

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій
Кафедра біотехнології, шкіри та хутра

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему:

«Оцінювання ефективності методів виділення ЕПС бактеріальних за
стаціонарних умов культивування»

Рівень вищої освіти другий (магістерський)

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Освітня програма Біотехнологія високомолекулярних сполук

Виконав: студент 2 курсу, групи МгБТ-24

Цуканов І.С.

Науковий керівник: к.т.н., доц. Охмат О.А.

Рецензент: к.т.н., доц. Волошина І.М.

Київ 2025

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

Факультет	<u>хімічних та біофармацевтичних технологій</u>
Кафедра	<u>біотехнології, шкіри та хутра</u>
Рівень вищої освіти	<u>другий (магістерський)</u>
Спеціальність	<u>162 Біотехнології та біоінженерія</u>
Освітня програма	<u>Біотехнологія високомолекулярних сполук</u>

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри БШХ

_____ Олена МОКРОУСОВА

«_____» _____ 2025 р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТУ**

Цуканову Івану Сергійовичу

1. Тема кваліфікаційної роботи: **Оцінювання ефективності методів виділення ЕПС бактеріальних за стаціонарних умов культивування**

Науковий керівник роботи Охмат Олена Анатоліївна, к.т.н., доц.
затверджені наказом КНУТД від «16» вересня 2025 року № 209-уч

2. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи: завдання на кваліфікаційну роботу; наукова література щодо методів виділення ЕПС бактеріальних за стаціонарних умов культивування; матеріали науково-дослідної та переддипломної практик.

3. Зміст кваліфікаційної роботи: вступ, огляд літератури, об'єкт, мета та методи дослідження, експериментальна частина, висновки, список використаних джерел, додатки.

4. Дата видачі завдання 16.09.2025 р.

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапу кваліфікаційної роботи	Орієнтовний термін виконання	Примітка про виконання
1	Вступ	10.04.2025	
2	Розділ 1 Огляд літератури	15.04.2025	
3	Розділ 2 Об'єкт, мета та методи дослідження	25.09.2025	
4	Розділ 3 Експериментальна частина	04.10.2025	
5	Висновки	27.10.2025	
6	Оформлення (чистовий варіант)	15.11.2025	
7	Подача кваліфікаційної роботи науковому керівнику для відгуку (за 14 днів до захисту)	02.12.2025	
8	Подача кваліфікаційної роботи для рецензування (за 12 днів до захисту)	05.12.2025	
9	Перевірка кваліфікаційної роботи на наявність ознак плагіату (за 10 днів до захисту)		Коефіцієнт подібності _____% Коефіцієнт цитування _____%
10	Подання кваліфікаційної роботи на підпис завідувачу кафедри (за 7 днів до захисту)		

З завданням ознайомлений:

Студент

_____ Іван ЦУКАНОВ

Науковий керівник роботи

_____ Олена ОХМАТ

АНОТАЦІЯ

Цуканов І. С. Оцінювання ефективності методів виділення ЕПС бактеріальних за стаціонарних умов культивування.

Кваліфікаційна робота за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія. – Київський національний університет технологій та дизайну, Київ, 2025 рік. – Рукопис.

Кваліфікаційна робота присвячена порівняльному оцінюванню ефективності різних методів виділення бактеріальних екзополісахаридів, які продукуються в умовах стаціонарного культивування.

Для виділення бактеріальних екзополісахаридів у роботі використано методи осадження холодним спиртом, лужно-кислотний метод, а також методи екстрагування з використанням етилендіамінтетраоцтової кислоти та її комбінації з формальдегідом. Для ідентифікації екзополісахаридів у роботі використано метод FTIR-спектроскопії.

Ключові слова: бактеріальні екзополісахариди, екстрагування, стаціонарні умови культивування, методи виділення.

ABSTRACT

Tsukanov I. S. Evaluating the Efficiency of Methods for Isolating Bacterial EPS under Stationary Cultivation Conditions.

Qualification thesis in specialty 162 Biotechnology and Bioengineering. – Kyiv National University of Technology and Design, Kyiv, 2025. – Manuscript.

The qualifying work is devoted to a comparative assessment of the effectiveness of various methods for isolating bacterial exopolysaccharides produced under stationary cultivation conditions.

Cold alcohol precipitation, an alkaline-acid method, and extraction methods using ethylenediaminetetraacetic acid and its combination with formaldehyde were used to isolate bacterial exopolysaccharides. FTIR spectroscopy was used to identify the exopolysaccharides.

Keywords: bacterial exopolysaccharides, extraction, stationary cultivation conditions, isolation methods.

ЗМІСТ		Стор.
АНОТАЦІЯ.....		4
ЗМІСТ.....		6
ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК І ТЕРМІНІВ.....		8
ВСТУП.....		9
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....		12
1 Бактеріальні екзополісахариди як об'єкт біотехнології		12
1.1 Визначення та хімічна природа бактеріальних екзополісахаридів.....		12
1.2 Продуценти екзополісахаридів та їхнє біологічне значення.....		13
1.3 Галузі застосування бактеріальних екзополісахаридів.....		15
1.4 Виділення екзополісахаридів.....		17
1.5 Фактори, що впливають на біосинтез екзополісахаридів.....		19
1.5.1 Вплив температури.....		19
1.5.2 Вплив поживного середовища.....		19
1.5.3 Вплив рівня рН.....		19
Висновки до розділу 1.....		20
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....		21
2.1 Мета, об'єкт та предмет дослідження.....		21
2.2 Характеристика поживного середовища.....		21
2.3 Характеристика біологічного агента.....		22
2.3.1 Характеристика біологічного агента <i>Hafnia sp.</i>		22
2.3.1.1 Таксономічне положення.....		22
2.3.1.2 Морфолого-культуральні властивості.....		23
2.3.1.3 Фізіолого-біохімічні ознаки.....		23
2.3.2 Характеристика біологічного агента <i>Pseudomonas sp.</i>		24
2.3.2.1 Таксономічне положення.....		24
2.3.2.2 Морфолого-культуральні властивості.....		25
2.3.2.3 Фізіолого-біохімічні ознаки.....		26
2.4 Методи виділення екзополісахаридів.....		26
2.4.1 Екстрагування осадження холодним 96 % спиртом.....		26

2.4.2	Екстрагування з використанням етилендіамінтетраоцтової кислоти.....	27
2.4.3	Екстрагування етилендіамінтетраоцтової кислоти з формальдегідом.....	28
2.2.4	Лужно-кислотний метод.....	28
2.5	Проведення ІЧ-спектроскопічного аналізу з використанням FTIR.....	28
	Висновки до розділу 2.....	29
РОЗДІЛ 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....		30
3.1	Спиртове осадження екзополісахаридів.....	30
3.2	Кислотна екстрагування екзополісахаридів.....	31
3.3	Екстрагування екзополісахаридів з використанням етилендіамінтетраоцтової кисоти	32
3.4	Екстрагування екзополісахаридів з використанням етилендіамінтетраоцтової кисоти та формальдегіду.....	34
3.5	Порівняння ефективності методів екстрагування екзополісахаридів.....	35
3.6	Ідентифікація функціональних груп екзополісахаридів методом інфрачервоної спектроскопії.....	36
	Висновки до розділу 3.....	40
ВИСНОВКИ.....		41
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....		42
ДОДАТКИ.....		46

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК І ТЕРМІНІВ

ЕПС – екзополісахариди

БЕПС – бактеріальні екзополісахариди

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ВСТУП

Екзополісахариди (ЕПС) є цінним класом біополімерів, які набувають все більшого значення у біотехнології, фармацевтиці, харчовій та косметичній промисловостях завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям, таким як висока в'язкість, гелеутворювальна здатність, а також біологічна активність (антиоксидантна, протипухлинна, пребіотична). Бактеріальні екзополісахариди (БЕПС) є основним компонентом біоплівки, що захищає продуцент від несприятливих умов, та має ряд перспективних напрямів застосування у різних галузях.

Ефективність виробництва ЕПС значною мірою залежить не лише від оптимізації умов культивування, але й від технології виділення та очищення кінцевого продукту. Часто біотехнологічні процеси, особливо на початкових етапах розробки або в умовах економічної доцільності, проводять у стаціонарних умовах культивування тобто без примусової аерації чи перемішування. Ці умови призводять до утворення більш гетерогенної культуральної рідини зі значним вмістом клітинних домішок та продуктів автолізу, що ускладнює подальше виділення чистого екзополісахариду.

Таким чином, оцінювання та порівняльний аналіз існуючих методів виділення ЕПС з культуральної рідини, отриманої саме у стаціонарних умовах, є актуальним науково-практичним завданням. Це дозволить обрати найбільш ефективний та економічно виправданий протокол, що забезпечить високий вихід екзополісахаридів при мінімальному рівні забруднення.

Об'єктом дослідження є процес виділення бактеріальних екзополісахаридів із культуральної рідини, отриманої в умовах стаціонарного культивування.

Предметом дослідження є ефективність, вихід та якісні характеристики бактеріальних екзополісахаридів, отриманих за допомогою різних методів виділення та очищення, а також вплив цих методів на чистоту кінцевого продукту.

Метою дослідження кваліфікаційної роботи є оцінка ефективності різних методів виділення бактеріальних екзополісахаридів, синтезованих в умовах стаціонарного культивування, для оптимізації процесу їх отримання та підвищення виходу цільового продукту.

Для досягнення мети роботи поставлені такі **завдання**:

- обґрунтувати актуальність дослідження через аналіз сучасних напрямів застосування екзополісахаридів у різних галузях;
- проаналізувати методи виділення бактеріальних екзополісахаридів для;
- здійснити екстрагування екзополісахаридів з культуральної рідини, отриманої в стаціонарних умовах культивування біологічних агентів, кількома методами;
- визначити кількісний вихід екзополісахаридів для кожного методу екстрагування та провести порівняльний аналіз;
- ідентифікувати екзополісахариди у дослідних зразках.

Методи дослідження налічують різні способи екстрагування екзополісахаридів та їх спектрофотометричні дослідження.

Дослідження здійснені в умовах навчально-наукової лабораторії «Перспективні біоматеріали та технології» КНУТД. Науковими консультантами дослідження виступили доцент кафедри, к.б.н., доц. Юнгін О. С. та асистент кафедри Калініченко О. О.

Наукова новизна дослідження полягає в порівняльній характеристиці ефективності чотирьох ключових методів виділення бактеріальних екзополісахаридів, отриманих у стаціонарних умовах культивування.

Результати роботи мають **практичне значення** для біотехнологічної галузі, оскільки дозволяють обрати найбільш ефективний та економічно доцільний метод виділення бактеріальних екзополісахаридів при культивуванні в стаціонарних умовах.

Апробація результатів роботи проведена на двох конференціях всеукраїнського та міжнародного рівнів:

1. XI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених та здобувачів освіти «Науково-практичні розробки молодих учених в хімічній, харчовій та парфумерно-косметичній галузях промисловості», присвячена 65-річчю Херсонського національного технічного університету, 22 листопада 2024 р., Хмельницький, ХНТУ (Додаток А).

2. II Міжнародна науково-практична конференція «Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія», присвячена 95-річчю Київського національного університету технологій та дизайну, 30–31 жовтня 2025 р., Київ, КНУТД;

Перелік публікації:

1. Olga Iungin, Volodymyr Morin, Oleksandr Kalinichenko, Olena Okhmat, **Ivan Tsukanov**. EPS synthesized by antarctic plant-associated bacteria as a source of functional biopolymers for chemical technology. *Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія* : збірник тез II Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 95-річчю Київського національного університету технологій та дизайну, 30-31 жовтня 2025 року / упор. : Мокроусова О. Р., Плавач В. П., Майстренко Л. А. Київ : КНУТД, 2025. С. 23 (Додаток Б).

2. **Цуканов І. С.**, Колесник Т. О., Калініченко О. О., Охмат О. А. Бактеріальні екзополісахариди як об'єкт біотехнології. *Інноваційні матеріали та технології: біотехнологія, прикладна хімія, екологія* : колективна монографія / упор. : Мокроусова О. Р., Плавач В. П., Майстренко Л. А. Київ : КНУТД, 2025. Друк (Додаток В).

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Кваліфікаційна робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків, списку використаних джерел, 3 додатків. Загальний обсяг кваліфікаційної роботи налічує 56 сторінок.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Бактеріальні екзополісахариди як об'єкт біотехнології

1.1 Визначення та хімічна природа бактеріальних екзополісахаридів

Полісахариди є макромолекулами, що входять до складу вуглеводів і є однією з найважливіших та найбільш поширених груп сполук, які продукуються бактеріями, грибами та водоростями. Бактеріальні полісахариди або екзополісахариди є найпоширенішими компонентами біополімерів, які виконують різні функції.

Відповідно до функціональних ознак екзополісахариди класифікують на кілька категорій: структурні, сорбційні, поверхнево-активні, інформаційні, з окиснювально-відновною активністю [1].

Відповідно до хімічного складу розрізняють гомо- і гетерополісахариди.

Гомополісахариди (від грец. homo – однаковий) – це екзополісахариди, які складаються лише з одного типу моносахаридної ланки (мономеру), що багаторазово повторюється, з'єднаного глікозидними зв'язками. Складаються виключно з одного виду цукру, найчастіше це глюкоза (декстран, целюлоза бактеріальна, пулулан). Зазвичай мають відносно просту, лінійну або слаборозгалужену структуру. Глюкани (α -D і β -D), фруктани та галактани – основні мономери в гомополісахаридах, пов'язаних, як правило, β -1,4 або β -1,3 і α -1,2 або α -1,6 зв'язками. Перші наділяють полімери властивостями жорсткості, другі забезпечують гнучкість молекул [1, 2].

