/кг – в 40 и 80 раз соответственно.



**Список сокращений и условных обозначений**

ВПС – внеклеточные полисахариды

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ПС – полисахариды

РГЗТ – реакция гиперчувствительности замедленного типа

РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»

ТСХ – тонкослойная хроматография

ЭПС – экзополисахариды

НК – нормальные киллеры

### Список литературы

1. Аркадьева, Г.Е. Биологическая активность некоторых микробных полисахаридов: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07 / Аркадьева Галина Евгеньевна. – Ленинград, 1974. – 275 с.
2. Артамонова, М.В. Разработка технологии желированной продукции с использованием микробных полисахаридов: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.16 / Артамонова Майя Владимировна. – Харьков, 2000. – 289 с.
3. А.с. 1522750 СССР, МКЛ С 12 Р 19/04. Способ получения экзополисахарида / Т.П. Пирог [и др.] (СССР). – № 4434462/13; заявл. 30.05.88; опубл. 23.04.92, Бюл. № 15. – 8 с.
4. Афонская, С.В. Профилактическое действие экстрацеллюлярных полисахаридов некоторых видов рода *Bacillus* при стафилококковой инфекции / С.В. Афонская, Э.Л. Колесова // Тез. докл. V Съезда Укр. микробиол. о-ва. – Киев: Наукова думка, 1980. – С. 156.
5. Бакаева, М.Д. Новый штамм бактерий *Paenibacillus* sp. ИБ-1 – продуцент экзополисахарида и биологически активных веществ с фитогормональной и антигрибной активностью / М.Д. Бакаева, С.П. Четвериков, Т.Ю. Коршунова, и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2017. – Т. 53, № 2. – С. 204 – 212.
6. Басс-Шадхан, Х.Ф. Зимозан: методы получения. Биохимическая характеристика и перспективы применения / Х.Ф. Басс-Шадхан. – Рига: Зинатне, 1970. – 313 с.
7. Башенина, Н.В. Руководство по содержанию и разведению новых в лабораторной практике видов мелких грызунов / Н.В. Башенина. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1975. – 166 с.
8. Беседнова, Н.Н. Иммуотропные свойства 1→3; 1→6-β-D-глюканов / Н.Н. Беседнова, Л.А. Иванушко, Т.Н. Звягинцева [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – № 2. – С. 37 – 44.
9. Биккузина, Р. К. Приживаемость микроорганизмов биопрепаратов «Азолен» и «Елена» на зерне, нанесенных при помощи бактериальных экзополисахаридов / Р.К. Биккузина, Л.Ф. Миннебаев, С.П. Четвериков, и др. // Мате-

риалы IX Всероссийской научной интернет-конференции. – 2015. Уфа: Издательство УГНТУ. – С. 96.

10. Богуцкий, М.И. Применение пирогенала в комплексной терапии больных вирусным гепатитом / М.И. Богуцкий // Здоровоохранение Белоруссии. – 1978. – № 5. – С. 58 – 60.

11. Бойко, А.С. Особенности структуры О-полисахаридов азоспирилл серогруппы I / А.С. Бойко, О.Н. Смолькина, Ю.П. Федоненко [и др.] // Микробиология – 2010. – №. 79 (2). – С. 219 – 227.

12. Булавин, В.Д. Технологический комплекс для интенсификации добычи нефти и увеличения нефтеотдачи на основе отечественного биополимера / В.Д. Булавин, Н.В. Краснопевцева // Нефтяное Хозяйство. – 2002. – № 4. – С. 6 – 7.

13. Булдаков, А.С. Пищевые добавки: Справочник / А.С. Булдаков. – СПб.: Ut, 1996. – 240 с.

14. Бухарова, Е.Н. Экзополисахарид *Paenibacillus polymyxa* 88А: получение, характеристика и перспектива использования в хлебопекарной промышленности: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Бухарова Екатерина Николаевна. – Саратов, 2004. – 189 с.

15. Васильев, И.К. Опыт применения препарата «Сальмозан» при лечении мелких домашних животных / И.К. Васильев // Ветеринария Кубани. – 2007. – № 2. – С. 58 – 60.

16. Васильев, Н.В. Биохимия и иммунология микробных полисахаридов / Н.В. Васильев, Н.Б. Луцюк, Г.К. Палий [и др.]. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1984. – 304 с.

17. Васильева, Л.В. Диссипотрофы в микробном сообществе / Л.В. Васильева, Г.А. Заварзин // Микробиология. – 1995. – Т. 64. – С. 239 – 244.

18. Варбанец, Л.Д. Методы исследования эндотоксинов / Л.Д. Варбанец, Г.М. Здоровенко, Ю.А. Книрель // Киев: Наукова Думка. – 2006. – 234 с.

19. Войнов, Н.А. Улучшение экологичности и степени эффективности биохимических производств / Н.А. Войнов, Р.А. Степень, С.М. Воронин // Химия растительного сырья. – 1998. – № 1. – С. 33 – 43.

20. Воробьев, В.Я. Теория и эксперимент / В.Я. Воробьев, А.И. Елсуков // Минск: Высшая школа, 1989. – 109 с.
21. Вудсайд, Е. Полисахариды микроорганизмов / Е. Вудсайд, Е. Кваринский. – М.: Высшая школа, 1977. – 26 с.
22. Гвоздяк, Р.И. Микробный полисахарид ксантан / Р.И. Гвоздяк, М.С. Матышевская. – Киев: Наукова думка, 1989. – 195 с.
23. Горин, С.Е. Перспективы изучения внеклеточных полисахаридов дрожжей / С.Е. Горин, А.Ф. Свиридов, И.П. Бабьева // Микробные метаболиты. – М.: Наука, 1979. – 347 с.
24. ГОСТ 13496.7–97. Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности. – Введ. 2000-11-01. – М.: ИПК Изд-во стандартов, 2002. – 15 с.
25. Гринберг, Т.А. Микробный синтез экзополисахаридов на C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> – соединениях / Т.А. Гринберг, Т.П. Пирог, Ю.Р. Малашенко. – Киев: Наукова думка, 1992. – 211 с.
26. Гриневич, Ю.А. Иммунология и иммунотерапия опухолей молочной железы / Ю.А. Гриневич, Л.Я. Каменец, Б.Т. Билынский [и др.]. – Киев: Здоровье, 1990. – 183 с.
27. Денисова, М.Н. Изучение влияния экзополисахарида *Xanthomonas campestris* на организм лабораторных животных / М.Н. Денисова, Г.Е. Рысмухамбетова, Е.Н.Бухарова [и др.] // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве. Материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов: КУБиК, 2013. – С. 184.
28. Джемухадзе, Н.К. Применение аэрозолей продигиозана и метацила для стимуляции активности легочных макрофгов в эксперименте / Н.К. Джемухадзе, С.И. Эйделытейн, А.И. Брауде // Антибиотики. – 1969. – Т. 14, №. 11. – С. 1030 – 1034.
29. Доронина, Н.В. *Vlactobacter aminooxidans* новый вид бактерии, растущей автотрофно на метилированных аминах / Н.В. Доронина, Н.И. Говорухина, Ю.А. Троценко // Микробиология. – 1984. – № 52. – С. 547–553.

