

Актуальность. Несмотря на многообразие биополимеров и их практическую значимость, только некоторые из них получили промышленную реализацию (табл. 1) [1]. На глобальном рынке гидроколлоидов доминируют полисахариды водорослей и растений, такие, как альгинат, крахмал, пектин, карагинан, галактоманнан и др. Доля бактериальных экзополисахаридов (БЭПС) на рынке гидроколлоидов не превышает 10 % [2]. Во многом это обусловлено низким выходом и высокой себестоимостью получаемых продуктов. Для замены растительных гидроколлоидов на аналоги микробиологического происхождения требуются инновационные подходы. Основные пути снижения стоимости включает использование дешевых субстратов, улучшение выхода путем создания более продуктивных штаммов методом генетической инженерии, оптимизации процесса ферментации и всего технологического процесса [3].

Таблица 1 - Промышленно производимые бактериальные полисахариды и области их применения

Продуцент/ Бактериальный экзополисахарид	Мономер / Область применения	Молекул. вес (Да)
<i>L. mesenteroides</i> / Декстран	Глюкоза/ Пищевая, фарм. пром-сть	106-109
<i>P. aeruginosa</i> и <i>A. vinelandii</i> / Альгинат	Гилуроновая и мануроновая кислоты/ Пищевые гидроколлоиды, медицина	(0,3-1,3) $\times 10^6$
<i>Xanthomonas</i> spp.	Глюкоза, манноза и глюкуроновая кислота /Пищевая, нефтедобывающая, косметическая, фарм. пром-сть	(2,0-50) $\times 10^6$
<i>Rhizobium meliloti</i> и <i>Agrobacterium radiobacter</i>	Глюкоза/ Пищевая, фарм. пром-сть, извлечение металлов	5 $\times 10^4$ -2 $\times 10^6$
<i>Acetobacter</i> spp.	Целлюлоза	~10 <sup>6</sup>
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Глюкоза и галактоза/ Пищевая и нефтедобывающая пром-сть.	5 $\times 10^3$ -1 $\times 10^6$
<i>Sinorhizobium meliloti</i> M5N1CS и <i>Gluconacetobacter hansenii</i>	-/Пищевая и косметическая пром-сть.	6 $\times 10^4$ -6 $\times 10^5$
<i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. и <i>Enterobacter</i> spp.	Фукоза, глюкоза, глюкуронат и галактоза/ Косметическая пром-ть	2 $\times 10^4$ -6 $\times 10^5$

Промышленные микроорганизмы-продуценты бактериальных полисахаридов. Огромным промышленным потенциалом обладают БЭПС молочнокислых бактерий (МКБ), однако большинство МКБ демонстрируют низкий выход полисахаридов, что затрудняет их коммерциализацию. Для гомополисахаридов, в большинстве случаев, выход составляет менее 1 г/л для неоптимизированных условий и еще более низкий для гетерополисахаридов (ГеПС) [4]. Исследовали 10 штаммов МКБ изолированных из молочных и зерновых продуктов. В 9 из них выход глюканов составлял от 0,8 до 1,7 г/л и только гетерополисахариды от *Lb. Curvatus* в количестве 0,022 г/л. [5]. Сообщается о том, что 31 продуцент ГеПС скринированные от 201 штамма МКБ (термофилы и мезофиллы) синтезировали от 10 до 166 мг/л и только 7 из них производили более 100 мг/л. Большое число исследований посвящено различным штаммам-продуцентам БПС. Получен штамм *L. mesenteroides* CMG713, селективированный для производства декстрана демонстрирует максимальный выход при 20 часовой ферментации на среде с 15