Гетерополісахариди (від грец. heteros – інший, різний) – це екзополісахариди, які складаються з двох і більше різних типів моносахаридних ланок або їхніх похідних, які утворюють регулярну повторювану одиницю (олігосахаридний повтор). Містять різноманітні цукри, такі як:

- глюкоза, галактоза, маноза, рамноза;

- аміноцукри (наприклад, N-ацетилглюкозамін);
- уронові кислоти (наприклад, глюкуронова, галактуронова кислоти);
- нецукрові компоненти (ацетильні, піруватні або сульфатні групи).

Гетерополісахариди утворені D-глюкозою, D-галактозою, L-рамнозою, наприклад, у випадках N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), Нацетилгалактозамін (GalNAc) або глюкуронової кислоти (GlcA). Основні зв'язки мономерів представлені тими ж зв'язками, що і гомополісахаридів. Характеризуються складною, часто розгалуженою структурою, що надає їм унікальних функціональних властивостей (висока в'язкість при низьких концентраціях, здатність до утворення гелів) [1-3].

У біотехнологічних процесах екзополісахариди виконують ряд функцій:

- слугують матрицями для іммобілізації клітин і ферментів, що сприяє їхній стабільності та можливості багаторазового використання як біокаталізаторів;
- входять до складу біоплівки, які створюють захист для мікроорганізмів під час процесу ферментації;
- виконують роль біофлокулянтів, сприяючи ефективному очищенню води та обробці стічних розчинів.

1.2 Продуценти екзополісахаридів та їх біологічне значення

Майже всі бактерії можуть продукувати певні типи позаклітинних полімерів, але лише деякі групи є важливими комерційними або дослідницькими продуцентами екзополісахаридів з унікальними властивостями (табл. 1.1).

Таблиця 1.1 – Основні групи бактерій-продуцентів ЕПС [4]

Група бактерій	Рід	Тип ЕПС	Комерційне значення
Протео-бактерії	<i>Xanthomonas campestris</i>	Ксантанова камідь (гетеро-ЕПС)	Найбільш комерційно важливий продукт з високою в'язкістю: стабілізатор у харчовій та нафтовій промисловості
	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Альгінати	Біоматеріали, заміна рослинних альгінатів при гелеутворенні
	<i>Acetobacter</i> (<i>Komagataeibacter xylinus</i>)	Бактеріальна целюлоза (гомо-ЕПС)	Біомедична галузь (штучна шкіра, носії АФІ), високоміцні композити
Фірмікути	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Декстран (гомо-ЕПС)	Фармацевтична галузь (замінники плазми крові), хроматографія
	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.	ЕПС молочнокислих бактерій	Функціональні продукти харчування (пробіотики, загущувачі, пребіотики)
Ціанобактерії	<i>Nostoc</i> spp., <i>Aphanocapsa</i> spp.	Ціано-полісахариди	Перспективні біоактивні властивості (антиоксидантні, противірусні)

Екзополісахариди не є життєвонеобхідними для внутрішньоклітинного метаболізму бактерій, але вони відіграють критичну роль у виживанні, адаптації та взаємодії мікроорганізмів із зовнішнім середовищем (табл. 1.2).

Таблиця 1.2 – Біологічне значення ЕПС для клітини-продуцента [4]

Роль ЕПС	Вплив
Захисна функція (глікокалікс)	ЕПС утворюють захисний шар (капсулу або слизовий шар), який запобігає висиханню (десикації) клітин, захищає від фагоцитозу імунними клітинами та від токсичних речовин (важких металів, антибіотиків).
Формування біоплівки	ЕПС є ключовим компонентом матриксу біоплівки, забезпечуючи механічну стабільність, адгезію клітин до поверхонь та їхню когезію (зчеплення між собою). Це критично важливо для колонізації поверхонь.
Адгезія та колонізація	Дозволяють бактеріям прикріплюватися до поверхонь (грунт, рослини, тканини господаря, медичні імпланти) та починати процес колонізації.
Накопичення поживних речовин	ЕПС може зв'язувати та концентрувати іони металів і поживні речовини (особливо воду), створюючи мікросередовище, сприятливе для росту.
Імуномодуляція (для патогенів)	У патогенних бактерій капсульні ЕПС часто слугують фактором вірулентності, приховуючи клітину від розпізнавання імунною системою господаря.
Рух і дисперсія	Деякі типи ЕПС можуть сприяти руху колоній або, навпаки, їхній дисперсії (розсіюванню) при зміні умов.

1.3 Галузі застосування бактеріальних екзополісахаридів

Бактеріальні екзополісахариди знаходять широке застосування в різних галузях промисловості, включаючи агропромисловий комплекс та сферу охорони здоров'я.

ЕПС ефективно використовують для: збільшення нафтовидобутку, виготовлення упаковки для харчових продуктів, виготовлення косметичних засобів, капсулювання лікарських препаратів та біологічно активних

компонентів (антиоксиданти, вітаміни, пробіотики тощо) з метою збереження їх властивостей, збагачення складу продуктів для відгодівлі тварин тощо.

У харчовій промисловості ЕПС використовують як загусники, стабілізатори та емульгатори у виробництві соусів, напоїв, десертів тощо. У фармацевтичній промисловості та медицині ЕПС використовують завдяки їх біосумісності та нетоксичності. Сфера застосування включає виробництво біоматеріалів, капсул та мікросфер; носіїв АФІ, у тому числі з контрольованим вивільненням активної речовини; імуномодуляторів, допоміжних речовин та основ для виготовлення лікарських форм, медичних виробів для загоювання ранових поверхонь [5].

Зазначена доволі широка область застосування ЕПС потребує ґрунтовного вивчення процесів біосинтезу бактеріальних екзополісахаридів, включаючи їх склад, структурні характеристики, функціональні властивості та продуктивність мікроорганізмів-продуцентів [6,7].

Завдяки спроможності ефективно утримувати вологу і створювати захисний бар'єр на поверхні шкіри ЕПС є важливим компонентом у складі зволожувальних кремів, масок, шампунів, сироваток тощо.

ЕПС активно використовують для біоремедіації ґрунту та водних ресурсів. Вони ефективно зв'язують важкі метали, токсичні речовини та нафтопродукти [8]. Завдяки здатності екзополісахаридів до біологічного розкладання, їх застосування є екологічно безпечним і перспективним у розрізі пошуку альтернативних синтетичних полімерних матеріалів.

Окремі екзополісахариди, які синтезуються азотфіксуючими бактеріями, такими як *Rhizobium* та *Azotobacter*, позитивно впливають на структуру ґрунту, сприяють збереженню вологості та збільшують його родючість, застосовуються як біостимулятори для росту рослин і захисні засоби проти посухи [9].

Отже, ЕПС є унікальними біополімерами, сучасні дослідження яких зосереджені на вдосконаленні технологій отримання і розширенні напрямів їх застосування [10].

1.4 Виділення екзополісахаридів

Екзополісахариди є високомолекулярними біополімерами, які продукуються і виділяються мікроорганізмами в оточуюче середовище. Вони відіграють ключову роль у формуванні біоплівки, забезпеченні захисту клітин від впливу стресових чинників, а також сприяють їх взаємодії з іншими мікроорганізмами та організмом-носієм [11, 12]. Дослідження властивостей екзополісахаридів і розробка їх практичного застосування в біотехнології, харчовій, фармацевтичній та медичній промисловості вимагають впровадження ефективних методів їх виділення та очищення. Типова технологія виділення екзополісахаридів налічує стадії:

1. Попередня підготовка біомаси.

Першим етапом виділення екзополісахаридів є відділення біомаси клітин від культуральної рідини. Вибір методології екстрагування залежить від умов культивування мікроорганізмів та може включати різні підходи: використання центрифугування для відокремлення клітин від культуральної рідини; застосування фільтрації через мембрани з різним рівнем пористості; проведення обробки теплом або ультразвуком, що сприяє виділенню екзополісахаридів, асоційованих з поверхнями клітин.

2. Методи виділення екзополісахаридів.

Для виділення ЕПС застосовують низку методів:

- хімічне екстрагування передбачає використання хелатуючих агентів, зокрема етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА), формальдегіду або натрію гідроксиду для руйнування міжмолекулярних зв'язків і виділення екзополісахаридів;
- фізико-хімічні способи включають нагрівання, автоклавування, ультразвукову обробку чи застосування мікрохвильового опромінювання;
- механічні методи передбачають інтенсивне струшування чи гомогенізацію, сприяють відокремленню поверхневих полісахаридів.

3. Осадження та концентрування.

Для виділення екзополісахаридів з культуральної рідини застосовують низку методів:

- осадження за допомогою спиртів, таких як етанол або ізопропанол. Це один із найпоширеніших способів, що дозволяє отримати концентровану фракцію ЕПС;
- сольове осадження із використанням реагентів, наприклад, ацетату натрію або сульфату амонію;
- мембранна фільтрація, включаючи ультрафільтрацію та нанофільтрацію, яка забезпечує селективне концентрування високомолекулярних фракцій.

4. Очищення екзополісахаридів.

Отримані полісахариди можуть містити домішки, такі як білки, нуклеїнові кислоти, залишкові компоненти середовища. Для їх видалення застосовуються наступні методи:

- проведення діаліз проти дистильованої води або буферних розчинів;
- хроматографічні методи, зокрема гель-фільтрацію, іонообмінну хроматографію тощо;
- ферментативна обробка, що забезпечує розщеплення небажаних білкових або нуклеїнових домішок.

Сучасні наукові тенденції акцентують увагу на інтеграції традиційних методів виділення із інноваційними нанотехнологіями та удосконаленими мембранними системами. Значний інтерес викликають автоматизовані безперервні системи виділення, які характеризуються високою ефективністю та стабільністю отриманих даних. Крім того, активний розвиток спостерігається у сфері застосування екологічно ощадних методів екстрагування, що базуються на мінімізації використання токсичних та/або агресивних хімічних реагентів [13-17].

1.5 Фактори, що впливають на біосинтез екзополісахаридів

1.5.1 Вплив температури

Температура істотно впливає на активність ферментів, задіяних у процесі біосинтезу. Надмірно високі температури призводять до зниження активності ферментів через денатурацію білкових структур. Для більшості бактерій оптимальний температурний діапазон складає 25-35 °С. Низькі температури можуть уповільнювати темпи зростання, але в деяких випадках сприяють накопиченню більш в'язких ЕПС [7].

1.5.2 Вплив поживного середовища

Склад середовища для культивування є одним з основних чинників. Ефективним є використання глюкози, сахарози чи лактози. Встановлено, що обмеження вмісту азоту або фосфору в поживному середовищі зазвичай призводить до посиленого утворення полісахаридів [7].

1.5.3 Вплив рівня рН

Подібно до температури, рівень рН необхідно оптимізувати для кожного конкретного штаму-продуцента, оскільки він впливає на активність ферментів, задіяних у процесі синтезу. Оптимальний рівень рН залежить від конкретного виду мікроорганізму і зазвичай становить 6,0-7,5 [15, 18, 19].

Висновки до розділу 1

У роботі проаналізовано літературні джерела щодо природи, складу та сфери застосування екзополісахаридів.

Розглянуто основні методи виділення та очищення екзополісахаридів. Проведений огляд підтверджує, що наявні методики виділення потребують оптимізації, оскільки універсального, високоефективного та відтворюваного підходу до виділення екзополісахаридів не існує. Перспективним напрямом є удосконалення комбінованих методів, які дозволяють підвищити вихід і чистоту продукту при мінімальному впливі на його структуру.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МЕТА ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Мета, об'єкт та предмет дослідження

Метою дослідження кваліфікаційної роботи є оцінка ефективності різних методів виділення бактеріальних екзополісахаридів, синтезованих в умовах стаціонарного культивування, для оптимізації процесу їх отримання та підвищення виходу цільового продукту.

Об'єктом дослідження є процес виділення бактеріальних екзополісахаридів із культуральної рідини, отриманої в умовах стаціонарного культивування.

Предметом дослідження є ефективність, вихід та якісні характеристики бактеріальних екзополісахаридів, отриманих за допомогою різних методів виділення та очищення, а також вплив цих методів на чистоту кінцевого продукту.

2.2 Характеристика поживного середовища

Під час експерименту для культивування та дослідження використовували середовище поживний бульйон (NB, Nutrient Broth, HiMedia Ltd.) [20].

Склад поживного середовища традиційно вміщує джерела азоту, мінералів та вітамінів. Для експериментальних досліджень у роботі застосовували середовище наступного складу, г/л:

- пептичний перевар тваринної тканини – 5,0;
- м'ясний екстракт – 1,5;
- дріжджовий екстракт – 1,5;
- натрію хлорид – 5,0.

Кінцеве значення рН середовища становило 7,4 за температури 25°C.

Поживне середовище NB, використане у дослідженні, має рідку консистенцію; його відносять до середовищ загального призначення для культивування широкого спектру мікроорганізмів і часто для отримання великої кількості біомаси. Для приготування рідкого середовища з його порошкоподібної форми суспендували у колбі 13,0 грамів у 1000 мл дистильованої води. Для повного розчинення середовища його нагрівали. Стерилізацію приготованого рідкого середовища проводили у колбах з ватно-марлевою пробкою в автоклаві під тиском 1,0 атм упродовж 15 хвилин [21-22].