30. Дробот, В.И. Влияние микробных экзополисахаридов на структурно-механические свойства теста / В.И. Дробот, Т.А. Гринберг // Тезисы докладов 3-го симпозиума соцстран по биотехнологии. – Братислава, 1983. – С. 5 – 6.
31. Дятлова, К.Д. Микробные препараты в растениеводстве / К.Д. Дятлова // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – №5. – С. 17 – 22.
32. Елинов, Н. П. Некоторые микробные полисахариды и их практическое применение / Н.П. Елинов // Успехи микробиологии. – М.: Наука, 1982. – С. 158 – 177.
33. Елинов, Н.П. Химия микробных полисахаридов / Н.П. Елинов. – М.: Высшая школа, 1984. – 156 с.
34. Ермольева, З.В. Стимуляция неспецифической резистентности организма и бактериальные полисахариды / З.В. Ермольева, Г.Е. Вайсберг. – М.: Медицина, 1976. – 184 с.
35. Заварзин, Г.А. Ксилотрофы и микофильные бактерии при образовании дистрофных вод / Г.А. Заварзин, А.Г. Заварзина // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 5. – С. 579 – 592.
36. Заварзин, Г.А. Омброфилы – обитатели равнин / Г.А. Заварзин // Природа. – 2009. – № 6. – С. 3 – 14.
37. Заварзин, Г.А. Почва как главный источник углекислоты и резервуар органического углерода на территории России / Г.А. Заварзин, В.Н. Кудяров // Вестник Российской академии наук. – 2006. – Т. 76, № 1. – С. 14 – 24.
38. Заднова, С. П. Роль внеклеточного экзополисахарида в адаптации возбудителя холеры во внешней среде / С.П. Заднова, Н.И. Смирнова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – №. 105. – С. 13 – 19.
39. Зайчикова, М.В. *Xanthobacter xylophilus* sp. nov. – представитель ксилотрофного мико-бактериального сообщества ультрапресных вод / М.В. Зайчикова, Ю.Ю. Берестовская, В.Н. Акимов [и др.] // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 1. – С. 89 – 95.
40. Зайчикова, М.В. *Ancylobacter abiegnus* sp. nov. – олиготрофный представитель мико-бактериального сообщества / М.В. Зайчикова, Ю.Ю. Бере-

- стовская, В.Н. Акимов [и др.] // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 4. – С. 483 – 490.
41. Зайчикова, М.В. Диссипотрофные бактерии ксилотрофного сообщества в пресноводных экосистемах: дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03 / Зайчикова Марина Викторовна. – Москва, 2011. – 118 с.
42. Захарова, И.Я. Методы изучения микробных полисахаридов / И.Я. Захарова, Л.В. Косенко. – Киев: Наукова думка, 1982. – 192 с.
43. Карпенко, Е.В. Оптимизация биосинтеза сурфактантов и экзополисахаридов штаммом *Gordonia rubripertinct* А УКМ АС-122 с использованием математических методов / Е.В. Карпенко, М.В. Пристай, Г.В. Гафийчук [и др.] // *Biotechnologia Acta*. – 2011. – Т. 4, № 5. – С. 39 – 44.
44. Карпунина, Л.В. Бактерицидные свойства лектинов азотфиксирующих бацилл / Л.В. Карпунина, У.Ю. Мельникова, Ю.В. Сулова [и др.] // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 3. – С. 343–347.
45. Кесарева, Е.А. Клиническая интерпретация биохимических показателей сыворотки крови собак и кошек / Е.А. Кесарева, В.Н. Денисенко. – М.: КолосС, 2011. – 28 с.
46. Киндзельский, Л.П. Терапевтический эффект при комплексном воздействии пирогенала и облучения на саркому 45 крыс / Л.П. Киндзельский, В.В. Арунгазыева // Вопросы онкологии. – 1978. – Т. 24, № 1. – С. 34 – 38.
47. Козак, Н.И. Микробный полисахарид ксантан / Н.И. Козак // Полимеры – Деньги. – 2006. – № 15. – С. 30 – 32.
48. Козловская, Л.В. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования /Л.В. Козловская. – М.: Медицина, 1984. – С.166 – 206.
49. Конон, А.Д. Микробные поверхностно-активные вещества. Гликолипиды / А.Д. Конон, Т.П. Пирог // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – Т. 7, № 1. – С. 9 – 30.
50. Кочетков, Н.К. Синтез полисахаридов / Н.К. Кочетков. – М.: Наука, 1994. – 217 с.

51. Кудеяров, В.Н. Пулы и потоки углерода в наземных экосистемах России / В.Н. Кудеяров, Г.А. Заварзин, С.А. Благодатский [и др.]. – М.: Наука, 2007. – 315 с.
52. Лабинская, А.С. Руководство по медицинской микробиологии. Общая санитарная микробиология. Книга 1. / А.С. Лабинская, Е.Г. Волина. – М.: БИНОМ. – 1080 с.
53. Логинов, Я.О. Экзополисахариды бактерий родов *Azotobacter*, *Pseudomonas* и *Bacillus* для создания биофунгицидов пролонгированного действия. / Я.О. Логинов, Г.Г. Худайгулов, С.П. Четвериков [и др.] // Аграрная Россия. Специальный выпуск. – 2009. – С.125.
54. Логинов, Я.О. Биополимер альгинатной природы с преобладанием L-гулуруновой кислоты / Я.О. Логинов, Г.Г.Худайгулов, С.П. Четвериков [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 3. – С. 343 – 347.
55. Логинова, Н.В. Автотрофный метаболизм метанола у *Blastobacter viscosus* / Н.В. Логинова, Н.И. Говорухина, Ю.А. Троценко // Микробиология. – 1982. – Т. 50. – С. 428 – 434.
56. Лорие, Ю.И. Использование пирогенала для оценки гранулоцитарного резерва костного мозга / Ю.И. Лорие, Е.А. Соловьева, Г.Д. Левина // Вопросы Онкологии. – 1968. – Т. 14, №. 2. – С. 45 – 49.
57. Мальцева, Н.Н. Экзополисахариды олигонитрофильных бактерий как фактор, обуславливающий образование микробных сообществ почвы / Н.Н. Мальцева. – Киев: Наукова думка, 1981. – 242 с.
58. Малютенкова, С.М. Товароведение и экспертиза кондитерских товаров / С.М. Малютенкова. – СПб.: Питер, 2004. – 480 с.
59. Матора, А.В. Бактериальный полисахарид полимиксан 88А. Основные характеристики и сферы возможного применения / А.В. Матора, Е.Н. Игнатова, Д.А. Жемеричкин [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 1992. – Т. 28, № 5. – С. 731–737.

60. Матора, А.В. Получение и исследование промышленно-важных штаммов-продуцентов экзополисахаридов: дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03 / Матора Александр Владимирович. – Саратов, 1993. – 172 с.
61. Мелентьев, А.И. Уникальный природный штамм *Paenibacillus ehimensis* IB-739 /А.И. Мелентьев, О.Н. Логинов, Т.Ф. Бойко [и др.] // Молекулярно-генетические и биотехнологические основы получения и применения синтетических и природных биологически активных веществ (Нарочанские чтения - 11): материалы Международной научно-практической конференции. Минск – Ставрополь: Белорусский государственный университет, Северо-Кавказский федеральный университет, 2017. – С. 58 – 63.
62. Меркулов, Г.А. Курс патологогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л.: Медгиз., 1956. – С. 263.
63. Навашин, С.М. Влияние некоторых микробных полисахаридов на перевиваемые опухоли животных / С.М. Навашин, И.П. Фомина, Т.Г. Терентьева // Вестник АМН СССР. – 1964. – Т. 158, №. 4.– С. 981.
64. Наумов, Г.Н. Разработка технологии получения микробных полисахаридов технического, пищевого и медицинского назначения / Г.Н. Наумов, В.И. Дмитриев, А.Г. Пенкин // Материалы Второго съезда Общества биотехнологов России, 13 – 15 октября 2004. – М.: МАКС Пресс, 2004. – С.93 – 94.
65. Никитина, Е.В. Биобезопасность модифицированных крахмалов в мясопродуктах / Е.В. Никитина, В.Я. Пономарев, Л.З. Гарифзянова // Биология – наука XXI века: Тезисы 10 – й Международной Пущинской школы – конференции молодых ученых, посвященной 50-летию Пущинского научного центра РАН, 17 – 21 апреля 2006. – Пущино, 2006. – С. 386.
66. Нурмухамедов, А.В. Влияние экзополисахаридов молочнокислых бактерий на микрофлору толстого отдела кишечника мышей / А.В. Нурмухамедов, М.И. Правдивцева, Н.А.Фокина [и др.] // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И Вавилова. – 2010. – №12. – С. 29 – 32.
67. Оводов, Ю.С. Строение К-антигенов бактерий / Ю.С. Оводов // Биохимия. – 2006. – № 71. – С. 1155 – 1174.