% сахарозы при 30 °C и pH 7,0. Эта бактерия продуцирует декстран с молекулярной массой около 2 млн Да, мономеры в котором соединены только  $\alpha$ -1,6 глюкозидной связью [6]. Ферментация. Эффективность ферментации, как и в целом, эффективность производства БЭПС зависит от бактериальной фазы роста, состава среды, pH среды, температуры культивирования, режимов перемешивания, аэрации, вязкости среды и др. [7]. Большое значение имеет состав среды и соотношение углерода к азоту, в частности, соотношение 10:1 считается наиболее благоприятными для максимального производства ЭПС [8]. Установлено влияние компонентов питательной среды - источников углерода (глюкоза, фруктоза, лактоза, манноза, ксилоза и сахароза) и азота (хлорид аммония, нитрат натрия, пептон, дрожжевой экстракт, мясной экстракт), минералов, витаминов и аминокислот, а также некоторых промышленных отходов как, например, тростниковая меласса, рисовые отруби на выход БЭПС *Bacillus subtilis*. Согласно полученным результатам, максимальный выход БЭПС наблюдался при концентрации сахарозы 2 % и составил 2,66 г/л, минимальный у фруктозы (0,96 г/л). Сахароза обеспечивает высокий выход, являясь прекурсором для синтеза БЭПС. При более высокой концентрации сахарозы повышается осмотическое давление и выход полисахарида снижается [9]. Производство необходимого БЭПС может быть также достигнуто контролем условий культивирования. Во многих случаях структура БЭПС зависит от источника углерода. Например, меняя состав среды можно добиваться различного соотношения моносахаров в БЭПС. Из различных источников азота органическая форма способствует большему выходу БЭПС, чем неорганическая. Наилучшие результаты наблюдаются при применении дрожжевого экстракта. В общем случае, повышение концентрации азота стимулировало рост клеток и снижает образование БПС. Из аминокислот большим эффектом обладает ввод L-аспарагина, затем L-глутамина и L-глицина. Определены оптимальные для производства БПС концентрации различных минералов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , and  $\text{Mn}^{2+}$ ). Среди витаминов большим эффектом обладает аскорбиновая кислота. Выбор основного сырья для ферментации, как и оптимизация состава питательной среды в целом имеет определяющее значения в экономике производства БПС, т.к. сырье является наиболее дорогостоящим составляющим в производстве биополимеров. До 90-х годов исследования были направлены на изучение условий культивирования с получением высокочистых биополимеров. Однако, для повышения коммерческой привлекательности производства биополимеров, исследуются различные мультикомпонентные сырьевые системы, такие как мелассы, сиропы, отходы пищевой и перерабатывающей промышленности и др. Сиропы и мелассы используются в качестве субстрата для производства пуллулана [10], ксантана [11], декстрана [12], склероглюкана [13], левана [14], и геллана [15] благодаря высокому содержанию сахарозы и других питательных компонентов и ростовых факторов, низкой цены,

доступности и простоте хранения. Степень чистоты сырья носит индивидуальный характер и зависит от требований бактериальной клетки. Жом сахарной свеклы, получаемый после экстракции сахарозы из свекловичной стружки, состоит преимущественно из целлюлозы, гемицеллюлозы и пектина. Существует несколько способов обработки жома для дальнейшей переработки. Автоклавирование при температуре 122 и 136 °С изменяет композицию и физико-химические свойства, увеличивая растворимость пектинов и арабианов. Обработка перепадами давления повышает растворимость целлюлозных компонентов. Сообщается о выходе 0,89 г ксантана с 1 г автоклавированного жома в течение 4 дней ферментации [16]. Сырная сыворотка. Содержит около 70 % лактозы от СВ, а также др. компоненты и факторы роста, стимулирующие рост микроорганизмов. В производстве БПС применение сыворотки зависит от способности микроорганизмов утилизировать лактозу. Сыворотка как сырье в производстве ксантана исследовалась в работе [17]. Фруктовые отжимки. Проводили экстракцию сахарозы из виноградной выжимки горячей водой, сепарировали раствор и выращивали *A. pullulans* NRRLY-6220 для производства пуллулана. Выход пуллулана составил 22,3 г/л в течение 7 дней ферментации [18]. Лигноцеллюлозная биомасса. Распространенный и дешевый альтернативный субстрат для микробиологической промышленности [19]. Древесина после кислотного гидролиза использовалась для получения сукциноглюкана штаммами *Pseudomonas* sp. ATCC 31260. На кислотном гидролизате древесных опилок бактериями *Brevundimonas vesicularis* LMG P-23615 и *Sphingorhynchus macrogoltabida* LMG 17324 образовывался полисахарид в количестве 64 - 72 % от веса сухих клеток [20]. Несмотря на низкую стоимость, вторичные ресурсы могут содержать компоненты, которые будут способствовать возникновению различных метаболических путей. Это может привести к синтезу других полимеров и возникновению нежелательных побочных продуктов. Неактивные компоненты питательной среды, скапливаясь, могут выступать ингибиторами, снижая выход целевого продукта. Некоторые технологии предъявляют высокие требования к чистоте и качеству субстрата, что может существенно повысить затраты на их подготовку и увеличить общие инвестиционные затраты. Кроме питательной среды на синтез БЭПС влияют условия культивирования, такие как pH и температура. В общем случае оптимум pH культуральной среды для образования БПС находится в диапазоне 5,5 - 6,5. Существенные отклонения от этого уровня ингибируют не только рост и развитие клеток, но и образование БЭПС [21]. Уровень pH зависит от микроорганизмов и находится в достаточно узком диапазоне. В частности, для синтеза БПС у *Enterobacter* A47 оптимум pH находится в пределах 6,0 - 8,0 [22]. Оптимальный уровень pH для синтеза ксантана находится в пределах 6 и 7,5. В процессе жизнедеятельности клетки выделяют большое количество кислот, что снижает pH и требуется его систематический контроль. Температура