2.3 Характеристика біологічного агенту

В роботі досліджували два штами *Hafnia sp.* 25.2 (далі в тексті інакулят 25.2 або 25.2) та *Pseudomonas sp.* 39.4 (далі в тексті інакулят 39.4 або 39.4), які були виділені з *D.antarctica* та *C.quitensis*, які були відібрані під час 25 Української антарктичної експедиції (січень-квітень 2020 рік) вздовж Західної частини Антарктичного півострова. Штами вирощувались на рідкому поживному середовищі NB упродовж 6 діб у флаконах за температури 25 °C.

2.3.1 Характеристика біологічного агенту *Hafnia sp.*

2.3.1.1 Таксономічне положення

Бактерії роду *Hafnia* належать до великої групи ентеробактерій, яка включає багато відомих патогенів та коменсалів [23, 24].

Домен – Бактерії.

Тип – Протеобактерії.

Клас – Гамма-протеобактерії.

Порядок – Ентеробактеріальні.

Родина – Гафніацеї (*Hafniaceae*) – раніше входила до *Enterobacteriaceae*.

Рід – *Hafni*.

Найпоширеніший вид – *Hafnia alvei*.

Hafnia – рід паличкоподібних безкапсульних аспорогенних рухомих, грамнегативних, факультативно-анаеробних бактерій (рис. 2.1).

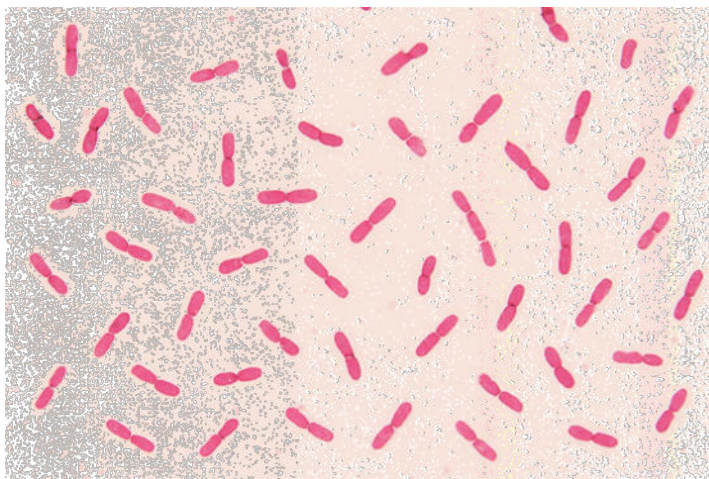


Рисунок 2.1 – Зовнішній вигляд *Hafnia*

2.3.1.2 Морфолого-культуральні властивості

Hafnia належить до родини *Enterobacteriaceae* і є грамнегативною паличкоподібною бактерією розмірами $0,3-1,0 \times 1,0-3,0$ мкм. Вказані бактерії можуть бути нерухомими або слабкорухомими, причому деякі штами мають перитрихціальні джгутики. *Hafnia* не утворюють спор і капсул. При фарбуванні за Грамом забарвлюються в рожевий колір [23].

Бактерії добре розвиваються на стандартних поживних середовищах, таких як м'ясо-пептонний агар та бульйон. Оптимальною температурою для їхнього росту вважається режим $35-37^{\circ}\text{C}$, хоча вони здатні розмножуватися в діапазоні температур від 20 до 44°C .

На м'ясо-пептонному агарі спостерігається утворення сірого або безбарвного кольору колоній, діаметр яких становить 2-4 мм. Вказані колонії мають опуклу форму, гладку текстуру та блискучу поверхню. На середовищах Ендо або МакКонкі формуються безбарвні колонії. Ріст колоній добре відбувається в анаеробних умовах [23,24].

2.3.1.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

Hafnia є факультативним анаеробом. Деякі штами мають здатність продукувати біогенні аміни, наприклад, гістамін, у харчових продуктах [23]. *Hafnia* може спричиняти псування м'яса, молочних і рибних продуктів під час

їх зберігання в умовах холодильника. Біохімічні властивості наведені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1 – Біохімічні властивості *Hafnia*

Ознака	Біохімія
Оксидаза	негативна
Каталаза	позитивна
Нітратредуктаза	позитивна
Індол	позитивна
Уреаза	слабопозитивна
H ₂ S	негативна
Лізин-декарбоксилаза	позитивна
Орнітин-декарбоксилаза	позитивна
Аргінін-дегідролаза	негативна
Ферментація глюкози	позитивна
Лактоза	негативна
Сахароза	позитивна
Маніт	позитивна
Сорбіт	позитивна
Цитрат (Сіммонса)	позитивна
Вирощування при 4°C	<i>Hafnia psychrotolerans</i> проявляє холодостійкість

2.3.2 Характеристика біологічного агенту *Pseudomonas sp.*

Pseudomonas sp. – це рід грамнегативних, аеробних та рухливих бактерій, що входять до великої групи γ-протеобактерій. Представники цього роду зустрічаються у ґрунті, воді, на поверхні рослин, а також у медичних середовищах.

2.3.2.1 Таксономічне положення

Домен – Бактерії.

Тип – Pseudomonadota (раніше - *Proteobacteria*).

Клас – Гамма-протеобактерії.

Порядок – Pseudomonadales.

Родина – Pseudomonadaceae.

Рід – *Pseudomonas* Migula.

Бактерії роду *Pseudomonas* (рис. 2.2) займають важливе таксономічне місце серед грамнегативних бактерій і характеризуються великою метаболічною різноманітністю [23-26].

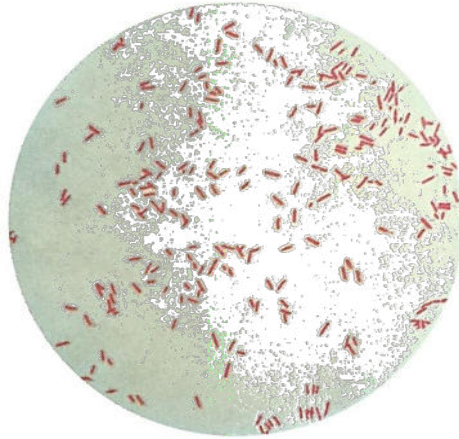


Рисунок 2.2 – Зовнішній вигляд *Pseudomonas* sp.

2.3.2.2 Морфолого-культуральні властивості

Морфологічні характеристики бактерій роду *Pseudomonas* доволі уніфіковані, що має велике значення для їх попередньої ідентифікації.

Їх форма – паличкоподібна (бацили).

Бактерії роду *Pseudomonas* відносять до грамнегативних, вони забарвлюються в червоний або рожевий колір при фарбуванні за Грамом.

Переважно рухливі завдяки наявності полярно розташованих джгутиків (зазвичай одного чи кількох на одному кінці клітини).

Аспорогенні, спори не утворюють.

Більшість *Pseudomonas* є суворими (облігатними) аеробами і добре ростуть на простих поживних середовищах. Однією з найбільш характерних культуральних ознак *Pseudomonas* є утворення пігментів, що дифундують у середовище [24-26].

2.3.2.3 Фізіолого-біохімічні ознаки

Представників роду *Pseudomonas* відрізняє характерна метаболічна пластичність та адаптивність до різноманітних умов навколишнього середовища. Фізіолого-біохімічні особливості цих мікроорганізмів обумовлюють їхню здатність до виживання в багатьох екосистемах, а також визначають їх функціонування як умовно-патогенних мікробів [25].

Біохімічні тести є критичними для ідентифікації *Pseudomonas* та вирізнення їх у масі інших грамнегативних бактерій (наприклад, *Enterobacterales*).

Фізіолого-біохімічні ознаки роду *Pseudomonas*, зокрема їхня аеробна природа, оксидазо-позитивна реакція, здатність до окиснення вуглеводів та утворення пігментів, дозволяють їм займати домінуючі позиції у водних, ґрунтових екосистемах, а також відноситися до категорії умовно-патогенних мікроорганізмів [23, 26].

2.4 Методи виділення екзополісахаридів

Для екстрагування екзополісахаридів в роботі застосовано чотири незалежні методи:

1. осадження спиртом,
2. використання для екстрагування етилендіамінтетраоцтової кислоти,
3. використання для екстрагування етилендіамінтетраоцтової кислоти в комбінації з формальдегідом,
4. лужно-кислотний метод екстрагування.

2.4.1. Екстрагування осадженням холодним 96 % спиртом

Метод екстрагування осадженням холодним 96 % спиртом використовують для виділення екзополісахаридів без використання хімічних розчинників або нагрівання. Для реалізації методу передбачена попередня підготовка зразків. Культуральну рідину або змив біоплівки

відцентрифугувували для видалення клітин, після чого проводили осадження. Реалізація методу осадження передбачає додавання охолодженого 96 % етилового спирту до зразка зібраного супернатанту у співвідношенні 2:1 або 3:1 відповідно.

Отриману суміш інкубували за температури 4°C (або нижче) упродовж 12 годин, після чого осаджений ЕПС відділяли центрифугуванням [29].

2.4.2 Екстрагування з використанням етилендіамінтетраоцтової кислоти

Виділення ЕПС також можна провести методом екстрагування з використанням етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) [30]. Цей метод базується на використанні хелатуючого агента ЕДТА для звільнення ЕПС від клітинної стінки. Зазначений метод передбачає здійснення ряду етапів:

Етап 1: промивання (виділення слизової фракції). Зразки біоплівки (масою приблизно 1 г) вміщували в центрифужні пробірки з 25 мл дистильованої води. Пробірки обережно струшували, а потім центрифугували при 3500 об/хв упродовж 10 хвилин. Слизову фракцію ЕПС збирали після видалення з пробірок супернатанту. Супернатант також збирали, а промитий зразок слизової фракції ЕПС об'ємом 1 мл доводили до об'єму 25 мл дистильованою водою.

Етап 2: відділення капсульованого матеріалу. Після промивання вміст пробірки з осадом біоплівки доводили до об'єму 25 мл. Вміст перемішували на вортексі на високій швидкості упродовж 1 хвилини для вивільнення капсульованого ЕПС.

Для отримання дослідного комбінованого зразка ЕПС, розведений дистильованою водою до об'єму 25 мл, з 1 та 2 етапів змішували. Потім до 10 мл отриманого комбінованого зразка додавали 10 мл 2 % розчину ЕДТА. Отриману суміш витримували у пробірках за температури 4 °C упродовж 3 годин без перемішування. Після чого пробірки центрифугували при 14 000 об/хв упродовж 20 хвилин за температури 4 °C.

2.4.3. Екстрагування етилендіамінтетраоцтовою кислотою в комбінації з формальдегідом

Для виділення ЕПС із бактеріальних клітин застосовували також метод екстрагування за допомогою ЕДТА в комбінації з формальдегідом. Попередньо бактеріальну біомасу осаджували центрифугуванням і промивали фізіологічним розчином при 3500 об/хв упродовж 10 хвилин. Далі до суспензії додавали розчин ЕДТА, що забезпечує руйнування зовнішніх структур клітинної стінки та вивільнення полісахаридів у розчин. Додавання невеликої кількості формальдегіду запобігає руйнуванню полісахаридів і денатурації білків. Отриману суміш інкубували за контрольованої температури 30°C, після чого центрифугували при 3900 об/хв для відділення клітинного осаду. Надосадову рідину використовували для подальшої очистки та кількісного визначення екзополісахаридів [31].

2.4.4. Лужно-кислотний метод екстрагування

Метод використовувався для виділення фракції ЕПС шляхом її розчинення в лузі та подальшого осадження при низькому рН [32].

Лужна обробка передбачає додавання Na_2CO_3 (0,5 г на 100 мл рідини) до культуральної рідини. Отриману суміш нагрівали упродовж 30 хв. за температури 80 °C. Потім виконували перше центрифугування при 3 900 об/хв упродовж 20 хв. Супернатант збирали.

Кислотне осадження ЕПС здійснювали шляхом додавання до супернатанту 2 М HCl до рівня рН 2.2. Після чого проводили повторне центрифугування упродовж 25 хв для відділення ЕПС.

2.5 Проведення ІЧ-спектроскопічного аналізу з використанням FTIR

Для ідентифікації функціональних груп у складі очищених ЕПС використовували метод інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR) [33]. Спектральний аналіз проводився у діапазоні 4000–400 cm^{-1} з використанням Bruker IFS 66 (micro-FTIR), за умов кімнатної температури, при спектральній роздільній здатності 2 cm^{-1} і накопиченні 32 сканувань.

Висновки до розділу 2

Для реалізації поставлених у роботі завдань та досягнення її мети обрано комплекс методів дослідження.

Для реалізації етапу екстрагування ЕПС та порівняння результатів обрано 4 методи. А саме: екстрагування осадженням холодним 96 % спиртом, екстрагування з використанням етилендіамінтетраоцтової кислоти, екстрагування з використанням етилендіамінтетраоцтової кислоти в комбінації з формальдегідом, лужно-кислотний метод.

Для ідентифікації функціональних груп у складі очищених екзополісахаридів запропоноване використання методу інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR).

РОЗДІЛ 3

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Спиртове осадження екзополісахаридів

Найбільш поширеним підходом до виділення екзополісахаридів є осадження полісахаридів додаванням до культуральної рідини органічного розчинника, зокрема холодного етанолу 96 % концентрації. Зауважимо, що вказаний метод використовувався як контрольний у даній роботі.