68. Остерман, Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1985. – 536 с.
69. Пат. 2053689 Российская Федерация, МПК 6 А 23 L 1/06. Студневая основа кондитерских изделий / В.Г. Артюхов, В.В. Игнатов, Е.В. Карманова [и др.]; заявитель Научно-исследовательский проектно-технологический институт сельскохозяйственной биотехнологии; патентообладатель Поволжский научно-исследовательский институт животноводства и биотехнологии; № 5043398/13; заявл. 26.05.92; опубл. 10.02.96, Бюл. № 4. – 3 с.
70. Пат. 2168334 Российская Федерация, А61К31/739, А61К35/66. Способ получения пирогенала / Т.П. Малофеева; В.А. Колесникова; П.З. Будницкая; патентообладатель: Предприятие по производству бакпрепаратов научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. – № 2000102786/14; заявл. 08.02.2000; опубл. 10.06.2001, Бюл. № 6. – 7 с.
71. Пат. 2252033 Российская Федерация, МПК А 61 К 47/36. Способ получения ксантанового загустителя "Сараксан" или "Сараксан – Т" / А.К. Ватолин, В.М. Грошев, В.В. Дерябин [и др.]; патентообладатель Научно – производственный реабилитационный центр «Ресхил». – № 2004111692/15; заявл. 19.04.2004; опубл. 20.05.05, Бюл. № 14. – 8 с.
72. Пирог, Т.П. Образование и физико-химические характеристики экзополисахаридов некоторых бактерий рода *Bacillus* / Т.П. Пирог, А.Т. Слабоспицкая, С.К. Воцелко [и др.] // Микробиологический журнал. – 1985. – Т. 47, № 6. – С. 27 – 32.
73. Пирог, Т. П. Защитные функции экзополисахаридов, синтезируемых бактериями *Acinetobacter* sp. / Т.П.Пирог, Т.А. Гринберг, Ю.Р. Малашенко // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 3. – С. 335 – 340.
74. Пирог, Т.П. Получение и исследование мутантных штаммов *Acinetobacter* sp., не образующих экзополисахариды. / Т.П. Пирог, С.М. Столяр, Ю. Р. Малашенко [и др.] // Микробиология. – 2000. – Т. 69, № 5. – С. 674 – 680.

75. Пирог, Т.П. Этаполан – микробный экзополисахарид мультифункционального применения / Т.П. Пирог, Ю.В. Корж // Биополимеры и клетка. – 2006. – Т. 22, № 3. – С. 171.
76. Полукаров, Е.В. Выделение экзополисахаридов *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* при различных условиях культивирования / Е.В Полукаров., Л.В. Карпунина, Д.А. Жемеричкин // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2009. – № 4. – С. 20 – 23.
77. Правдивцева, М.И. Влияние лаксарана Z на микрофлору толстого отдела кишечника самок крыс в условиях иммобилизационного стресса / М.И. Правдивцева, Л.В. Карпунина, А.В. Нурмухамедов [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2009. – № 8. – С. 101 – 101.
78. Правдивцева, М.И. Фунгицидные свойства гелей, созданных на основе экзополисахаридов бактерий рода *Lactobacillus* / М.И. Правдивцева, Л.В. Карпунина, Е.В. Полукаров //Современные наукоемкие технологии. – 2009. – № 10. – 74 с.
79. Правдивцева, М.И. Оценка влияния экзополисахаридов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* на фагоцитарную активность макрофагов белых мышей / М.И. Правдивцева, Е.А. Горельникова, О.В. Абросимова [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – № 13. – С. 1 – 5.
80. Правдивцева, М.И. Характеристика биологической активности экзополисахаридов бактерий рода *Lactobacillus* и перспективы их использования : дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Правдивцева Мария Ивановна – Саратов, 2012. – 136 с.
81. Проскурякова, М.В. Влияние бактериальных экзополисахаридов на кислотно-резистентность эритроцитов белых мышей / М.В. Проскурякова, М.Д. Сметанина, Е.Н. Бухарова [и др.] // Научное обозрение. – 2015 – № 5. – С. 24 – 29.
82. Растунова, Г.А. Прогидрозан как активатор перитонеальных макрофагов / Г.А. Растунова //Антибиотики. – 1981. – № 6. – С. 524 – 544.

83. Рипачек, В. Биология древоразрушающих грибов / В. Рипачек. – М.: Лесная промышленность, 1967. – С. 10 – 70.
84. Розе, Л.В. Биологические свойства левана / Л.В. Розе, Г.К. Закенфельд, М.Г. Лайвениекс [и др.] // Известия АН Латв ССР. –1990. – Т. 2. – С. 56 – 64.
85. Рысмухамбетова, Г.Е. Выделение и очистка экзополисахаридов из ксантомонад / Г.Е. Рысмухамбетова, Л.В. Карпунина, Е.Н. Бухарова [и др.] // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2008. – № 4. – С. 42 – 45.
86. Рысмухамбетова, Г.Е. Экзополисахариды ксантомонад и клебсиелл: физико-химические, биологические свойства и перспективы применения: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Рысмухамбетова Гульсара Есенгильдиевна – Саратов, 2009.– 151 с.
87. Рысмухамбетова, Г.Е. Влияние бактериальных экзополисахаридов на организм животных / Г.Е. Рысмухамбетова, Е.Н. Бухарова, И.В. Суровцова [и др.] // Современные наукоемкие технологии. – 2009. – № 10. – 68 с.
88. Самохвалова, О.В. Разработка научно обоснованной технологии булочных изделий с использованием экзополисахарида ксантан: дис.: ... канд. тех. наук: 05.18.16 / Самохвалова Ольга Владимировна. – Харьков, 1990.– 264 с.
89. Санин, А.В. Усиление регенерации гемопоэза и изменения в кроветворной системе мышей под действием бактериального полисахарида сальмозана / А.В. Санин, Т.А. Краснянская, Е.Б. Мысякин [и др.] // Иммунология. – 1988. – № 1.– С. 54 – 58.
90. Санин, А.В. Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных / А.В. Санин // Российский журнал ветеринарной медицины. – 2005.– № 1. – С. 4 – 9.
91. Смолькина, О.Н. Капсульный полисахарид бактерии *Azospirillum lipoferum* Sp59b. Структура и антигенная специфичность / О.Н. Смолькина, В.В. Качала, Ю.П. Федоненко [и др.] // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 5. – С. 707 – 716.

92. Соболев, К.А. Исследование биополимеров в качестве реагентов для нефтедобычи: дис. ...канд. техн. наук: 02.00.11 / Соболев Константин Александрович. – Москва, 2005. – 146 с.
93. Степаненко, Б. Н. Химия и биохимия углеводов / Б.Н. Степаненко. – М.: Высшая школа, 1978. – 380 с.
94. Степанова, Н.Д. Бактериальный экзополисахарид леван, используемый в пищевой промышленности в качестве фиксатора цвета и флейвора, загустителя и стабилизатора: биосинтез, физиологические функции, продуцирование микроорганизмами / Н.Д. Степанова // Пищевая и перерабатывающая промышленность. Реферативный журнал. – 2007. – № 2. – 586 с.
95. Терехова, В.А. Микромицеты в экологической оценке водных и наземных экосистем / В.А. Терехова. – М.: Наука, 2007. – 215 с.
96. Тихомирова, О.М. Полисахариды клеток *Cryptococcus laurentii* (*kaufferath*) *skinner* – продуцента внеклеточного гетерогликана / О.М. Тихомирова, Г.А. Витовская, И.А. Синицкая // Микробиология. – 1998. – Т. 67, № 1. – С. 73 – 78.
97. Троценко, Ю.А. Аэробные метилотрофы-перспективные объекты современной биотехнологии / Ю.А. Троценко, М.Л. Торгонская // Журнал Сибирского Федерального университета. Биология. – 2012. – № 5. – С. 243 – 279.
98. Учитель, И.Я. Пирогенал / И.Я. Учитель, Э.Л. Хасман. – М.: Медицина, 1965. – 78 с.
99. Федорова, Л.Г. Экзогликаны базидиомицетовых дрожжей как иммуномодуляторы: дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / Федорова Лидия Геннадьевна. – Санкт Петербург, 1999. – 163 с.
100. Хотимченко, Ю.С. Фармакология некрахмальных полисахаридов / Ю.С. Хотимченко, И.М. Ермак, А.Е. Бедняк [и др.] // Вестник ДВО РАН. – 2005. – № 1. – С. 72 – 82.
101. Худайгулов, Г. Г. Экзополисахарид альгинатного типа *Paenibacillus ehimensis* 739 / Г.Г. Худайгулов, О.Н. Логинов, А.И. Мелентьев // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т.13, №5(3). – С. 214 – 217.