существенно влияет на синтез БЭПС. Оптимальная температура для многих бактерий продуцентов БЭПС находится в диапазоне 26 - 31 °С. Снижение температуры на 10 °С ингибирует биосинтез БЭПС. Наблюдаются исключения - бактерии, вырабатывающие БЭПС в качестве ответа на температурный шок производят экстрацеллюлярные полисахариды (например, *Listeria monocytogenes*) [21]. Образование БПС зависит от генетического фактора, определяющего закономерность образования БПС в различной стадии роста - логарифмической или стационарной. Аэрация используется главным образом на стадии активного роста клеток, в остальных случаях она лимитируется. Одной из особенностей технологии получения БЭПС является изменения реологических свойств среды, как в процессе роста, так и на стадии образования БЭПС [23]. Это создает определенные проблемы не только в ухудшении таких технологических процессов, как перемешивание, передача тепла, кислорода, но также могут быть причиной нестабильности качества конечного продукта. Обеспечение эффективного процесса ферментации в промышленных условиях, возможности масштабирования технологий требует выработки определенной стратегии в развитии биореакторов для производства БЭПС [24]. Исследованы процессы ферментации в биореакторах с мультидисковыми перемешивающими устройствами, как например, при производстве метилана [25], применение аксиальных пропеллеров для перемешивания как в технологии курдлана [26]. Ферментативные методы. Некоторые полии олигосахара (декстран, изомальтоолигосахара, галактоолигосахара) могут быть получены прямым ферментативным синтезом из моно и дисахаров. Имобилизованные ферменты в этих способах производства предпочтительнее, поскольку могут многократно использоваться, улучшая также некоторые свойства ферментов, такие как стабильность, активность, специфичность и селективность [27]. Применительно к технике иммобилизации метод капсулирования в альгинаты представлен наилучшим образом, обеспечивая до 90 % выхода [28]. Декстраназы иммобилизуются на различных носителях: глютаральдегидактивированный хитозан, пористое стекло, бентонит, Eupergit C, демонстрируя высокий выход (90 %) [29]. Изучена возможность соиммобилизации декстрансахаразы и декстраназы для получения декстрана определенной степени полимеризации [30]. Положительные результаты по иммобилизации фермента декстраназа (*Leuconostoc mesenteroides* B-512F) получены на эпокси-активированном акриловом полимере Eupergit C 250L. Иммобилизация фермента осуществлялась при pH 5,4 для исключения инактивации фермента. Исследовалось количество иммобилизованного фермента на носителе, температура и продолжительность контакта. Восстановленная активность фермента достигала 22 %, оптимальная температура и pH были идентичны нативному ферменту. Фермент сохранял более 40 % начальной активности в течение 2 дней [31]. Иммобилизоваться могут также и клетки-продуценты БПС, например, *L. mesenteroides* KIBGE HA,1

иммобилизованный на акриламидном геле. При концентрации сахарозы в субстрате 10 % достигали максимальный выход декстрана с коэффициентом конверсии 5,82 при 25 °С, тогда как при более высокой температуре 35 °С коэффициент составил 3,5. С повышением концентрации сахарозы выход декстрана уменьшался. Свободные клетки прекращали синтез декстрана по истечении 144 ч, тогда как иммобилизованные клетки синтезировали декстран до 480 ч. Молекулярная масса декстрана полученного иммобилизованными клетками была меньше, чем у свободных, декстран которых был аналогичен голубому декстрану [32].