Після етапу культивування біологічних агентів культуральну рідину (звільнену від клітин шляхом центрифугування) змішували з 96 % етанолом у співвідношенні, достатньому для осадження полісахаридів, і витримували за низької температури. У разі наявності достатньої кількості ЕПС, вони випадають в осад, який можна зібрати та висушити. Проте в наших експериментах при додаванні етанолу видимого осаду не утворилося. Тому розчин після додавання етанолу, був витриманий 24 години за температури 20°C, та випарений досуха, а отриманий сухий залишок зважено. Цей залишок містить не лише цільові полісахариди, а й розчинені компоненти середовища, що не випали в осад (рис. 3.1).

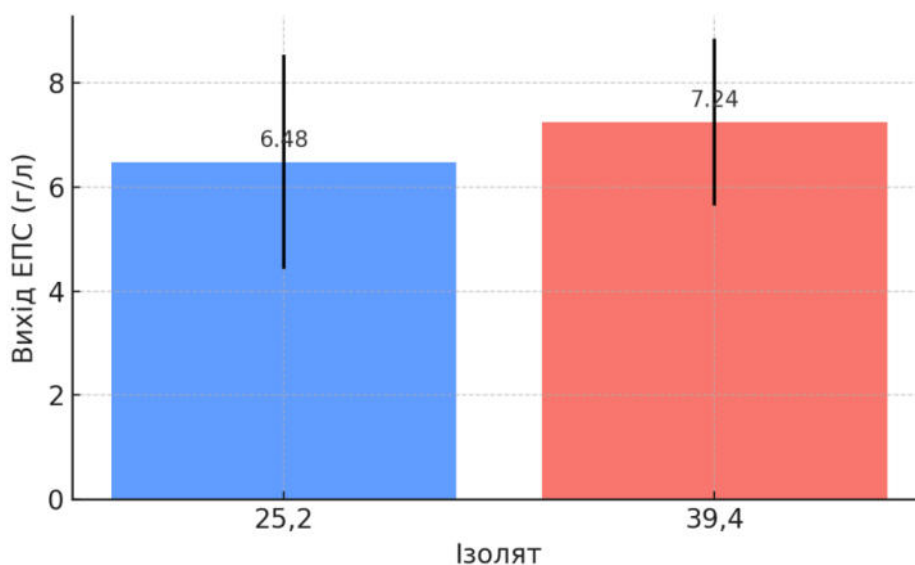


Рисунок 3.1 – Вихід сухого залишку після осадження етанолом для ізолятів 25,2 та 39,4 (контрольний метод)

Як показано на рис. 3.1, кількість сухого залишку становила ~ 6.48 г/л для ізоляту 25,2 та $\sim 7,24$ г/л для ізоляту 39,4. На перший погляд, ці значення співставні з виходом ЕПС за методами 2.4.2 – 2.4.4, однак слід враховувати, що в даному випадку практично весь залишок – це складові поживного середовища (солі, залишкові поживні речовини тощо), оскільки чистого полісахаридного осаду не утворилося. Іншими словами, реальний вихід ЕПС при спиртовому осадженні низький.

Оцінюючи чистоту отриманих зразків, можна припустити, що з $\sim 6,5$ – $7,25$ г/л сухого залишку лише певна частка (ймовірно не більше половини) припадає на власне екзополісахариди.

Таким чином, контрольний метод виявився менш ефективним хоча загальна маса залишку велика, кількість ЕПС при цьому низька. Цей результат вказує на те, що без додаткових прийомів осадження етанолом недостатньо для виділення екзополісахаридів у ізолятів 25.2 та 39.4.

3.2 Кислотне екстрагування екзополісахаридів

Кислотне екстрагування полягає у осадженні полісахаридів під дією сильних неорганічних кислот або в обробці осаду кислотними розчинами, що сприяє десорбції капсульних ЕПС з поверхні клітин.

У даній роботі культуральну рідину після росту ізолятів 25.2 та 39.4 піддавали дії соляної кислоти до значення рН 2,2 з наступним виділенням осаду ЕПС. Цей метод є відносно простим, проте низьке значення рН може частково гідролізувати або руйнувати полісахаридні ланцюги. На рис. 3.2 наведений вихід ЕПС при застосуванні кислотного екстрагування до ізолятів 25,2 та 39,4.

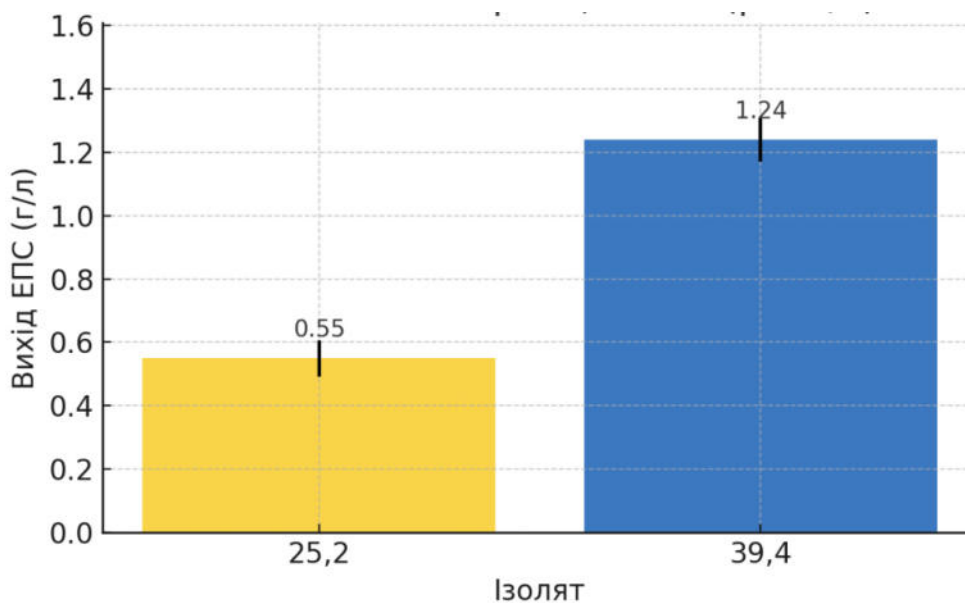


Рисунок 3.2 – Вихід ЕПС із ізолятів 25,2 та 39,4
при кислотному екстрагуванні

На графіках рис. 3.2 видно, що вихід ЕПС для обох штамів є найменшим серед досліджених методів. Ізолят 39,4 дав $\sim 1,24 \pm 0,069$ г/л полісахаридів, тоді як для ізоляту 25,2 отримано близько $0,55 \pm 0,018$ г/л. Отримані значення свідчать, що кислотне екстрагування вилучає лише незначну частину загальних ЕПС. Можливо, низький рН спричинив неповне осадження або часткове руйнування екзополісахаридів, що призвело до зменшення виходу.

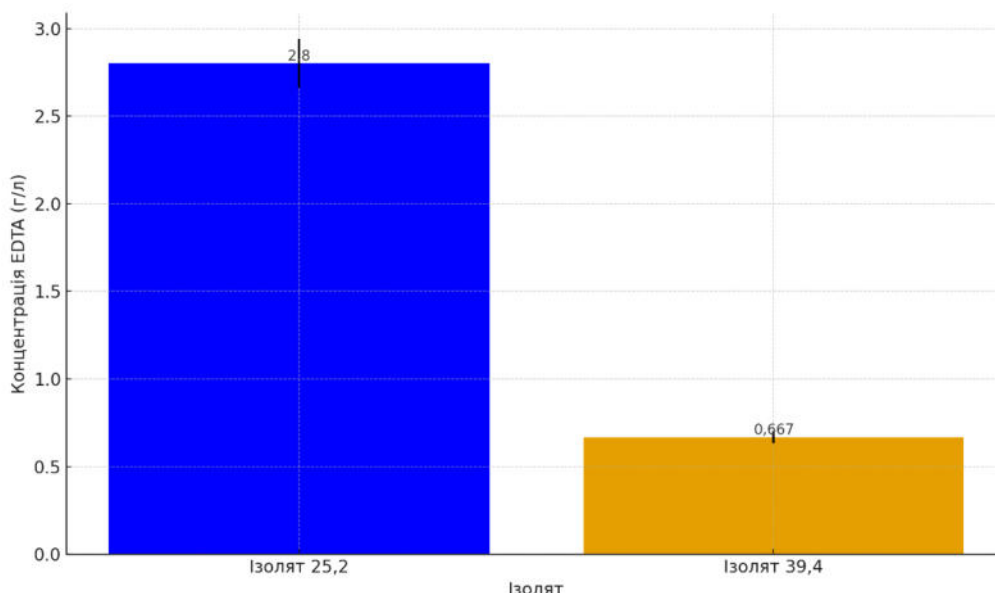
Незважаючи на обмежену ефективність, цей метод дозволив підтвердити наявність ЕПС у досліджених ізолятів, хоч і в невеликій кількості.

3.3 Екстрагування екзополісахаридів з використанням етилендіамінтетраоцтової кислоти

Для підвищення виходу капсульних полісахаридів був застосований метод екстрагування з хелатором ЕДТА, так званий халатний метод. Етилендіамінтетраоцтова кислота зв'язує двовалентні катіони, які стабілізують полісахаридно-білковий матрикс на поверхні клітин, тим самим руйнуючи структуру біоплівки та вивільняючи ЕПС у розчин. Процедура передбачала обробку клітинного осаду розчином ЕДТА з подальшим

відокремленням рідини, що містить вивільнені ЕПС, та їх осадженням. Цей метод відомий високою ефективністю вилучення ЕПС, оскільки не руйнує сам полісахарид, а лише відділяє його від клітин (рис. 3.3).

Рисунок 3.3 – Вихід ЕПС із ізолятів 25,2 та 39,4 при екстрагування з ЕДТА



Як видно з рис. 3.3, метод екстрагування з ЕДТА забезпечив значно більший вихід полісахаридів для ізоляту 39,4 порівняно з кислотним екстрагуванням. Для ізоляту 25,2 вихід ЕПС становив приблизно 2,8 г/л, тоді як ізолят 39,4 дав вихід близько 0,667 г/л. Таким чином, застосування ЕДТА дозволило вилучити майже весь ЕПС, синтезований бактеріями, що свідчить про високу ефективність цього методу.

Отримані результати свідчать про суттєву відмінність у виході екзополісахаридів між досліджуваними ізолятами. Ізолят 25,2 характеризувався значно вищим виходом ЕПС порівняно з ізолятом 39,4 що вказує на різну чутливість полісахаридних комплексів досліджуваних ізолятів до дії хелатуючого агента.

Отримані показники підтверджують літературні дані про ефективність ЕДТА для екстрагування капсульних ЕПС: хелатор вивільняє полісахариди, не пошкоджуючи їх, тому вихід є близьким до максимально можливого.

3.4 Екстрагування екзополісахаридів з використанням етилендіамінтетраоцтової кислоти та формальдегіду

Метод базується на обробці бактеріальної маси формальдегідом, який фіксує клітини і одночасно може сприяти вивільненню полісахаридів, адсорбованих на клітинних стінках. У деяких протоколах формальдегід поєднують із лужною обробкою гідроксидом натрію (NaOH) для підсилення ефекту, однак у нашому випадку застосовано лише формалін без додавання лугів. Після обробки формаліном клітини центрифугували, а ЕПС, що перейшов у розчин, осаджували й висушували для визначення виходу (рис. 3.4).

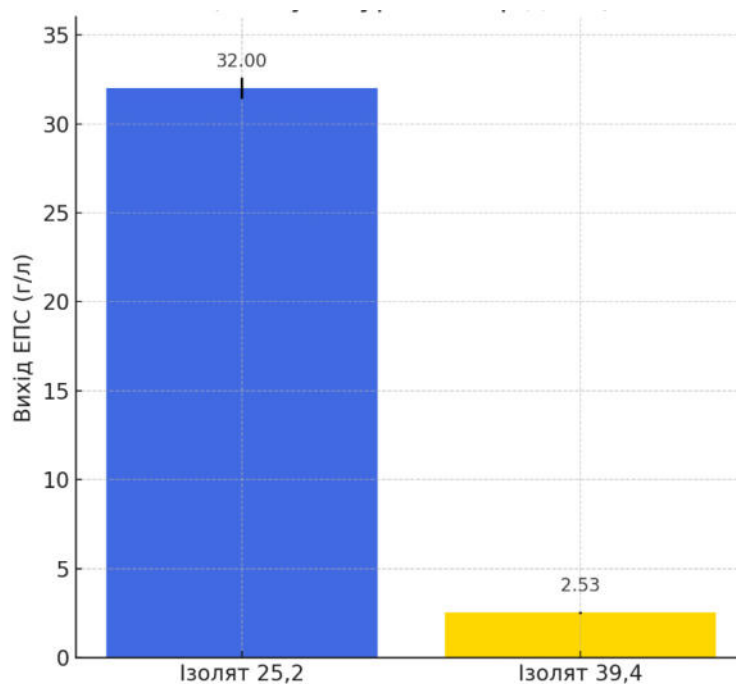


Рисунок 3.4 – Вихід ЕПС із ізолятів 25,2 та 39,4 при використанні комбінованого методу

Згідно з рис. 3.4, метод екстрагування за допомогою комбінації ЕДТА та формаліну показав найвищий вихід ЕПС для ізоляту 25,2 - близько 32 г/л, що майже вдесятеро перевищує відповідний показник для того ж ізоляту при використанні лише ЕДТА (~ 2,8 г/л).