102. Шендеров, Б.А. Нормальная микрофлора и ее роль в поддержании здоровья человека / Б.А. Шендеров // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1998. – Т. 1. – С. 61 – 65.
103. Шишкова, Ю.С. Влияние препарата «Пирогенал» на образование нейтрофильных внеклеточных ловушек / Ю.С. Шишкова, А.Ю. Савочкина, А.И. Рыжкова [и др.] // Медицинская наука и образование Урала. – 2009. – № 3. – С. 23 – 25.
104. Щерба, В.Л. Полисахарид ксилотрофных базидиомицетов / В.Л. Щерба, В.Г. Бабицкая // Прикладная биохимия и микробиология – 2008. – Т. 44, № 1. – С. 90 – 95.
105. Abdel-Fattah, A.M. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* / A.M. Abdel-Fattah, A.M. Gamal-Eldeen,; W.A. Helmy [et al.] // Carbohydrat Polymers. – 2012. – V. 89, P. 314 – 322.
106. Abid, Y. Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria / Y. Abid, A. Casillo, H. Gharsallah [et al.] // International Journal Biological Macromolecules. – 2018. – V. 108. – P. 719 – 728.
107. Anastassiou, E.D. Alginate production by clinical nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains / E.D. Anastassiou, A.C. Mintzas, C. Kounavis [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 1987. – V. 25, N. 4. – P. 656 – 659.
108. Anastassiou, E.D. Nonfatal bacteria caused by mucoid, alginate production strain of *Pseudomonas aeruginosa* / E.D. Anastassiou, C. Frangides, G. Dimitracopoulos // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 1986. – N. 5. – P. 277 – 283.
109. Andhare, P. Microbial exopolysaccharides: advances in applications and future prospects / P. Andhare, K. Chauhan, M. Dave [et al.] // Biotechnology. – 2014. – V. 3. – P. 1–25.
110. Arena, A. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* / A. Arena, T.L. Maugeri,

- B. Pavone [*et al.*] // *International Immunopharmacology*. – 2006 – V. 6. – P. 8 – 13.
111. Arena, A. An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3–72: Antiviral activity on immunocompetent cells / A. Arena, C. Gugliandolo, G. Stassi [*et al.*] // *Immunological Letter*. – 2009.– V. 123. – P. 132 – 137.
112. Aspinall, G. O. The polysaccharides / G.O. Aspinall . – N. Y.: Academic Press, 2014. – P. 518.
113. Bach, H. Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals / H. Bach, D.L. Gutnick // *Handbook of carbohydrate engineering*. – N.W.: Taylor & Francis Group LLC, 2005. – P. 507 – 534.
114. Bamford, N. C. Adhesive Bacterial Exopolysaccharides // *Biological Adhesives* / N.C. Bamford, P.L. Howell. – N. Y.: Springer International Publishing, 2016. – P. 1 – 24.
115. Betlach, M.R. Genetically engineered polymers: manipulation of xanthan biosynthesis / M.R. Betlach, M.A. Capage, D.H. Doherty [*et al.*] // *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure. Property Relations and Applications*. – Elsevier: Progress Biotechnology, 1987. – N. 3. – P. 35.
116. Bradford, M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – V.72, N.1. – P. 248 – 254.
117. Braley-Mullen, H. Induction of experimental autoimmune thyroiditis in mice with in vitro activated splenic T-cells / M. Johnson, G.C. Sharp, M. Kyriakos // *Cellular Immunology*. – 1985. – V.63, N.1. – P. 177 – 187.
118. Brummer, Y. Detection and determination of polysaccharides in foods / Y. Brummer, S.W. Cui // *Food polysaccharides and their Applications*. – N.W.: Taylor & Francis Group, LLC, 2006. – P. 675 – 712.
119. Budd, P. M. Preliminary ultracentrifuge studies of the polyelectrolyte behaviour of Welan gum / P.M. Budd // *Progress in Colloid and Polymer Science*. – 1995. – V. 99. – P. 39 – 44.

120. Burchard, W. Light scattering from polysaccharides / W. Burchard // Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. – N.Y.: Marcel Dekker, 2005. – P. 189 – 236.
121. Cambon-Bonavita, M.-A. A novel polymer produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid/ M.-A Cambon-Bonavita, G. Raguenes, J. Jean [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2002. –V. 93. – P. 310 – 315.
122. Carrion, O. New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1/ O. Carrión, L. Delgado, E. Mercade // Carbohydrate polymers. – 2015. – V.117. – P. 1028 – 1034.
123. Carillo, S. A unique capsular polysaccharide structure from the psychrophilic marine bacterium *Colwellia psychrerythraea* 34H that mimics antifreeze (glyco) proteins/ S. Carillo, A. Casillo, G. Pieretti [et al.] //Journal of the American Chemical Society, – 2015. – V. 137, N. 1 – P. 179 – 189.
124. Carlfors, J. Rheological evaluation of Gelrite in situ gels for ophthalmic use / J. Carlfors, K. Edsman, R. Petersson [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1998. – V. 6, N. 2 – P. 113 – 119.
125. Cerning, J. Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques / J. Cerning, I.H. Roissart, F.M. Luquet // Bactéries Lactiques, Grenoble, France. – 1994. – P. 309 – 329.
126. Ciszek-Lenda, M. Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KL37. Effects on the production of inflammatory mediators by mouse macrophages / M. Ciszek-Lenda, B.Nowak, M. Śróttek [et al.] //International journal of experimental pathology. – 2011. – V. 92, N. 6. – P. 382 – 391.
127. Chabot, S. Exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-g in mouse splenocytes / S. Chabot, H.L.Yu, L. De Léséleuc [et al.] // Lait. – 2001. – V. 81, N. 6. – P. 683 – 697.
128. Chen, W. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Formes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro / W. Chen, Z.

- Zhao, S.F. Chen [*et al.*] // *Bioresource Technology*. – 2008. – N. 99(8). – P. 3187 – 3194.
129. Chen, Y.T. Antitumor activity of bacterial exopolysaccharides from the endophyte *Bacillus amyloliquefaciens* sp. isolated from *Ophiopogon japonicus* / Y.T. Chen, Q.Yuan, L.T. Shan [*et al.*] // *Oncology letters*. – 2013. – V. 5, N. 6. – P. 1787 – 1792.
130. Cheng, H. N. Biotransformation of polysaccharides / H.N. Cheng, Q.- M. Gu // *Glycochemistry. Principles, synthesis and applications*. – N.Y., 2001. – P. 567 – 579.
131. Christmas, N.A. Genomic mechanisms for cold tolerance and production of exopolysaccharides in the Arctic cyanobacterium *Phormidesmis priestleyi* BC1401 / N.A. Christmas, G. Barker, A.M. Anesio [*et al.*] // *BMC genomics*. – 2016. – V.17, N. 1. – P. 533.
132. Chun, H.Y. Comparisons of physical properties of bacterial cellulose produced in different culture conditions using saccharified food wastes / H.Y. Chun, S.H. Moon, S.J. Kim // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. – 2006. – V.11. – P. 26 – 31.
133. Cleary, J.A. The effect of molecular weight and  $\beta$ -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- $\beta$ -D-glucan / J.A. Cleary, G.E. Kelly, A.J. Husband // *Immunology and Cell Biology*. – 1999. – V. 77. – P. 395 – 403.
134. Cohen-Bazire, G. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulphur purple bacteria / G. Cohen-Bazire, W.R. Sistrom, R.Y. Stanier // *Journal of Comparative Physiology*. – 1957. – V. 49. – P. 25 – 68.
135. Collic-Jouault, S. Bioactive bacterial exopolysaccharides: modification, characterization and preliminary results on biological activity / S. Collic-Jouault // *Actes de colloques-IFREMER*. – 2003. – P. 141 – 147.
136. Crescenzi, V. Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe / V. Crescenzi // *Biotechnology Progress* – 1995. – V. 11. – P. 251 – 259.