### Выделение БЭПС. Технологии извлечения БЭПС из культуральной жидкости

представлены в настоящее время, преимущественно двумя способами, являющимися не столько альтернативными, сколько взаимодополняющими: классической технологией осаждения полярными растворителями и мембранное концентрирование. Мембранное концентрирование или ультрафильтрация автономно применяется для получения жидких форм продукта (например, в нефтяной промышленности), в других случаях она является стадией предварительной обработки раствора перед осаждением растворителями с целью получения более чистых БЭПС. Ультрафильтрация эффективна только для псевдопластичных полимеров (вязкость которых зависит от внешнего сдвигового усилия). Так псевдопластичный ксантановый гель концентрируется до вязкости 30000 Спз. Другие полисахариды с меньшей псевдопластичностью концентрируются только до фракции с аналогичной вязкостью и имеют низкую скорость потока. В промышленности применяются пластинчатые и рамные типы ультрафильтров. Мембраны изготовлены из полисульфона или поливинилидина. Преимущества данного способа - низкие энергозатраты и возможность исключать низкомолекулярные соединения в процессе концентрирования ЭПС, к тому же минимизирована биологическая деградация молекул в течении короткого времени фильтрации. В качестве осадителей используются в промышленности такие растворители как ацетон, метанол, этанол и пропанол. Для экстракции биополимеров из культуральной жидкости тестировались различные растворители (этанол, метанол, диэтиловый эфир, ацетон, бутанол, пропанол, изоамиловый спирт, толуен, ксилен, бензен и хлороформ). Этиловый спирт требует около 24 часов для качественного осаждения БЭПС, в то время как метиловый спирт осаждал практически сразу после добавления. Диэтиловый эфир и ацетон также хорошо осаждают, но требуют более 24 ч. Остальные растворители не эффективны в качестве осадителей [9]. На количество растворителя, необходимого для осаждения большое влияние оказывает концентрация катионов в культуральной жидкости, с повышением которых существенно снижается количество растворителя. Для этих целей применяется ввод нитрата кальция и хлорида калия. Одним из недостатков способа осаждения растворителем - это необходимость в дорогостоящей последующей

стадии дистилляции больших объемов растворителя. Другая проблема - соосаждение белков, солей пигментов, которые загрязняют готовый продукт. Особое внимание уделяется стадии отделения клеток-продуцентов БЭПС, белков, нежелательных полимеров и примесей от извлекаемого БЭПС. Для отделения клеток применяют способ центрифугирования, режим работы которого зависит от вязкости жидкости. Процедура сепарации может сопровождаться предварительной термообработкой для дезактивации живых клеток (90 - 95 °С) [33]. Для извлечения трудноотделяемых клеток применяется добавление деионизированной воды перед центрифугированием. Для отделения прочносвязанных капсулированных БЭПС (биопленки) необходимо осуществлять предварительную экстракцию, которая зависит от природы связи клетки и полисахарида. Распространено применение различных реагентов, в частности, гидроксида натрия, других реагентов (буферные соли, ЭДТА, формальдегид, катионообменные смолы и др.) и ферментов (амилазы, протеазы и др.) [34, 35]. Применяют различные физические методы - ультразвуковую обработку, автоклавирование, нагрев, ультрафильтрацию, диализ и др. и комплексную обработку, например, кипячение клеточной суспензии в воде в течение 15 мин, нагрев до 60 °С в физиологическом растворе, нагрев до 65 °С в фенольном растворе и т.д. [34]. В составе конечного продукта могут содержаться различные низкомолекулярные вещества, соли, протеины и пр. Для достижения необходимой степени чистоты могут применяться следующие процессы: переосаждение полимеров из дистиллированной воды, химическая депротеинизация кислотами или ферментами, мембранные процессы - ультрадильтрация. Все эти операции должны быть осуществлены с учетом выхода продукта, степенью чистоты и свойствами полимеров и нуждаются в разработке новых методов и подходов [36, 37]. В качестве примера современного подхода к производству БПС представлен техпроцесс производства клинического декстрана с целью увеличения его выхода, а также получения фруктозы, как ценного сопродукта. С этой целью декстранасахаразу получали в результате непрерывной ферментации в неаэрируемых условиях, затем фермент извлекался в процессе непрерывной последовательной ультрацентрифугации и ультрафильтрации после чего использовался для синтеза декстрана в в непрерывнодействующем противоточном хроматографическом реакторе-сепараторе. Мембранная фильтрация и непрерывная эксклюзионная хроматография применялась для фракционирования и получения клинического декстрана и выделения фруктозы. Оптимизация стоимости продукта достигалась исключением стадии обработки этанолом и его рекуперации [38, 39, 40]. Выводы Потребление БЭПС имеет выраженную тенденцию роста в различных областях промышленности. Сдерживающими факторами их интенсивного промышленного внедрения является несовершенство технологии производства и вследствие этого высокая себестоимость продукции.

Совершенствование биотехнологии БЭПС требует поиска эффективных решений, как по совершенствованию штаммов бактерий-продуцентов, так и технических и технологических решений производственного процесса. Большинство патентов в области производства БЭПС посвящены их применению в различных областях, генетической инженерии бактерий и способам (технологиям) производства. Большого внимания также требует разработка эффективного оборудования для ферментации и выделения полимеров из питательной среды. В отличие от большинства микробиологических производств, технология биополимеров требует новых подходов к массообменным и теплообменным процессам. В частности, первоочередными вопросами являются задачи повышения выхода с единицы объема аппаратов в условиях повышенной вязкости, повышение чистоты от сопутствующих клеточных компонентов, снижение затрат на стадии концентрирования и сушки полимеров с высокой водосвязывающей способностью.