У випадку ізоляту 39,4 результат був дещо протилежним: метод з ЕДТА забезпечив вихід $\sim 0,667$ г/л, тоді як комбінований метод - лише $\sim 2,6$ г/л. Така різниця свідчить про те, що ефективність методів екстрагування може залежати від індивідуальних властивостей біоплівки певного штаму. Очевидно, формалін значно полегшив вивільнення полісахаридів для обох дослідних зразків. Таким чином, комбінація ЕДТА з фіксуючим агентом демонструє потенціал до покращення вилучення ЕПС, однак ефективність методу залежить від особливостей ізоляту.

3.5 Порівняння ефективності методів екстрагування екзополісахаридів

Для оцінки ефективності застосованих у роботі чотирьох методів було побудовано узагальнений графік, що відображає вихід ЕПС (у перерахунку на г/л) з кожного ізоляту за кожним методом (рис. 3.5).

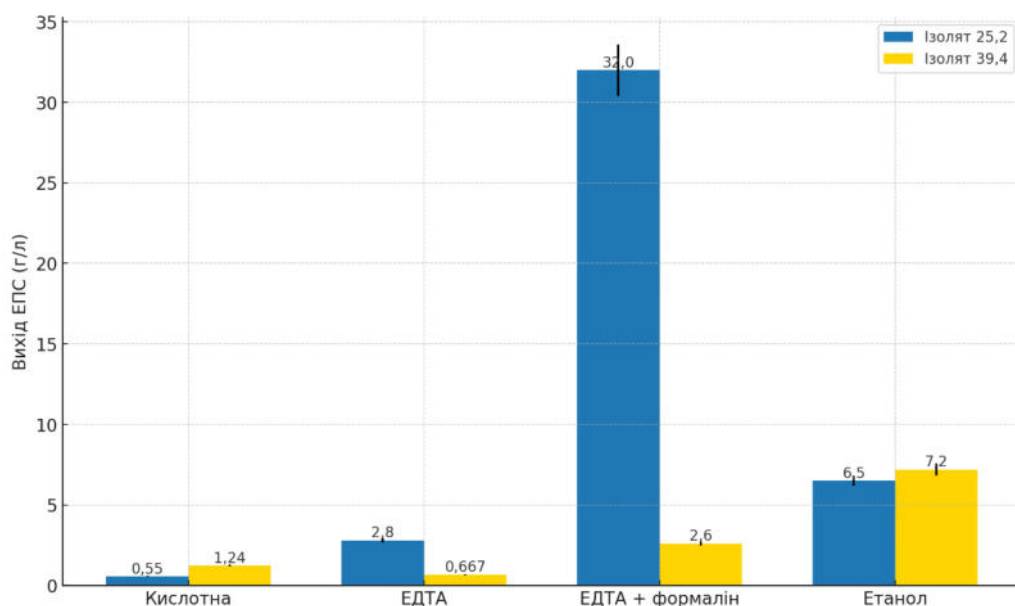


Рисунок 3.5 – Порівняння ефективності різних методів екстрагування ЕПС із ізолятів 25,2 та 39,4

Для узагальнення результатів дослідження було побудовано порівняльну гістограму, що ілюструє вихід екзополісахаридів (у г/л) для обох ізолятів за всіма методами екстрагування.

Як видно з рис. 3.5, найбільший вихід ЕПС спостерігався для методу, що передбачав застосування ЕДТА в комбінації з формальдегідом, для ізоляту 25,2 (~ 32 г/л), що суттєво перевищує ефективність інших методів.

У той же час для ізоляту 39,4 найефективнішим виявився комбінований метод екстрагування з використанням ЕДТА та формаліну при якому вихід ЕПС становив близько 2,6 г/л, однак він залишався істотно нижчим, ніж для ізоляту 25,2, що вказує на виразні штам-специфічні особливості структури біоплівки.

Кислотне екстрагування демонструвало найнижчий вихід для обох ізолятів (від 0,55 до 1,24 г/л), що узгоджується з його меншою ефективністю та ймовірним руйнуванням полісахаридів при низькому рН.

Спиртовий метод (контрольний у дослідженні) показав середній номінальний вихід ЕПС (~ 6,5-7,2 г/л). Проте, як зазначалося раніше, зразок екстрагованого при цьому ЕПС містить значну кількість домішок поживного середовища, тому реальний вміст ЕПС у сухому залишку суттєво нижчий.

3.6 Ідентифікація функціональних груп екзополісахаридів методом інфрачервоної спектроскопії

Фур'є-інфрачервона спектроскопія є ефективним методом аналізу функціональних груп у біополімерах і широко застосовується для підтвердження полісахаридної природи.

Усі ЕПС мають характерні смуги поглинання на ІЧ-спектрах, зумовлені коливаннями хімічних зв'язків у молекулі вуглеводня. Таким чином, ІЧ-аналіз було обрано як метод для підтвердження наявності екзополісахаридних комплексів у зразках.

Інфрачервоні спектри реєстрували у діапазоні $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ з роздільною здатністю 4 см^{-1} . Аналіз проводили на Bruker IFS 66 (micro-FTIR), з використанням методу загального повного відбиття (рис. 3.6, 3.7).

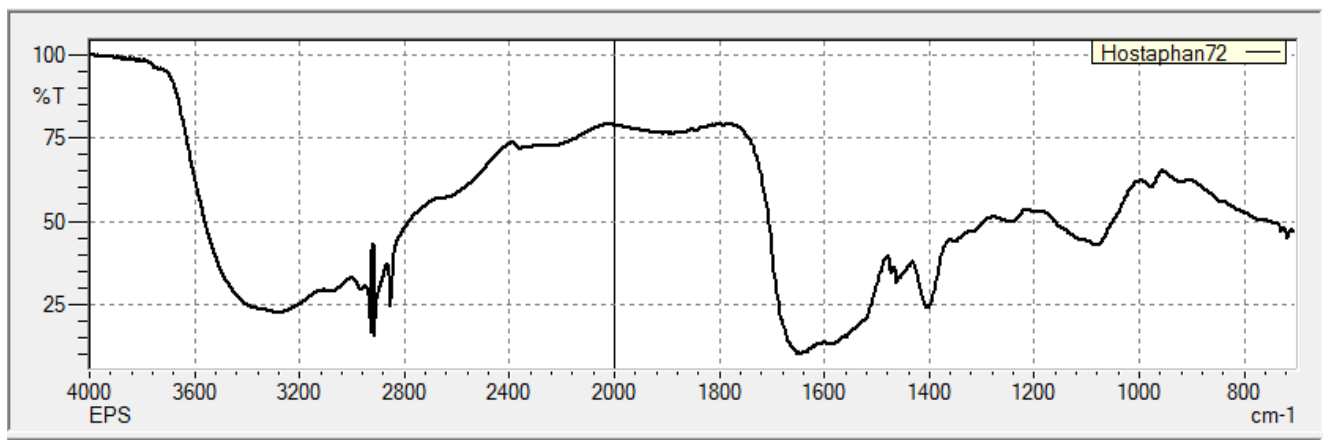


Рисунок 3.6 – ІЧ-спектр екзополісахаридів, виділених із дослідного зразку 25,2

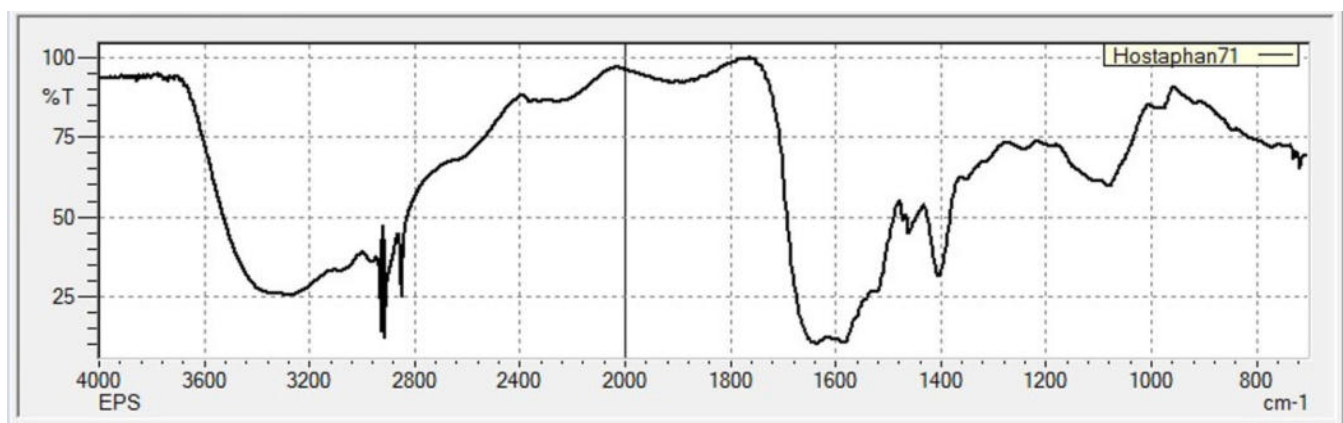


Рисунок 3.7 – ІЧ-спектр екзополісахаридів, виділених із дослідного зразку 39,4

Інфрачервоний спектр осадженого екзополісахариду продемонстрував ряд характерних смуг, притаманних полісахаридам.

В області $\sim 3200\text{--}3400\text{ см}^{-1}$, спостерігається інтенсивна широка смуга поглинання що відповідає валентним коливанням гідроксильних груп (--OH) і свідчить про наявність численних --OH фрагментів, об'єднаних розгалуженою системою водневих зв'язків [34].

У ділянці $2800-3000\text{ см}^{-1}$ зафіксовано піки середньої інтенсивності, які відповідають валентним коливанням зв'язків $-\text{CH}$ у складі аліфатичних фрагментів $-\text{CH}_2/-\text{CH}_3$ полісахаридного ланцюга [35].

В області «відбитку» інфрачервоного діапазону ($1200-900\text{ см}^{-1}$) спостерігаються інтенсивні смуги, що належать коливанням $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ та $-\text{C}-\text{O}$ в глікозидних зв'язках полімеру. Зокрема, сильні смуги поглинання $\sim 1150-1070\text{ см}^{-1}$ асоціюються з коливаннями глікозидних зв'язків моносахаридних залишків, характерних для полісахаридів [36, 37].

Також наявна смуга в області $\sim 880-900\text{ см}^{-1}$, яку можна віднести до деформаційних коливань піранозних кілець моносахаридів [38].

Відсутність помітного піку поглинання біля $\sim 1730\text{ см}^{-1}$ свідчить про брак вільних карбонільних груп органічних кислот у складі ЕПС, тобто про відсутність уронових кислот чи інших естерифікованих компонентів.

Сукупність виявлених піків – широкої $-\text{OH}$ смуги, валентних коливань $-\text{CH}$, інтенсивних смуг глікозидних зв'язків – чітко вказує на наявність у зразку полімерної вуглеводної сполуки, що підтверджує присутність екзополісахариду в отриманому осаді.

Окрім типових полісахаридних сигналів, ІЧ-спектр досліджуваних зразків містив смуги, що вказують на домішки білкової та мінеральної природи. Зокрема, у спектрі проявляються зони поглинання в областях $\sim 1650\text{ см}^{-1}$ та $\sim 1540\text{ см}^{-1}$, які не є характерними для чистих полісахаридів.

Пік поблизу $1640-1650\text{ см}^{-1}$ можна співвіднести з коливаннями $-\text{C}=\text{O}$ груп – у чистому ЕПС це могла б бути карбоксилатна група уронової кислоти, проте поява вираженої смуги саме в цій зоні разом із смугою $\sim 1540\text{ см}^{-1}$ однозначно вказує на наявність амідних зв'язків білків.

Смуги $\sim 1650\text{ см}^{-1}$ (амід I) та $\sim 1540\text{ см}^{-1}$ (амід II) є характерними для пептидних груп – їх присутність у спектрі свідчить, що до осаду ЕПС співосадилися білкові домішки або залишкові компоненти середовища.

Враховуючи, що поживний бульйон (NB), на якому культивувалися бактерії, містить пептони, можна припустити, що саме компоненти

середовища стали джерелом цих білкових домішок. Неповне видалення білків під час осадження призвело до того, що їхні пептидні групи проявили себе в ІЧ-спектрі, що може створювати спектральну картину, подібну до соєвих білків які входять до складу пептонів.

Окрім білкових домішок, у висушеному екстракті могли залишатися неорганічні солі з поживного середовища. Такі залишкові солі також здатні вносити додаткові сигнали в спектр – наприклад, сульфат-іони мають смуги поглинання в районі $\sim 1200-1100\text{ см}^{-1}$, що може накладатися на основні вуглеводні піки.

Висновки до розділу 3

Було проведено порівняльну оцінку чотирьох методів екстрагування ЕПС із 25,2 і 39,4. Найнижчий вихід полісахаридів ($\sim 0,55$ - $1,24$ г/л) був зафіксований при кислотній екстрагування, що пояснюється ймовірним гідролізом ЕПС у кислому середовищі. Контрольний метод спиртового осадження продемонстрував формально вищі показники ($\sim 6,5$ - $7,2$ г/л), однак через значний вміст домішок не може вважатися специфічним для вилучення екзополісахаридів.