137. Daba, A.S. Anticancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms / A.S. Daba, O.U. Ezeronye // *African Journal of Biotechnology*. – 2003. – V. 2, N. 12. – P. 672 – 678.
138. De Baets, S. Extracellular *Tremella* polysaccharide: structure, properties and applications / S. De Baets, E. Vandamme // *Biotechnology Letters*. – 2001. – V. 23. – P. 1361 – 1366.
139. Deng, Z.Y. Effect of polysaccharides of cassiae seeds on the intestinal microflora of piglets / Z.Y. Deng, J.W. Zhang, J. Li // *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. – 2007. – N. 16. – P. 143 – 147.
140. De Vuyst, L. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria / L. De Vuyst, B. Degeest // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1999. – V. 23. – P. 153 – 177.
141. De Vuyst, L. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria / L. De Vuyst, F. De Vin, F. Vaningelgem [*et al.*] // *International Dairy Journal*. – 2001. – V. 11. – P. 687 – 708.
142. Drouillard, S. Structure of an amino acid-decorated exopolysaccharide secreted by a *Vibrio alginolyticus* strain. / S. Drouillard, I. Jeacomine, L. Buon [*et al.*] // *Marine Drugs*. – 2015. V. 1. – P. 6723–6739.
143. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K.A. Cilles, J.K. Hamilton // *Analytical Chemistry*. – 1956. – V. 28, N. 3. – P. 350 – 356.
144. Dunne, W.M. Effect of divalent cations on the synthesis of alginic acid-like exopolysaccharide from mucoid strain *Pseudomonas aeruginosa* / W.M. Dunne // *Microbios*. – 1985. – V.43. – P. 193 – 216.
145. Ebina, T. Antitumor effect of *Lactobacillus bulgaricus* 78R / T. Ebina, N. Ogata, K. Murata // *Biotherapy*. – 1995. – V. 9. – P. 65 – 70.
146. Egorenkova, I.V. Composition and immunochemical characteristics of exopolysaccharides from the rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* 1465 / I.V. Egorenkova, K.V. Tregubova, L.Y. Matora [*et al.*] // *Microbiology*. – 2007. – V. 77(5). – P. 623 – 629.

147. El Seoud, O.A. Organic esters of cellulose: new perspectives for old polymers / O.A. El Seoud, T. Heinze // Berlin: Advances Polymer Science, 2005. – N. 186. – P. 103 – 149.
148. Falch, B.H. The cytokine stimulating idivity of (1→3)-beta-D-glucans is dependent on the triple helix conformation / B.H. Falch, T. Espevik; L. Ryan [*et al.*] // Carbohydrate Research. – 2000. – V. 329, N. 3. – P. 587 – 596.
149. Flemming, H.C. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPS) – part I: structural and ecological aspects / H.C. Flemming, J. Wingender // Water Science and Technology. – 2001. – V. 43, N. 6. – P. 1 – 8.
150. Ewert, M. Selective retention in saline ice of extracellular polysaccharides produced by the cold-adapted marine bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H/ M. Ewert, J.W. Deming // Annals of Glaciology. – 2011. – V. 52, N. 57. – P. 111 –117.
151. Freitas, F. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications / F. Freitas, V.D. Alves, M.A. Reis // Trends in biotechnology. – 2011. – V. 29, N. 8. – P. 388 – 398.
152. Garcia-Ochoa, F. Xanthan gum: production, recovery and properties / F. Garcia-Ochoa, V.E. Santos, J.A. Casas [*et al.*] // Biotechnology Advances. – 2000. – V. 18. – P. 549-579.
153. Garrity, G.M. Family VIII. *Hyphomicrobiaceae* / G.M. Garrity, J. A. Bell, T. Lilburn // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley. – 2 nd. ed. – New York: Springer, 2005. – V.2. – P. 476 – 555.
154. Glöckner, F. O. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1 / F.O. Glöckner, M. Kube, M. Bauer [*et al.*] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – V. 100, N. 14. – P. 8298 – 8303.
155. Gretz, M.R. Analysis of red algal extracellular matrix polysaccharides cellulose and carrageenan / M.R. Gretz, J.C. Mollet // Techniques in glycobiology. – N.Y.: Marcel Dekker. Inc, 1997. – P. 613 – 628.
156. Grobbs, G. J. Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

- NCFB2772 / G.J. Grobbs, M.R. Smith, J. Sikkema [*et al.*] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1996. – V. 46. – P. 279 – 284.
157. Guezennec, J. Bacterial exopolysaccharides from unusual environments and their applications / J. Guezennec // The Perfect Slime: Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS) / H.C. Flemming, T.R. Neu, J. Wingender – N. Y.: Springer, 2016. – P. 135.
158. Gugliandolo, C. Antiviral and immunomodulatory effects of a novel bacterial exopolysaccharide of shallow marine vent origin / C. Gugliandolo, A. Spanò, V. Lentini [*et al.*] // Journal of applied microbiology. – 2014. – V. 116, N. 4. – P. 1028 – 1034.
159. Gugliandolo, C. Role of Bacterial Exopolysaccharides as agents in counteracting immune disorders induced by herpes virus / C. Gugliandolo, A. Spanò, T.L. Maugeri [*et al.*] // Microorganisms. – 2015. – V. 3, N. 3. – P. 464 – 483.
160. Gummadi, S.N. Production of extracellular water insoluble  $\beta$ -1,3-glucan (curdlan) from *Bacillus* sp. SNC07 / S.N. Gummadi, K. Kumar // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2005. – V.10. – P. 546 – 551.
161. Guvelier, C. Concentration regimes in xanthan gum solutions deduced from flow and viscoelastic properties / G. Cuvelier, B. Launay // Carbohydrate Polymers. – 1986. – N. 6. – P. 321.
162. Harada, A. The story of research into curdlan and the bacteria producing it / A. Harada // Trends in Glycoscience and Glycotechnology. – 1992. – N. 4. – P. 309.
163. Harrah, T. Microbial exopolysaccharides / T. Harrah, B. Panilaitis, D. Kaplan // The Prokaryotes. – Springer New York, 2006. – P. 766 – 776.
164. Haug, A. Biosynthesis of alginate: Part III. Tritium incorporation with polymannuronic acid 5-epimerase from *Azotobacter vinelandii* / A. Haug, B. Larsen // Carbohydrate Research. – 1971. – V.17. – P. 297 – 308.
165. Hidalgo-Cantabrana, C. Immunomodulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* / C. Hidalgo-Cantabrana, P. López, M. Gueimonde [*et al.*] // Probiotics and Antimicrobial Proteins. – 2012. – V. 4, N. 4. – P. 227 – 237.

166. Hirano, S.I. Isolation and characterization of *Xanthobacter polyarmat-icivorans* sp. nov. 127 W that degrades polycyclic and heterocyclic aromatic compounds under extremely low oxygen conditions / S.I. Hirano, F. Kitauchi, M. Haruki [et al.] // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2004. – V. 68. – P. 557 – 564.
167. Holst, O. Overview of the glycosylated components of the bacterial cell envelope / O. Holst, A.P. Moran, P.J. Brennan // Microbial Glycobiology. Structures, Relevance and Applications. – 2009. – P. 3 – 13.
168. Hosono, A. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4 / A. Hosono, J. Lee, A. Ametani [et al.] // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 1997. – V. 61. – P. 312 – 316.
169. Hutmacher, D.W. Polysaccharides in tissue engineering applications / D.W. Hutmacher, D.T.W. Leong, F. Chen // Handbook of carbohydrate engineering. – N.W.: Taylor & Francis Group LLC, 2005. – P. 837 – 893.
170. Jones, S.E. Protection from intestinal inflammation by bacterial exopolysaccharides / S.E. Jones, M.L. Paynich, D.B. Kearns [et al.] // The Journal of Immunology. – 2014. – V. 192, N. 10. – P. 4813 – 4820.
171. Jung, H.K. Production and physicochemical characterization of  $\beta$ -glucan by *Panibacillus polymyxa* JB 115 / H.K. Jung, J.H. Hong, S.C. Park [et al.] // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2007. – V. 12. – P. 713 – 719.
172. Kang, K.S. Agar – like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties / K.S. Kang, G.T. Veeder, P.J. Mirrasoul [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 1982. – N. 43. – P.1086.
173. Katzbauer, B. Properties and applications of xanthan gum / B. Katzbauer // Polymer Degradation and Stability. – 1998. – N. 59. – P. 81.
174. Kelly, D.P. Proposal for the reclassification of *Thiobacillus novellus* as *Starkeya novella* gen. nov., comb. nov., in the a-subclass of the *Proteobacteria* / D.P. Kelly, I.R. McDonald, A.P. Wood // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2000. – V. 50. – P. 1797 – 1802.

175. Kenne, L. Bacterial polysaccharides / L. Kenne, B. Lindberg // Polysaccharides. – London: Asad. Press Inc., 1983. – V. 2. – P. 287 – 363.
176. Kitazawa, H. Augmentation of macrophage functions by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* / H. Kitazawa, Y. Ishii, J. Uemura [et al.] // Food Microbiology. – 2000. – V. 17. – P. 109 – 118.
177. Kitazawa, H. Induction of IFN-gamma and IL-1alpha production in macrophages stimulates with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* / H. Kitazawa; T. Itoh; Y. Tomioka [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 1996. – V. 31. – P. 99 – 106
178. Kitazawa, H. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* / H. Kitazawa, T. Harata, J. Uemura [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 1998. – V. 40. – P. 169 – 175.
179. Kleerebezem, M. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties? / M. Kleerebezem, R. van Kranenburg, R. Tuinier [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 1999. – V. 76. – P. 357 – 365.
180. Klemm, D. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application / D. Klemm, D. Schumann, F. Kramer [et al.] // Polysaccharides II. – Berlin.: Adv Polym Sci., 2006. – V. 205. – P. 49 – 96.
181. Kodali, V. P. Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium / V.P. Kodali, R. Sen //Biotechnology journal. – 2008. – V. 3, N. 2. – C. 245 – 251.
182. Korakli, M. Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis* / M. Korakli, A. Rossmann, M.G. Gänzle [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2001. – V. 49. – P. 5194 – 5200.
183. Kranenburg, R. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: Approaches for the production of existing and novel polysaccharides / R.

- Kranenburg, I C. Boels, M. Kleerebezem, W.M. de Vos // *Current Opinion in Biotechnology*. – 1999. – V. 10. – P. 498 – 504.
184. Kumano, N. Antitumoral activity of slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian ropy sour milk, "viili" / H. Kitazawa, T. Toba, T. Itoh [et al.] // *Animal Feed Science and Technology*. – 1991. – V. 62. – P. 277 – 283.
185. Kumar, A.S. Bacterial exopolysaccharides – a perception / A.S. Kumar, K. Mody, B. Jha // *Journal Basic Microbiology*. – 2007. – V. 47. – P. 103 – 117.
186. Laws, A. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria / A. Laws, Y. Gu, V. Marshall // *Biotechnology Advances*. – 2001. – V. 19. – P. 597 – 625.
187. Le Costaouëc, T. Structural data on a bacterial exopolysaccharide produced by a deep-sea *Alteromonas macleodii* strain / T. Le Costaouëc, S. Cérantola,; D. Ropartz [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – V. 90. – P. 49–59.
188. Lee K.Y. Macrophage activation by polysaccharide fraction isolated from *Salicornia herbacea* / K.Y. Lee, M.H. Lee, I.Y. Chang [et al.] // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2006. – V. 103. – P. 372 – 378.
189. Leibovich, S.J. Promotion of wound repair in mice by application of glucan / S.J. Leibovich, D. Danon // *Journal Reticuloendothel Soc*. – 1980. – V. 1. – P. 1 – 11.
190. Leroy, F. Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health / F. Leroy, L. De Vuyst // *Journal of dairy science*. – 2016. – V. 99, N. 4. – P. 3229 – 3238.
191. Leung, M.Y.K. Polysaccharide biological modifiers / M.Y.K. Leung, C. Liu, J.C.M. Koon [et al.] // *Immunology Letters*. – 2006. – V. 105, N. 2. – P. 101 – 114.
192. Lindsay, M.R. Cell compartmentalization in *Planctomycetes*: novel types of structural organization for the bacterial cell / M.R. Lindsay, R.I. Webb, M. Strous [et al.] // *Archives of Microbiology*. – 2001. – V. 175. – P. 413 – 429.

193. Liu, W.G. Chitosan-based nonviral vectors for gene Delivery / W.G. Liu, W.W. Lu, K.D. Yao // Handbook of carbohydrate engineering. – 2005. – V. 1. – P. 817 – 836.
194. Ljung, A. Lactic acid bacteria as probiotics / A. Ljungh, T. Wadstro // Current Issues in Intestinal Microbiology. – 2006. – V. 7. – P. 73 – 89.
195. Lloyd, L.L. Carbohydrate polymers as wound management aids / L.L. Lloyd J.F. Kennedy, P. Methacanon [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 1998. – V. 37, N. 3 – P. 315 – 322.
196. Mack, D. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear  $\beta$ -1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis / D. Mack, W. Fischer, A. Krokotsch [et al.] // Journal of Bacteriology. – 1996. – V. 178. – P. 175 – 183.
197. Maede, Y.Y. The nature of immunopotentiality by the antitumor polysaccharide Lentinan and the significance of biogenic amines in its action / Y.Y. Maede, J. Hamuro, G. Chihara // International Journal of Cancer. – 1974. – V. 12. – P. 259 – 281.
198. Madhuri, K.V. Microbial Exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications / K.V. Madhuri, K.V. Prabhakar // Oriental Journal of Chemistry. – 2014. – V. 30, N. 3. – P. 1401 – 1410.
199. Maier, H. Guar, locust bean, tara, and fenugreek gums / H. Maier, M. Anderson, C. Karl [et al.] // Industrial Gums. Polysaccharides and their derivatives. – San Diego: Academic Press, 1983. – V. 3. – P. 181.
200. Makino, S. Immunomodulatory effects of polysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 / S. Makino, S. Ikegami, H. Kano [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2006. – V. 89. – P. 2873 – 2881.
201. Marqués, A. M. Production and rheological properties of extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas* sp. Strain EPS-5028 / A.M. Marqués, I. Estañol, J.M. Alsina [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 1986. – V. 52, N. 5. – P. 1221 – 1223.
202. Martínez-Checa, F. Characteristics of bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: Chemical composition, emulsifying activity

- and rheological properties / F. Martínez-Checa, F.L. Toledo, K. El Mabrouki [*et al.*] // *Bioresource Technology*. – 2007. – V. 98. – P. 3130–3135.
203. Marx, J.G. Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions / J.G. Marx, S.D. Carpenter, J. W. Deming // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2009. – V. 55, N. 1. – P. 63–72.
204. Matsuda, M. Structural revision of sulfated polysaccharide b-1 isolated from a marine *Pseudomonas* species and its cytotoxic activity against human cancer cell lines / M. Matsuda, T. Yamori, M. Naitoh, K. Okutani [*et al.*] // *Marine Biotechnology*. – 2003. – V. 5, N. –13 : P. 72.
205. McIntire, T.M. Imaging carbohydrate polymers with noncontact mode atomic force microscopy / T.M. McIntire, D.A. Brant // *Techniques in glycobiology*. – N.Y.: Marcel Dekker. Inc., 1997. – P. 187 – 208.
206. Melton, L.D. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanhtomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies / L.D. Melton, L. Mindt, D.A. Rees // *Carbohydrate Research*. – 1976. – V. 46, N. 4. – P. 245.
207. Meseguer, G. Gamma scintigraphic comparison of eye drops containing pilocarpine in healthy volunteers / G. Meseguer, R. Gurny, P. Buri // *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. – 1996. – V. 12. – P. 481 – 488.
208. Meyer, A. Improved RP-HPLC and anion-exchange chromatography methods for the determination of amino acids and carbohydrates in soil solutions / A. Meyer, H. Fischer, Y. Kuzyakov [*et al.*] // *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. – 2008. – V. 171, N. 6. – P. 917 – 926.
209. Millane, R.P. X – ray diffraction studies of a variant of xanthan gum in which the side chain terminal mannose unit is absent / R.P. Millane, T.V. Narasaiah // *Carbohydrate Polymers*. – 1990. – N. 12. – P. 315.
210. Millane, R.P. Molecular structures of xanthan and related polysaccharides / R.P. Millane, B. Wang // *Gums and stabilisers for the food industry*. – Oxford: IRL Press, 1992. – V. 6. – P. 541.