Найефективнішими виявилися методи з використанням хелатора ЕДТА та його комбінації з формаліном. Особливо високий вихід ($\sim 32,0$ г/л) при комбінованому методі було отримано для ізоляту 25,2, що вказує на специфічні особливості структури біоплівки.

ІЧ-спектральний аналіз підтвердив полісахаридну природу осаджених речовин: спектри містили характерні смуги для глікозидних зв'язків, гідроксильних та аліфатичних груп.

Крім того, у зразках були виявлені домішки білкового та мінерального походження, що, ймовірно, походять із компонентів поживного середовища.

ВИСНОВКИ

1. Проведений аналіз літературних джерел підтвердив відсутність універсального, високоефективного та відтворюваного методу виділення ЕПС, що обґрунтувало актуальність дослідження, спрямованого на удосконалення комбінованих методів.

2. Для виділення бактеріальних екзополісахаридів у роботі застосовані чотири незалежних методи: осадження холодним спиртом, лужно-кислотний метод, а також екстрагування з використанням хелатора ЕДТА та його комбінації з формальдегідом. Для ідентифікації речовин використано метод FTIR-спектроскопії.

3. Порівняльна оцінка отриманих дослідних екзополісахаридів показала, що традиційний метод кислотного екстрагування має найнижчий вихід цільового продукту. Спиртовим осадженням можна досягти високого виходу екзополісахаридів, які містять значну кількість домішок.

4. Найефективнішими виявилися методи з використанням хелатора ЕДТА та його комбінації з формальдегідом, які забезпечили найвищий вихід екзополісахаридів (до $\sim 32,0$ г/л для ізоляту 25,2). Це підтверджує, що для вилучення екзополісахаридів, асоційованих з біоплівкою, найбільш перспективним є використання хелатуючих та денатуруючих агентів.

5. ІЧ-спектральний аналіз підтвердив полісахаридну природу виділених речовин (наявність глікозидних, гідроксильних та аліфатичних груп), хоча й виявив наявність домішок білкового та мінерального походження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ільїна Т. С. Біоплівки як спосіб існування бактерій у навколишньому середовищі та організмі господаря: феномен, генетичний контроль та системи регуляції їх розвитку. *Генетика*. 2004. № 40. С. 1-12.
2. Garth A. I. Biofilm in chronic wounds. *Wound. Rep. Reg.* 2008. Vol. 3, № 4. P. 26-28.
3. Смирнова Т. А., Діденко Л. С., Азізбекян Р. Р., Романова Ю. М., Структурно-функціональна характеристика бактеріальних біоплівок. *Мікробіологія*. 2010. С. 435-446.
4. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. №15(2). P. 167-193.
5. Franklin M. J., Chang C., Akiyama T., Bothner B. New Technologies for Studying Biofilms. In: *Microbial biofilms*. 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015. P. 1-32.
6. Сидоренко С. В. Роль бактеріальних біоплівок у патології людини. *Інфекції у хірургії*. 2004. Т. 2, №3. С. 16–20.
7. Ткачук Н. В. Біоплівки та біообростання : зб. лекцій для студентів та аспірантів природничих спеціальностей закладів вищої освіти. Чернігів : Десна Поліграф. 2023. 180 с.
8. Lourenco A., Ferreira A., Veiga N., Machado I., Pereira M.O., Azevedo N.F. BiofOmics: a web platform for the systematic and standardized collection of high-throughput biofilm data. *PLoS ONE*. 2012. 39960.
9. Pérez-Rodríguez G., GlezPena D., Azevedo N.F., Pereira M.O., Fdez-Riverola F., Lourenco A. Enabling systematic, harmonised and large scale biofilms data computation: the biofilms experiment workbench. *Comp. Meth. Progr. Biomed.* 2015. Vol. 118. P. 309-321.
10. Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J. The EPS matrix: The “house of biofilm cells”. *J. Bacteriol.* 189, 7945-7947. (2007).

11. Flemming H. C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. № 8. P. 623-633.
12. Ярош М. Б., Пирог Т. П., Скроцька О. І. Біологічна активність мікробних полісахаридів. *Наукові праці НУХТ*. 2020. Т. 26, № 6. С. 44-55.
13. Hall-Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews*. 2004. Vol. 2. P. 95-108.
14. Yadav M. K., Patra J. K., Vishnuprasad Ch. N., Das G. Role of Biofilms in Environment Pollution and Control. *Microbial Biotechnology. Applications in Agroculture and Environment*. Singapore : Springer Nature, 2017. Vol. 1. P. 377-398.
15. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013. № 3. a010306.
16. Stewart Ph. S. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. In: Microbial biofilms. 2nd edition. *Washington DS : Asm Press*. 2015. P. 269-285.
17. Zhao X., Zhao F., Wang J., Zhong N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv.* 2017. Vol. 7. P. 36670-36683. doi: 10.1039/C7RA02497E
18. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. In: Microbial biofilms. 2nd edition. *Washington DS: Asm Press*. 2015. P. 51-66.
19. Martinez-Checa F., Toledo F. L., Vilchez R., Quesada E., Calvo C. Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihulina* strain H28 in media containing various hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. Vol. 58, P. 358-363.
20. Nutrient Broth. URL: <https://www.himedialabs.com/us/m002-nutrient-broth.html> (дата звернення 29.10.2025).
21. Векірчик К. М. Практикум з мікробіології : [навчальний посібник] / К. М. Векірчик. Київ : Либідь, 2001. 144 с.

22. Гудзь С. П., Гнатуш С. О., Білінська І. С. Практикум з мікробіології : навч. посіб. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2003. 80 с.

23. Таксономічний довідник Національного центру біотехнологічної інформації Національної медичної бібліотеки США. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата звернення 30.10.2025).

24. Українська колекція мікроорганізмів. URL: <http://www.imv.kiev.ua/index.php/uk/katalog> (дата звернення 30.10.2025).

25. Louis Gardan, Patrizia Bella, Jean-Marie Meyer, Richard Christen, Philippe Rott, Wafa Achouak and Régine Samson. (2002). *Pseudomonas salomonii* sp. nov., pathogenic on garlic, and *Pseudomonas palleroniana* sp. nov., isolated from rice. URL: <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2065> (дата звернення 30.10.2025).

26. *Pseudomonas yamanorum* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from a subantarctic environment. URL: <https://doi.org/10.1099/ijls.0.065201-0> (дата звернення 30.10.2025).

27. Brock Biology of Microorganisms; 13th ed. : Benjamin Cummings, 2010.

28. Яворська Г. В., Гудзь С. П., Гнатуш С. О. Промислова мікробіологія: навчальний посібник. Львів : Видавничий дім ЛНУ імені Івана Франка, 2009. 256 с.

29. Degeest B., Janssens B., De Vuyst L. Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1: Production kinetics, enzyme activities and EPS yields. J Appl Microbiol. 2001; 91: 470–47.

30. Tolker-Nielsen T., Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P.K. eds. Biofilm Development. In: Microbial biofilms ; 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015. P. 51–66.

31. Stewart Ph. S., Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P. K. eds. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. In: Microbial biofilms ; 2nd edition. Washington DS : Asm Press, 2015. P. 269-285.

32. Oliveira R., Azeredo J., Teixeira P., Fonseca A. P. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. *BioLine*, 2001. P.11–22.

33. ІЧ- Фур'є спектроскопія. URL: <https://alt.ua/catalog/ik-furye-spektrometri> (дата звернення 10.11.2025).

34. Діапазон 3200-3500. URL: <https://www.pharmascigroup.us/articles/IJPSDR-9-148.php#:~:text=Absorption%20at%201418%20cm%5E%7B,1> (дата звернення 23.11.2025).

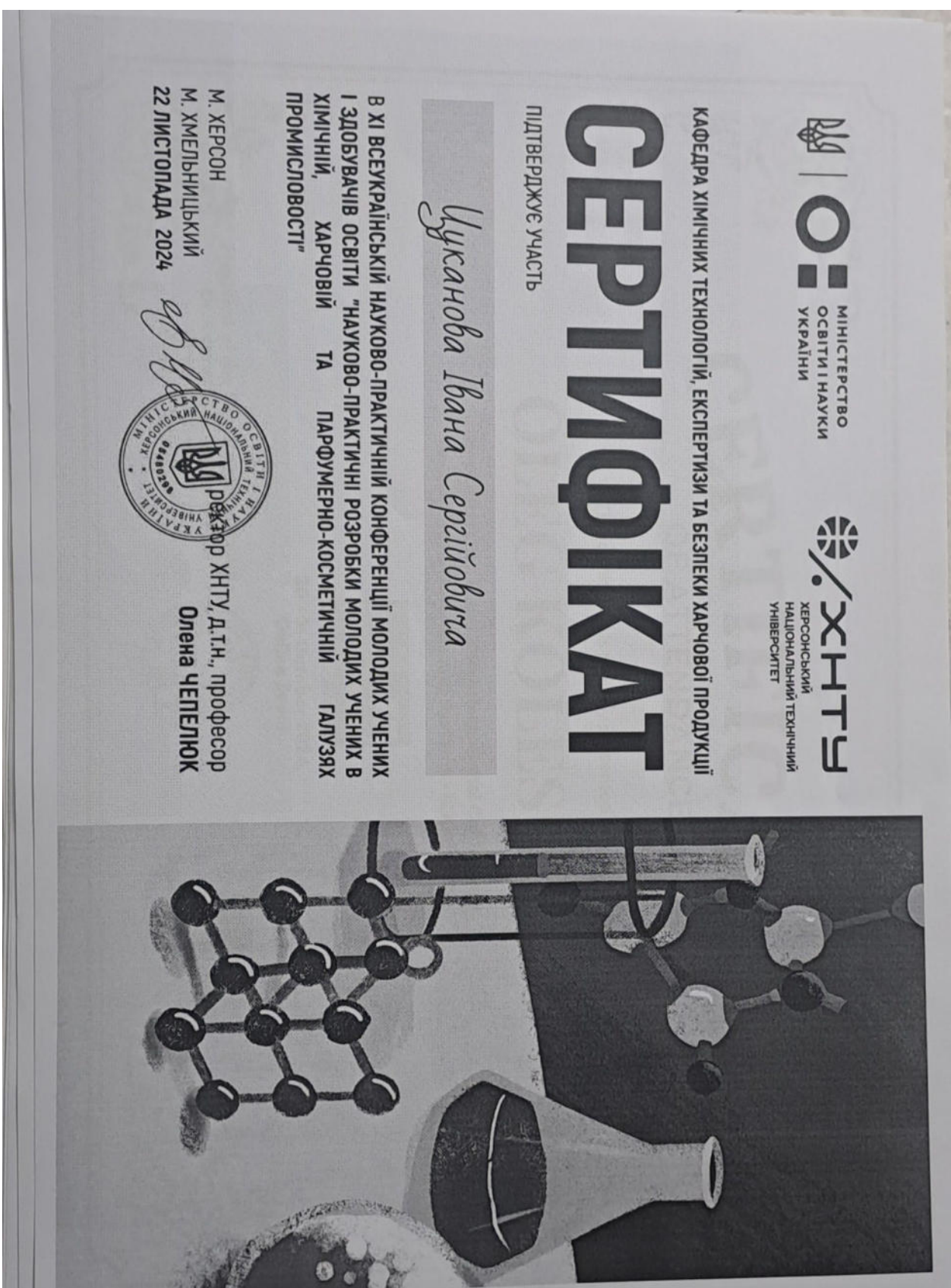
35. Діапазон 2800-3000. <https://www.frontiersin.org/journals/nutrition/articles/10.3389/fnut.2022.940442/full> (дата звернення 23.11.2025).

36. Діапазон 1200-1000. <https://pdfs.semanticscholar.org/4316/cfa43365806cc62da5f87080534b48227450.pdf#:~:text=3.3%20FT,plane> (дата звернення 23.11.2025).

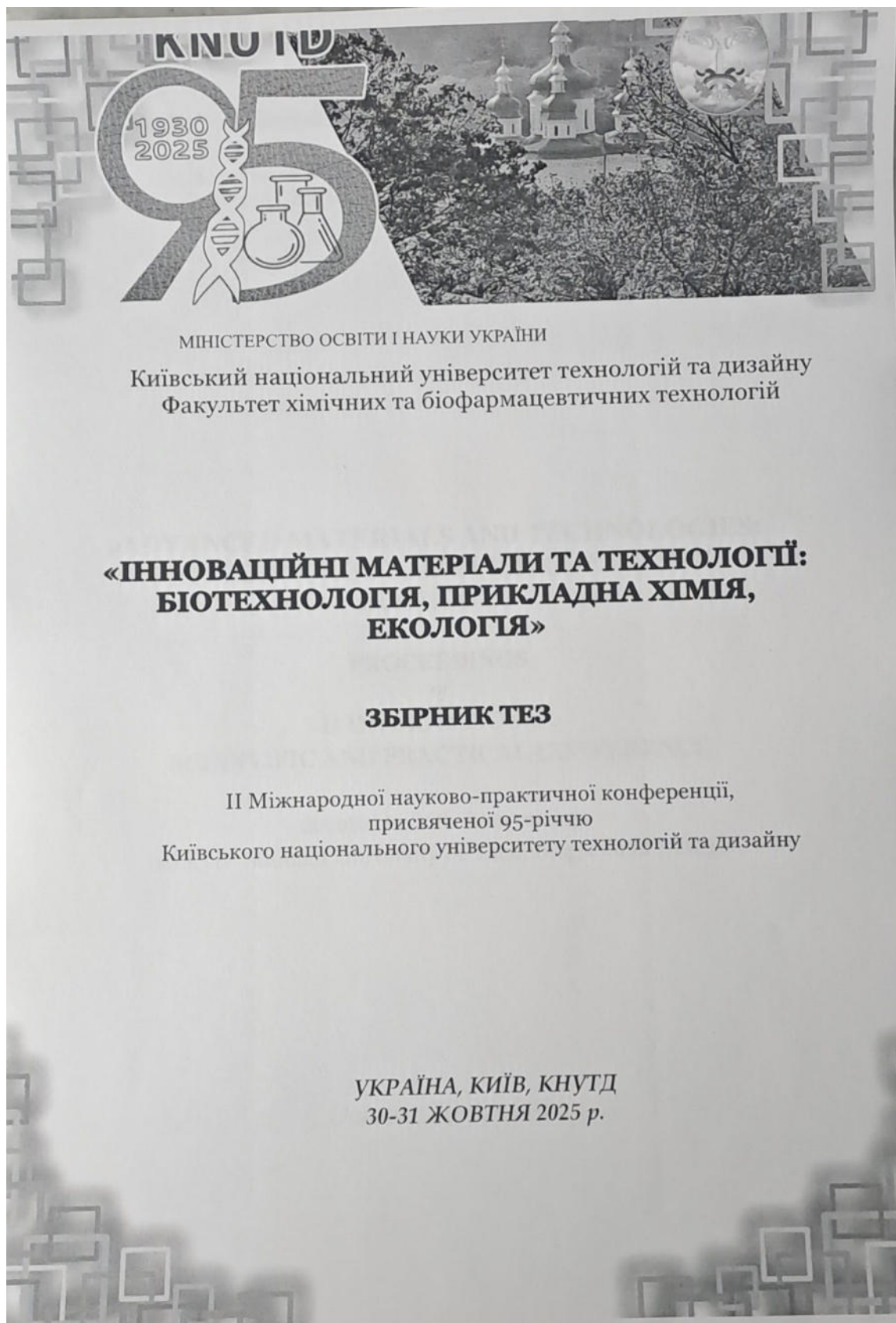
37. Діапазон 1150-1070. <https://acp.copernicus.org/articles/22/10489/2022/#:~:text=absorption%20peak%20of%20sulfate%20,analysis%20confirmed%20the%20presence%20of> (дата звернення 23.11.2025).

38. Діапазон 880-900. https://www.nature.com/articles/s41598-025-10392-5?error=cookies_not_supported&code=0e3c370d-0a01-432d-bb47-3d8253041f76#:~:text=C%3DO%20stretching%20or%20amide%20I,spectrum%20confirms%20the%20presence%20of (дата звернення 23.11.2025).

ДОДАТОК А



ДОДАТОК Б



Ministry of Education and Science of Ukraine

Kyiv National University of Technologies and Design
Faculty of Chemical and Biopharmaceutic Technologies

**«ADVANCED MATERIALS AND TECHNOLOGIES:
BIOTECHNOLOGY, APPLIED CHEMISTRY,
ECOLOGY»**

**PROCEEDINGS
of
II INTERNATIONAL
SCIENTIFIC AND PRACTICAL CONFERENCE**

devoted to 95th Anniversary
of Kyiv National University of Technologies and Design

October 30-31, 2025

ЗМІСТ		Стор.
1. BIOTECHNOLOGIES		
1	COLLAGEN HYDROLYSATE FILMS WITH BIOACTIVE ADDITIVES <i>Virgilijus Valeika, Inesa Degutytė</i>	16
2	BIOSYNTHESIS OPTIMIZATION OF SILVER NANOPARTICLES USING PLANT EXTRACTS <i>Madiha Ashraf, Ilona Jonuškienė, Kristina Kantminienė, Ingrida Tumosienė, Neringa Petraškauskienė</i>	17
3	RELATIONSHIP OF ELECTROCHEMICAL PERFORMANCE AND BIOFILM DEVELOPMENT OF <i>DESULFUROMONAS ACETEXIGENS</i> AND <i>GEOBACTER SULFURREDUCTENS</i> IN MICROBIAL ELECTROLYSIS CELLS <i>Max Rümenapf, Harald Horn, Andrea Hille-Reichel</i>	18
4	ARTIFICIAL INTELLIGENCE EMPOWERS THE DEVELOPMENT OF MATERIALS IN NEW PHARMACEUTICAL ENGINEERING: SCREENING AND APPLICATION OF POLYMER NANOPARTICLES <i>Wei Jia</i>	19
5	OT-RMSD: A GENERALIZATION OF THE ROOT-MEAN-SQUARE DEVIATION FOR ALIGNING UNEQUAL-LENGTH PROTEIN STRUCTURES <i>Yue Hu, Zanzia Cao, Yingchao Liu</i>	20
6	PROSPECTS FOR USING PLEUROTUS OSTREATUS EXTRACT IN TABLET FORM FOR PREVENTION OF ATHEROSCLEROSIS <i>Mykhailova K.I., Koziko N.O.</i>	21
7	RATIONAL <i>IN SILICO</i> DESIGN OF A PEPTIDE BINDER THAT INHIBITS CERTI <i>Franchuk Ye.R., Aleksandrovykh D.O., Zbrotskyi A.O., Zhuromskyi Ye.O.</i>	22
8	EPS SYNTHESIZED BY ANTARCTIC PLANT-ASSOCIATED BACTERIA AS A SOURCE OF FUNCTIONAL BIOPOLYMERS FOR CHEMICAL TECHNOLOGY <i>Olga Iungin, Volodymyr Morin, Oleksandr Kalinichenko, Olena Okhmat, Ivan Tsukanov</i>	23
9	OPTIMIZATION OF GLUTATHIONE BIOSYNTHESIS IN YEAST: TOWARD EFFICIENT BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF ANTIOXIDANTS <i>Dolia L., Starovoitova S.</i>	24
10	BIOFILM FORMATION AND BACTERIOCINOGENY AS MANIFESTATIONS OF BACTERIAL STIGMERGY <i>Balko O.B., Balko O.I., Avdeeva L.V.</i>	25
11	STUDY OF ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF EXTRACTS OF THE HERB <i>SPERANSKIA TUBERCULATA</i> (BUNGE) BAILL <i>Zeyuan Sun, Tetiana Derkach</i>	26
12	PHA AS A BIOFILM COMPONENT IN ENDOPHYTIC BACTERIA IN HARSH ENVIRONMENTS <i>Oleksandr Kalinichenko, Volodymyr Morin, Olga Iungin</i>	27
13	COMPUTATIONAL QSPR MODELING OF LIPOPHILICITY FOR ORGANIC DRUG- LIKE MOLECULES <i>Pushkarova Ya.M., Zaitseva G.M., Probyta A.A.</i>	28
14	UNVEILING THE HIDDEN DANGERS: A COMPREHENSIVE DISCUSSION OF HEALTH RISKS IN SYNTHETIC COSMETICS AND PERSONAL CARE PRODUCTS <i>Nodar Sulashvili, Nana Gorgaslidze, Luiza Gabunia, Marika Sulashvili, Marina Giorgobiani, Irine Zarnadze, Shalva (Davit) Zarnadze</i>	29
15	THE EVOLUTION OF BIOACTIVE COSMETICS: NAVIGATING SCIENCE, SAFETY, AND CONSUMER EXPECTATIONS IN MODERN DERMATOLOGY <i>Nodar Sulashvili, Nana Gorgaslidze, Luiza Gabunia, Marika Sulashvili, Marina Giorgobiani, Irine Zarnadze, Shalva (Davit) Zarnadze</i>	30

EPS SYNTHESIZED BY ANTARCTIC PLANT-ASSOCIATED BACTERIA AS A SOURCE OF FUNCTIONAL BIOPOLYMERS FOR CHEMICAL TECHNOLOGY

**Olga Iungin, Volodymyr Morin, Oleksandr Kalinichenko, Olena Okhmat,
Ivan Tsukanov**

Kyiv National University of Technologies and Design, Ukraine
olgaungin@gmail.com

Exopolysaccharides (EPS) produced by various microbial species represent a diverse and high-value class of biopolymers with significant potential for industrial and chemical applications. These biopolymers, which are secreted extracellularly, typically form a protective layer around the cell and are primarily composed of monosaccharides, often with non-carbohydrate substituents. The structural variability of EPS – including differences in molecular weight, monomer composition, and branching architecture – imparts a wide range of unique physicochemical properties, such as high viscosity, excellent gelling capacity, and emulsion stabilization. Consequently, bacterial EPS have emerged as promising, sustainable alternatives to conventional petroleum-based or plant-derived polymers, offering superior biocompatibility and biodegradability. This work focuses on evaluating physical and chemical parameters of EPS synthesized by two bacterial strains associated with Antarctic plants – *Hafnia psychrotolerans* 25.2 and *Pseudomonas sp.* 39.4 – extracted by different methods to unlock its specific functional utility in chemical technology.

Materials and methods. The bacteria were cultivated under stationary conditions in Nutrient Broth (HiMedia Ltd.) and Minimal Salt Media (MSM) at temperatures of 25°C and 37°C for a period of six days. Biofilm fractions were collected using pipette tips (1000 µl), while the planktonic cell fractions were collected by centrifugation (4000 rpm, 10 min). Three extraction protocols were applied to the studied samples: acidic extraction, formamide extraction, and EDTA extraction. The determination of parameters such as pH, density, relative viscosity, and surface tension was carried out using standardized laboratory protocols.

Results. The biofilm fraction from both strains, cultivated in NB medium at 25°C without prior acidic hydrolysis, demonstrated the most promising indices for both viscosity and density parameters. Regarding surface tension, the highest value was recorded for EPS extracted with formamide from the planktonic fraction of the *Hafnia psychrotolerans* 25.2 strain in the minimal salt medium (MSM).

Conclusions. Endophytic bacteria isolated from harsh environments possess high potential for EPS synthesis with subsequent industrial application.

Продовження ДОДАТОКУ В

УДК 579.66:577.114

БАКТЕРІАЛЬНІ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДИ ЯК ОБ'ЄКТ БІОТЕХНОЛОГІЇ

ЦУКАНОВ І. С., КОЛЕСНИК Т. О., КАЛІНІЧЕНКО О. О., ОХМАТ О. А.

Київський національний університет технологій та дизайну
domanska91@gmail.com, kalinichenko742135@gmail.com, oxmat.aa@knuutd.edu.ua

Робота присвячена оцінюванню потенціалу застосування екзополісахаридів в різних галузях промисловості, сфері охорони здоров'я. У роботі розглянуті основні види бактерій-продуцентів екзополісахаридів, наведено загальну схему отримання екзополісахаридів та обґрунтовані технологічні фактори, що впливають на процес їх біосинтезу. Представлена стисла характеристика окремих екзополісахаридів та їх комерційне значення для різних галузей.

Ключові слова: бактеріальні екзополісахариди, продуценти, умови культивування, біосинтез, практичне застосування.

Полісахариди є макромолекулами, що входять до складу вуглеводів і є однією з найважливіших та найбільш поширених груп сполук, які продукуються бактеріями, грибами та водоростями. Бактеріальні полісахариди або екзополісахариди (ЕПС) є найпоширенішими компонентами біополімерів, виконуючи різні функції.

Відповідно до функціональних ознак екзополісахариди класифікуються на кілька категорій: структурні, сорбційні, поверхнево-активні, інформаційні, з окислювально-відновною активністю [1].

Відповідно до хімічного складу розрізняють гомо- і гетерополісахариди.

Гомополісахариди (від грец. *homo* – однаковий) – це екзополісахариди, які складаються лише з одного типу моносахаридної ланки (мономеру), що багаторазово повторюється, з'єднаного глікозидними зв'язками. Складаються виключно з одного виду цукру, найчастіше це глюкоза (декстран, целюлоза бактеріальна, пулулан). Зазвичай мають відносно просту, лінійну або слабозгалужену структуру. Глюкани (α -D і β -D), фруктани та галактани – основні мономерні в гомополісахаридах, пов'язаних, як правило, β -1,4 або β -1,3 і α -1,2 або α -1,6 зв'язками. Перші наділяють полімери властивостями жорсткості, другі забезпечують гнучкість молекул [1, 2].

Гетерополісахариди (від грец. *heteros* – інший, різний) – це екзополісахариди, які складаються з двох і більше різних типів моносахаридних ланок або їхніх похідних, які утворюють регулярну повторювану одиницю (олігосахаридний повтор). Містять різноманітні цукри, такі як:

- глюкоза, галактоза, маноза, рамноза;
- аміноцукри (наприклад, N-ацетилглюкозамін);
- уронові кислоти (наприклад, глюкуронова, галактуронова кислоти);
- нецукрові компоненти (ацетильні, піруватні або сульфатні групи).

Гетерополісахариди утворені D-глюкозою, D-галактозою, L-рамнозою, наприклад, у випадках N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), Нацетилгалактозамін (GalNAc) або глюкуронової кислоти (GlcA). Основні зв'язки мономерів представлені тими ж зв'язками, що і гомополісахаридів. Характеризуються складною, часто розгалуженою структурою, що надає їм унікальних функціональних властивостей (висока в'язкість при низьких концентраціях, здатність до утворення гелів) [1-3].