211. Mironescu, M. Microbial polisaharides production, characterization and properties / M. Mironescu // *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*. 2003. – V. 7, N. 2 – P. 26 – 38.
212. Mishra, A. Microbial Exopolysaccharides / A. Mishra, B. Jha // *The Prokaryotes*. – Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2013. – P. 179 – 192.
213. Moorhouse, R. Xanthan gum – molecular conformation and interactions / R. Moorhouse, M.D. Walkinshaw, S. Arnott // *Extracellular microbial polycaccharides*. – Washington.: D.C., 1977. – P. 90.
214. Moran, A.P. Microbial glycobiology: structures, relevance and applications / A.P. Moran, O. Holst, P. Brennan [*et al.*]. – Elsevier, 2009. – P. 987.
215. Morris, E. R. Order – disorder transition for a bacterial polysaccharides in solution. A role for polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host / E.R. Morris, D.A. Rees, G. Young [*et al.*] // *Journal of Molecular Biology*. – 1977. – N. 110. – P.1.
216. Nagaoka, M. Antiulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides / M. Nagaoka, S. Hashimoto, T. Watanabe [*et al.*] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 1994. – V. 17. – P. 1012 – 1017.
217. Naidu, A.S. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB) / A.S. Naidu, W.R. Bidlack, R.A. Clemens // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. – 1999. – V. 39. – P. 13 – 126.
218. Nakajima, H. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk / H. Nakajima, Y. Suzuki, T. Hirota // *Journal of Food Science*. – 1992. – V. 57. – P. 1327 – 1329.
219. Nishimura-Uemura, J. Functional alteration of murine macrophages stimulated with extracellular polysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1 / J. Nishimura-Uemura, H. Kitazawa, Y. Kawai [*et al.*] // *Food Microbiology*. – 2003. – V. 20. – P. 267 – 273.
220. Nishio, Y. Material functionalization of cellulose and related polysaccharides via diverse microcompositions / Y. Nishio // *Polysaccharides II*. – Berlin.: Adv. Polym. Sci., 2006. – V. 205. – P. 97 – 151.

221. Obayashi, T. Clinical utilization of the measurement of (1 → 3) – β – D – glucan in blood / T. Obayashi // Toxicology of 1 → 3-beta- glucans: glucans as a marker for fungal exposure. – N.W.: Taylor & Francis Group, LLC, 2005. – P. 199 – 207.
222. Okuyama, K. Fiber diffraction studies of bacterial polysaccharides / K. Okuyama, S. Arnott, R. Moorhouse [et al.] // Fiber Diffraction Methods. American Chemical Society. – Washington: D.C., 1980. – P.411.
223. O'Neill, M.A. Structural analysis of an acidic polysaccharide secreted by *Xanthobacter* sp. (ATCC 53272) / M.A. O'Neill, A.G. Darvill, P. Albersheim // Carbohydrate Research. – 1990. – V. 206. – P. 289 – 296.
224. Ovodov, I. S. Polysaccharides of flower plants: structure and physiological activity / I. S. Ovodov // Bioorganicheskaia khimii. – 1998. – V. 24, N. 7. – P. 483 – 501.
225. Pigeon, R.M. Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria / R.M. Pigeon, E.P. Cuesta, S.E. Gilliland // Journal of Dairy Science. – 2002. – V. 85. – P. 2705 – 2710.
226. Pirog, T.P. Biological functions of microbial exopolysaccharides / T.P. Pyrog // Mikrobiolohichnyi zhurnal. – 2000. – V. 63, N. 5. – C. 80 – 101.
227. Pirog, T. P. Improvement of biotechnology of microbial exopolysaccharide ethapolan on ethanol / T.P. Pirog, Ju.V. Korzh // Journal of Biotechnology. – 2008. – V. 3, N. 3. – P. 47 – 55.
228. Raj, H.D. Proposal of *Ancylobacter* gen. nov. as a substitute for the bacterial genus *Micricyclus* Orskov 1928 / H.D. Raj // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1983. – V. 33. – P. 397 – 398.
229. Raj, H.D. Oligotrophic methylotrophs: *Ancylobacter* (basonim "*Microcyclus*" Orskov) gen. nov. Raj / H.D. Raj // Critical reviews in microbiology. – 1989. – V. 17. – P. 89 – 106.
230. Rees, D. A. Shapes and interaction of carbohydrate chains / D. A. Rees, E. R. Morris, D. A. Thom [et al.] // Polysaccharides. New York; London: Acad. Press. – 1982. – V. 1. – P. 196 – 281.

231. Ricciardi, A. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications / A. Ricciardi, F. Clementi // Italian Journal of Food Science. – 2000. – V. 12. – P. 22 – 45.
232. Roca, C. Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications / C. Roca, V.D. Alves, F. Freitas [*et al.*]//Frontiers in microbiology. – 2015. – V. 6. – P.288 – 291.
233. Rodd, A.B. Heterodyne and nonergodic approach to dynamic light scattering of polymer gels: aqueous xanthan in the presence of metal ions (aluminum (III)) / A.B. Rodd, D.E. Dunstan, D.V. Boger [*et al.*] // Macromolecules. – 2001. – N. 34. – P. 33 – 39.
234. Rodríguez, H. Detection of *Xanthomonas campestris* mutants with increased xanthan production / H. Rodríguez, L. Aguilar // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 1997. – N. 18. – P. 232 – 234.
235. Ross, G.D. Therapeutic "intervention with complement and beta-glucan in cancer / G.D. Ross, V. Vetvicka, J. Yan [*et al.*]// Immunopharmacology. – 1999. – V.42. – P. 61 – 74.
236. Ruiz-Bravo, A. Biological response modifier activity of an exopolysaccharide from *Panibacillus jamilae* CP-7 / A. Ruiz-Bravo, M. Jimenez-Valera, E. Moreno [*et al.*] // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. – 2001. – V. 8, N. 4. – P. 706 – 710.
237. Ruas-Madiedo, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria / P. Ruas-Madiedo, J. Hugenholtz, P. Zoon // International Dairy Journal. – 2002. – V. 12. – P. 163 – 171.
238. Ruas-Madiedo, P. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* / P. Ruas-Madiedo, B. Sánchez, C. Hidalgo-Cantabrana [*et al.*] //Handbook of animal-based fermented food and beverage technology, 2nd edn. CRC Press, Florida. – 2012. – P.125 – 152.
239. Sandford, P.A. Microbial polysaccharides: new products and their commercial applications / P.A. Sandford, I.W. Cotterell, D.J. Pettitt // Pure and Applied Chemistry. – 1984. – N. 56. – P. 895 – 897.

240. Sandula, J. Microbial (1→3)-β-D- glucans, their preparation, physicochemical characterization and immunomodulatory / J. Sandula, G. Kogan, M. Kacurakova [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 1999. – V. 38. – P. 247 – 253.
241. Santhiya, D. Surface chemical studies on sphalerite and galena using extracellular polysaccharides isolated from *Bacillus polymyxa* / D. Santhiya, S. Subramanian, K.A. Natarajan // Journal of Colloid and Interface Science. – 2002. – V. 256. – P. 237 – 248.
242. Schlesner, H.K. The development of media suitable for the for the microorganisms morphologically resembling. *Planctomyces* spp., *Pirellula* spp., and other *Planctomycetales* from various aquatic habitats using dilute media / H.K. Schlesner // Systematic and Applied Microbiology. – 1994. – N. 17. – P. 135 – 145.
243. Schmid, J. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies / J. Schmid, V. Sieber, B. Rehm // Frontiers in microbiology. – 2015. – V. 6, N.1. – P. 496.
244. Seljelid, R. A soluble β – 1,3 – glucan derivative potentials the cytostatic and cytotoxic of mouse peritoneal macrophages in vitro / R. Seljelid // Immunofarmacology. – 1984. – V. 6, N. 1. – P. 7 – 10.
245. Sikkema, J. Extracellular polysaccharides of lactic acid bacteria / J. Sikkema, T. Oba // Snow Brand R & D Reports. – 1998. – V. 107. – P. 1 – 31.
246. Singh, S. Mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* are devoid of mannuronan C-5-epimerase / S. Singh, S. Hogan, D.S. Feingold [et al.] // Microbios. – 1987. – V. 51, N. 206. – P. 7 – 13.
247. Singleton, Ed. P. Dictionary of microbiology and molecular biology third / Ed. P. Singleton, D. Sainsbury. – Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2006. – P. 895.
248. Skjak-Brack, G. The role of O – acetyl groups in the biosynthesis of alginate by *Azotobacter vinelandii* / G. Skjak-Brack, B. Larsen, H. Grashdalen // Carbohydrate Research. – 1985. – N. 145. – P. 169 – 174.
249. Sohaib, S. Characterization of bacterial exopolysaccharides / S. Sohaib. – Diss. University of Huddersfield, 2015. – 145 p.