У біотехнологічних процесах екзополісахариди виконують такі функції:

- слугують матрицями для іммобілізації клітин і ферментів, що сприяє їхній стабільності та можливості багаторазового використання як біокатализаторів;
- входять до складу біоплівки, які створюють захист для мікроорганізмів під час процесу ферментації;
- виконують роль біофлокулянтів, сприяючи ефективному очищенню води та обробці стічних розчинів.

Продуценти екзополісахаридів та їхнє біологічне значення

Майже всі бактерії можуть продукувати певні типи позаклітинних полімерів, але лише деякі групи є важливими комерційними або дослідницькими продуцентами екзополісахаридів з унікальними властивостями (табл. 1).

Екзополісахариди не є життєвонеобхідними для внутрішньоклітинного метаболізму бактерій, але вони відіграють критичну роль у виживанні, адаптації та взаємодії мікроорганізмів із зовнішнім середовищем (табл. 2).

Таблиця 1 – Основні групи бактерій-продуцентів [4]

Група бактерій	Рід	Тип ЕПС	Комерційне значення
Протеобактерії	<i>Xanthomonas campestris</i>	Ксантанова камідь (гетеро-ЕПС)	Найбільш комерційно важливий продукт з високою в'язкістю: стабілізатор у харчовій та нафтовій промисловості
	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Альгінати	Біоматеріали, заміна рослинних альгінатів при гелеутворенні
	<i>Acetobacter</i> (<i>Komagataeibacter xylinus</i>)	Бактеріальна целюлоза (гомо-ЕПС)	Біомедична галузь (штучна шкіра, носії АФІ), високоміцні композити
Фірмікути	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Декстран (гомо-ЕПС)	Фармацевтична галузь (замінники плазми крові), хроматографія
	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.	ЕПС молочнокислих бактерій	Функціональні продукти харчування (пробіотики, загущувачі, пребіотики)
Ціанобактерії	<i>Nostoc</i> spp., <i>Aphanocapsa</i> spp.	Ціано-полісахариди	Перспективні біоактивні властивості (антиоксидантні, протівірусні)

Таблиця 2 – Біологічне значення ЕПС для клітини-продуцента [4]

Роль ЕПС	Пояснення
Захисна функція (глікокалікс)	ЕПС утворюють захисний шар (капсулу або слизовий шар), який запобігає висиханню (десикації) клітин, захищає від фагоцитозу імунними клітинами та від токсичних речовин (важких металів, антибіотиків).
Формування біоплівки	ЕПС є ключовим компонентом матриксу біоплівки, забезпечуючи механічну стабільність, адгезію клітин до поверхонь та їхню когезію (зчеплення між собою). Це критично важливо для колонізації поверхонь.
Адгезія та колонізація	Дозволяють бактеріям прикріплюватися до поверхонь (грунт, рослини, тканини господаря, медичні імпланти) та починати процес колонізації.
Накопичення поживних речовин	ЕПС може зв'язувати та концентрувати іони металів і поживні речовини (особливо воду), створюючи мікросередовище, сприятливе для росту.
Імуномодуляція (для патогенів)	У патогенних бактерій капсульні ЕПС часто слугують фактором вірулентності, приховуючи клітину від розпізнавання імунною системою господаря.
Рух і дисперсія	Деякі типи ЕПС можуть сприяти руху колоній або, навпаки, їхній дисперсії (розсіюванню) при зміні умов.

Галузі застосування бактеріальних екзополісахаридів

Бактеріальні екзополісахариди знаходять широке застосування в різних галузях промисловості, включаючи агропромисловий комплекс та сферу охорони здоров'я.

ЕПС ефективно використовують для: збільшення нафтовидобутку, виготовлення упаковки для харчових продуктів, виготовлення косметичних засобів, капсулювання лікарських препаратів та біологічно

активних компонентів (антиоксиданти, вітаміни, пробіотики тощо) з метою збереження їх властивостей, збагачення складу продуктів для відгодівлі тварин тощо.

У харчовій промисловості ЕПС використовують як загусники, стабілізатори та емульгатори у виробництві соусів, напоїв, десертів тощо. У фармацевтичній промисловості та медицині ЕПС використовують завдяки їх біосумісності та нетоксичності. Сфера застосування включає виробництво біоматеріалів, капсул та мікросфер; носіїв АФІ, у тому числі з контрольованим вивільненням активної речовини; імуномодуляторів, допоміжних речовин та основ для виготовлення лікарських форм, медичних виробів для загоювання ранових поверхонь [5]. Вказана доволі широка область застосування ЕПС потребує ґрунтовного вивчення процесів біосинтезу бактеріальних екзополісахаридів, включаючи їх склад, структурні характеристики, функціональні властивості та продуктивність мікроорганізмів-продуцентів [6,7].

Завдяки спроможності ефективно утримувати вологу і створювати захисний бар'єр на поверхні шкіри ЕПС є важливим компонентом у складі зволожувальних кремів, масок, шампунів, сироваток тощо.

ЕПС активно використовують для біоремедіації ґрунту та водних ресурсів. Вони ефективно зв'язують важкі метали, токсичні речовини та нафтопродукти [8]. Завдяки здатності екзополісахаридів до біологічного розкладання, їх застосування є екологічно безпечним і перспективним у розрізі пошуку альтернативних синтетичних полімерних матеріалів.

Окремі екзополісахариди, які синтезуються азотфіксуючими бактеріями, такими як *Rhizobium* та *Azotobacter*, позитивно впливають на структуру ґрунту, сприяють збереженню вологості та збільшують його родючість, застосовуються як біостимулятори для росту рослин і захисні засоби проти посухи [9].

Отже, ЕПС є унікальними біополімерами, сучасні дослідження яких зосереджені на вдосконаленні технологій отримання і розширенні напрямів їх застосування [10].

Виділення екзополісахаридів

Екзополісахариди є високомолекулярними біополімерами, які продукуються і виділяються мікроорганізмами в оточуюче середовище. Вони відіграють фундаментальну роль у формуванні біоплівки, забезпеченні захисту клітин від впливу стресових чинників, а також сприяють їх взаємодії з іншими мікроорганізмами та організмом-носієм [11, 12]. Дослідження властивостей екзополісахаридів і розробка їх практичного застосування в біотехнології, харчовій, фармацевтичній та медичній промисловості вимагають впровадження ефективних методів їх виділення та очищення, а саме:

1. Попередня підготовка біомаси.

Першим етапом виділення екзополісахаридів є відділення біомаси клітин від культуральної рідини. Вибір методології екстрагування залежить від умов культивування мікроорганізмів та може включати різні підходи: використання центрифугування для відокремлення клітин від культуральної рідини; застосування фільтрації через мембрани з різним рівнем пористості; проведення обробки теплом або ультразвуком, що сприяє виділенню екзополісахаридів, асоційованих з поверхнями клітин.

2. Методи виділення екзополісахаридів.

Для виділення ЕПС застосовують низку методів:

- хімічне екстрагування передбачає використання хелатуючих агентів, зокрема етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА), формальдегіду або натрію гідроксиду для руйнування міжмолекулярних зв'язків і виділення екзополісахаридів;
- фізико-хімічні способи включають нагрівання, автоклавування, ультразвукову обробку чи застосування мікрохвильового опромінювання;
- механічні методи передбачають інтенсивне струшування чи гомогенізацію, сприяють відокремленню поверхневих полісахаридів.

3. Осадження та концентрування.

Для виділення екзополісахаридів з культуральної рідини застосовують низку методів:

- осадження за допомогою спиртів, таких як етанол або ізопропанол. Це один із найпоширеніших способів, що дозволяє отримати концентровану фракцію ЕПС;
- сольове осадження із використанням реагентів, наприклад, ацетату натрію або сульфату амонію;
- мембранна фільтрація, включаючи ультрафільтрацію та нанофільтрацію, яка забезпечує селективне концентрування високомолекулярних фракцій.

4. Очищення екзополісахаридів.

Отримані полісахариди можуть містити домішки, такі як білки, нуклеїнові кислоти, залишкові компоненти середовища. Для їх видалення застосовуються наступні методи:

- проведення діалізу проти дистильованої води або буферних розчинів;

- хроматографічні методи, зокрема гель-фільтрацію, іонообмінну хроматографію тощо;
- ферментативна обробка, що забезпечує розщеплення небажаних білкових або нуклеїнових домішок.

Сучасні наукові тенденції акцентують увагу на інтеграції традиційних методів виділення із інноваційними нанотехнологіями та удосконаленими мембранними системами. Значний інтерес викликають автоматизовані безперервні системи виділення, які характеризуються високою ефективністю та стабільністю отриманих даних. Крім того, активний розвиток спостерігається у сфері застосування екологічно ощадних методів екстрагування, що базуються на мінімізації використання токсичних та/або агресивних хімічних реагентів [13-17].

Фактори, що впливають на біосинтез екзополісахаридів

Вплив температури. Температура істотно впливає на активність ферментів, задіяних у процесі біосинтезу. Надмірно високі температури призводять до зниження активності ферментів через денатурацію білкових структур. Для більшості бактерій оптимальний температурний діапазон складає 25-35 °С. Низькі температури можуть уповільнювати темпи зростання, але в деяких випадках сприяють накопиченню більш в'язких ЕПС [7].

Вплив поживного середовища. Склад середовища для культивування є одним з основних чинників. Ефективним є використання глюкози, сахарози чи лактози. Встановлено, що обмеження вмісту азоту або фосфору в поживному середовищі зазвичай призводить до посиленого утворення полісахаридів[7].

Вплив рівня рН. Подібно до температури, рівень рН необхідно оптимізувати для кожного конкретного штаму-продуцента, оскільки він впливає на активність ферментів, задіяних у процесі синтезу. Оптимальний рівень рН залежить від конкретного виду мікроорганізму і зазвичай становить 6,0-7,5 [15, 18, 19].

ВИСНОВКИ

У роботі проаналізовано сучасні літературні джерела щодо природи, складу та сфери застосування екзополісахаридів.

Розглянуто основні методи виділення та очищення екзополісахаридів. Проведений огляд підтверджує, що наявні методики виділення потребують оптимізації, оскільки універсального, високоефективного та відтворюваного підходу до виділення екзополісахаридів не існує. Перспективним напрямом є удосконалення комбінованих методів, які дозволяють підвищити вихід і чистоту продукту при мінімальному впливі на його структуру.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ільїна Т. С. Біоплівки як спосіб існування бактерій у навколишньому середовищі та організмі господаря: феномен, генетичний контроль та системи регуляції їх розвитку. *Генетика*. 2004. № 40. С. 1–12.
2. Garth A. I. Biofilm in chronic wounds. *Wound. Rep. Reg.* 2008. Vol. 3, № 4. P. 26–28.
3. Смирнова Т. А., Діденко Л. С., Азізбекян Р. Р., Романова Ю. М., Структурно-функціональна характеристика бактеріальних біоплівок. *Мікробіологія*. 2010. С. 435–446.
4. Donlan R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. №15(2). P. 167–193.
5. Franklin M. J., Chang C., Akiyama T., Bothner B. New Technologies for Studying Biofilms. In: *Microbial biofilms*. 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015. P. 1–32.
6. Сидоренко С. В. Роль бактеріальних біоплівок у патології людини. *Інфекції у хірургії*. 2004. Т. 2, №3. С. 16–20.
7. Ткачук Н. В. Біоплівки та біообростання : зб. лекцій для студентів та аспірантів природничих спеціальностей закладів вищої освіти. Чернігів : Десна Поліграф. 2023. 180 с.
8. Lourenco A., Ferreira A., Veiga N., Machado I., Pereira M.O., Azevedo N.F. BioOmics: a web platform for the systematic and standardized collection of high-throughput biofilm data. *PLoS ONE*. 2012. 39960.
9. Pérez-Rodríguez G., GlezPena D., Azevedo N.F., Pereira M.O., Fdez-Riverola F., Lourenco A. Enabling systematic, harmonised and large scale biofilms data computation: the biofilms experiment workbench. *Comp. Meth. Progr. Biomed.* 2015. Vol. 118. P. 309–321.

10. Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J. The EPS matrix: The “house of biofilm cells”. *J. Bacteriol.* 189, 7945 – 7947. 2007.
11. Flemming H. C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010. № 8. P. 623 – 633.
12. Ярош М. Б., Пирог Т. П., Скроцька О. І. Біологічна активність мікробних полісахаридів. *Наукові праці ВУХТ*. 2020. Т. 26, № 6. С. 44–55.
13. Hall-Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews*. 2004. Vol. 2. P. 95–108.
14. Yadav M. K., Patra J. K., Vishnuprasad Ch. N., Das G. Role of Biofilms in Environment Pollution and Control. *Microbial Biotechnology. Applications in Agroculture and Environment*. Singapore : Springer Nature, 2017. Vol. 1. P. 377–398.
15. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S. J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013. № 3. a010306.
16. Stewart Ph. S. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. In: Microbial biofilms. 2nd edition. *Washington DS : Asm Press*. 2015. P. 269–285.
17. Zhao X., Zhao F., Wang J., Zhong N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv.* 2017. Vol. 7. P. 36670–36683. doi: 10.1039/C7RA02497E
18. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. In: Microbial biofilms. 2nd edition. *Washington DS: Asm Press*. 2015. P. 51–66.
19. Martinez-Che ca F., Toledo F. L., Vilchez R., Quesada E., Calvo C. Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihulina* strain H28 in media containing various hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. Vol. 58, P. 358–363.