250. Stacey, M. Polysaccharides of microorganisms / M. Stacey, S.A. Barker // London: Oxford Univ. press. – 1960. – 312 p.
251. Stokke, B.T. Release of disordered xanthan oligomers upon partial acid hydrolysis of doublestranded xanthan / B.T. Stokke, B.E. Christensen // Food Hydrocolloids. – 1996. – V. 10, N. 1. – P. 83.
252. Sun, M.L. Characterization and biotechnological potential analysis of a new exopolysaccharide from the Arctic marine bacterium *Polaribacter* sp. SM1127./ M.L. Sun, F. Zhao, M. Shi [et al.] // Scientific Reports. – 2015. – V. 5. – P.18435.
253. Sutherland, I.W. A yellow polysaccharide-producing bacterium with unusual characteristics / I.W. Sutherland, T. Williamson // Eur. J. Applied Microbiology and Biotechnology. – 1972. – V. 6, N. 3. – P. 233 – 240.
254. Sutherland, I.W. Microbial exopolysaccharides / I.W. Sutherland // Trends Biochemical Sciences. – 1979. – N 3. – P. 55 – 59.
255. Sutherland, I.W. Biosynthesis of microbial polysaccharides / I.W. Sutherland // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1982. – V. 23. – P. 79 – 150.
256. Sutherland, I.W. Microbial exopolysaccharides. Industrial polymers patent and future potential / I.W. Sutherland, D.C. Ellwood // Microbial Technology: Current State, Future Prospects (Society for General Microbiology Symposia. – Cambridge etc., 1979. – P. 107 – 150.
257. Sutherland, I.W. Extracellular polysaccharides / I.W. Sutherland // Biotechnology. – 1983. – V. 3. – P. 531 – 575.
258. Sutherland, I.W. Industrially useful microbial polysaccharides / I.W. Sutherland // Microbiology Science. – 1986. – V. 3, N. 1. – P. 5 – 9.
259. Sutherland, I.W. Microbial exopolysaccharides – structural subtleties and their consequences / I.W. Sutherland // Pure and Applied Chemistry. – 1997. – V. 69. – P. 1911 – 1917.
260. Sutherland, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides / I.W. Sutherland // Trends Biotechnology. – 1998. – V. 16. – P. 41 – 46.
261. Sutherland, I.W. Microbial exopolysaccharides / I.W. Sutherland // Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. – N.Y.: Marcel Dekker, Inc., 2005. – P. 431 – 457.

262. Sydow, H. *Novae fimgorum species* / H. Sydow, P. Sydow // *Annales Mycologici*. – 1904. – V. 2. – P. 162 – 174.
263. Thapa, D. Antimutagenic property of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria / D. Thapa, Z. Hao // *International probiotic conference*. – 2008. – P. 875 – 882.
264. Tompkin, R.B. Nitrite / R.B. Tompkin // *Antimicrobials in food. III*. – N.W.: Taylor & Francis Group, LLC, 2005. – P. 169 – 236.
265. Thomsson, K.A. Analysis of permethylated glycoprotein oligosaccharide fractions by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry / K.A. Thomsson, N.G. Karlsson, H. Karlsson // *Techniques in glycobiology*. – N.Y.: Marcel Dekker, Inc., 1997. – P. 335 – 347.
266. Tuinier, R. Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* / R. Tuinier, W.H.M. Van Casteren, P.J. Looijesteijn [*et al.*] // *Biopolymers*. – 2001. – V. 59. – P. 160 – 166.
267. Umezawa, H. Antitumor polysaccharide produced by marine bacteria / H. Umezawa, Y. Okami, S. Kurasawa [*et al.*] // *The Journal of Antibiotics*. – 1983. – V. 471. – P. 471 – 477.
268. Vandamme, E. J. The search for novel microbial fine chemicals, agrochemicals and biopharmaceuticals / E.J. Vandamme // *Journal of Biotechnology*. – 1994. – V. 37. – P. 89 – 108.
269. Van Niel, C. W. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis / C.W. Van Niel, C. Feudtner, M.M. Garrison [*et al.*] // *Pediatrics*. – 2005. V. 109. – P. 678 – 684.
270. Vasiliu, S. *Microbial Exopolysaccharides for Biomedical Applications* // *Frontiers in Biomaterials: Unfolding the Biopolymer Landscape*. / V. Pillay, Y.E. Choonara, P. Kumar. — Sharjah: Bentham Science Publishes UAE. – 2016. – V. 2. – 180 p.
271. Vasilyeva, L.V. *Labrys monahos*, a new budding prosthecate bacterium with radial symmetry / L.V. Vasilyeva, A.M. Semenov // *Mikrobiologiya*. – 1984. – N. 53. – P. 85 – 92.

272. Viebke, Ch. Order-Disorder Conformational Transition of Xanthan Gum // Polysaccharides: structural diversity and functional versatility/ Ch. Viebke. – N.Y.: Marcel Dekker, Inc., 2005. – P. 459 – 474.
273. Vijayendra, S. V. N. Microbial Biopolymers: The Exopolysaccharides / S. V. N. Vijayendra //Microbial Factories / K.V.Chandra – New Delhi : Springer India, 2015. – P. 113 – 125.
274. Vinderolaa, G. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity/ G. Vinderolaa // Elsevier. – 2006. – V. 36. – P. 254 – 260.
275. Wagner, M. The *Planctomycetes*, *Verracomicrobia*, *Chlamydiae* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance / M. Wagner, M. Horn // Curr Opin Biotechnol. – 2006. – V. 3, N.17. – P. 241 – 249.
276. Wang, S.Y. Antitumour effects of polysaccharides of *Ganoderma lucidium* / S.Y. Wang, M.L. Hsu, H.C. Hsu [*et al.*] // Auckland: Proc. Int. Symposium Ganoderma Sci. – 2001. – P. 41 – 46.
277. Ward, N. The order *Planctomycetales*, including the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata* and *Isosphaera* and the candidates genera *Brocadia*, *Kuenenia* and *Scalindua* / N.Ward , J.T. Staley, J.A. Fuerst [*et al.*] // The Prokaryotes, 3 ed. / M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg [*et al.*]. – New York: Springer, 2006. – V. 7. – P. 757 – 793.
278. Wasser, S. P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems / S. P. Wasser // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2010. – V. 12, N. 1. – P. 1 – 16.
279. West, T.P. Improved polysaccharide production using strain improvement / T. P. West // Microbial processes and products / ed. J. – L. Barredo. – N.J.: Humana Press Inc. – 2005. – P. 301 – 311.
280. Wiegel, J. The Genus *Xanthobacter* / J. Wiegel // The Prokaryotes, 3 ed. Eds. / M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg [*et al.*]. – New York: Springer, 2006. – V. 5. – P. 290 – 314.

281. Wu, S.; Liu, G.; Jin, W.; Xiu, P.; Sun, C. Antibiofilm and anti-Infection of a marine bacterial exopolysaccharide against *Pseudomonas aeruginosa* / S. Wu, G. Liu, W. Jin, P. Xiu [*et al.*]. // *Frontiers in Microbiology*, 2016. – V. 7. – P. 126.
282. Yalpani, M. Polysaccharides: syntheses, modifications and structureproperty relations / M.Yalpani. – New York: Elsevier, 2013. – V. 36. – 522 p.
283. Yui, T. X – ray diffraction study of polysaccharides / T. Yui, K. Ogawa // *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. – N.Y.: – Marcel Dekker, Inc., 2005. – P. 99 – 122.
284. Zanchetta, P. A new bone-healing material: A hyaluronic acid-like bacterial exopolysaccharide / P. Zanchetta, N. Lagarde, J. Guezennec // *Calisif. Tissue Int.* – 2003. – V. 72. – P. 72 – 79
285. Zhang, X. Q. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers / X.Q. Zhang, P.L. Bishop, M.J. Kupferle // *Water Science and Technology*. – 1998. – V. 37. – P. 345 – 348.
286. Zhang, Z. Complete monosaccharide analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection / Z. Zhang, N M. Khan, K.M. Nunez [*et al.*] // *Analytical chemistry*. – 2012. – V. 84, N. 9. – P. 4104 – 4110.



*Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю доктору биологических наук, профессору Карпуниной Лидии Владимировне за помощь на всех этапах выполнения диссертации и кандидату биологических наук, доценту Бухаровой Екатерине Николаевне за консультации и совместную работу.*