



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **82464**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 12882**

(22) Дата подання заявки: **13.11.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **12.08.2013**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **12.08.2013, Бюл.№ 15**

(72) Винахідник(и):

Малиновська Ірина Михайлівна (UA)

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЗЕМЛЕРОБСТВА НААН",
вул. Машинобудівників, 2-б, смт Чабани,
Києво-Святошинський р-н, Київська обл.,
08162 (UA)**

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОДУЦЕНТА ПОЗАКЛІТИННОГО ПОЛІСАХАРИДУ *BACILLUS MUCILAGINOSUS*

(57) Реферат:

Спосіб культивування продуцента позаклітинного полісахариду *B. mucilaginosus* в рідкому поживному середовищі. Використовують як посівний матеріал нативні спори продуцента, поживне середовище складом (г/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,7, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ - 2,0, KNO_3 - 1,0-2,5, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - 0,05; субстрат (глюкоза, сахароза, фруктоза, лактоза, сорбіт, маніт і т. ін.) - 15,0.

UA 82464 U

Корисна модель належить до біотехнології, а саме до способів отримання біологічно активних речовин мікробного походження. Полісахариди бактерій знайшли широке використання на практиці, вони мають здатність підвищувати стійкість організму людини до бактеріальних і вірусних інфекцій, мають протипухлинну активність, сприяють загоюванню ран, їх використовують для лікування наслідків травм і порушень нервової системи, попередження утворення післяопікових і посттравматичних рубців. Завдяки своїм загущуючим і біоаккумуляційним властивостям вони знайшли широке використання у харчовій, хімічній, фармацевтичній, косметичній та інших галузях промисловості [1].

Відомий спосіб отримання полісахариду *Bacillus mucilaginosus* на рідкому поживному середовищі, яке містить пептон 0,8-1,2 г, м'ясу 6-8 г, Na_2HPO_4 0,4-0,5 г, MgSO_4 0,01-0,03 г, K_2SO_4 0,01-0,03 г, воду водопровідну – 100 мл [2]. Недоліком цього способу є висока вартість пептону, який має харчове значення і коштує 122\$ за 1 кг.

Відомий спосіб підвищення продуктивності синтезу полісахариду *B. mucilaginosus* шляхом ультрафіолетового опромінювання культуральної рідини при вирощуванні продуцента на сінному відварі за 37 °C [3]. Недоліком способу є невисокий рівень продуктивності синтезу цільового продукту (полісахариду).

Найближчим до запропонованого є винахід, який описано у [4], згідно з яким продуцент попередньо вирощують у середовищі, яке містить 100-200 мл м'ясо-пептонного бульйону (МПБ) і 100-200 мл сінного відвару протягом 1-2 діб, а потім - на агаризованому середовищі, яке містить м'ясо-пептонний агар (МПА), натрій хлористий 0,5-1,0 г, цукор (глюкозу, сахарозу, мальтозу або левульозу) 1,5-3,0 г протягом 18-24 год. за температури 37 °C. Даний спосіб дозволяє підвищити продуктивність синтезу полісахариду до 100-150 мл/л, тобто вихід полісахариду в'язкістю 8,18 м²/с становить 10-15 об.%. Проте, недоліком прототипу є необхідність вирощування продуцента на агаризованому середовищі, що є нетехнологічним, оскільки потребує додаткового етапу - змивання культури із поверхні середовища та використання у складі поживного середовища дорогих компонентів - м'яса, агару і т.ін; недостатньо висока продуктивність синтезу та використання штаму, який потребує високої температури культивування.

В основу корисної моделі поставлена задача здешевлення виробництва і підвищення продуктивності синтезу полісахариду шляхом використання як посівного матеріалу спорової суспензії штаму *B. mucilaginosus* IMB-54 і культивуванні продуцента на здешевленому рідкому середовищі, що забезпечує підвищення продуктивності синтезу полісахариду в 2,4 рази.

Поставлена задача вирішується шляхом вирощування *B. mucilaginosus* на рідкому поживному середовищі, яке містить (г/л): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,7, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -2,0, KNO_3 -1,0-2,5, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -0,05; субстрат (глюкоза, сахароза, фруктоза, лактоза, сорбіт, маніт і т.ін) - 15,0. Культивування проводять протягом 22-320 годин за температури 28 °C. Для засіву використовують спорову суспензію штаму *B. mucilaginosus* IMB-548, що забезпечує підвищення продуктивності синтезу полісахариду порівняно із використанням посівного матеріалу на основі вегетативних клітин в 2,43 рази. Використовуються нативні спори продуцента, які не оброблені ніякими хімічними речовинами і не опромінені ультрафіолетом, що забезпечує збереження генетичного матеріалу продуцента в незмінному вигляді.

Особливістю фізіології мікроорганізму *B. mucilaginosus* є зниження продуктивності синтезу позаклітинного полісахариду (ППС) протягом перебування клітин у вегетативному стані, тому для поновлення їхньої полісахаридсинтезувальної здатності необхідно проходження продуцентом процесу споруляції. Відмінності метаболічних властивостей клітин продуцента, які виростили із спор і вегетативних клітин, проявляються у ефективності використання джерела азоту і в їхній здатності до синтезу позаклітинного полісахариду. Із збільшенням кількості пересівів вегетативних клітин у рідкому середовищі здатність до синтезу екзополісахариду (ЕПС) суттєво зменшується (Фіг. 1), 1 – посівний матеріал – спори; 2 - посівний матеріал – вегетативні клітини другого пересіву; 3 - посівний матеріал – вегетативні клітини четвертого пересіву; 4 - посівний матеріал – вегетативні клітини шостого пересіву. Час культивування – 22 години.

Так, для спорового посівного матеріалу оптимальною концентрацією для синтезу полісахариду KNO_3 є 2,5 г/л, за якої синтезується 3,62 г/л полісахариду. При засіванні середовища культурою, яка пересівалася у рідкому середовищі двічі, оптимальна концентрація нітрату калію залишається на тому ж рівні, однак, полісахариду синтезується на 20 % менше. За використання культури четвертого пересіву оптимальна концентрація нітрату калію зменшується до 2,25 г/л, при цьому синтезується 2,41 г/л полісахариду.

При проведенні шести пересівів культури у вегетативному стані ще менш ефективно використовується джерело азоту і синтезується лише 1,65 г/л полісахариду. За концентрації

KNO_3 5,5 г/л настає інгібування синтетичних процесів. Наші дослідження показали також, що після 8-9 пересівів культура взагалі втрачає здатність синтезувати полісахарид, особливо на середовищі із співвідношенням N/C 1:3 і поновлює цю здатність лише після проходження процесу споруляції або значного збільшення співвідношення N/C.

Особливістю синтезу полісахариду *B. mucilaginosus* є також його двофазність (Фіг. 2), 1 – в'язкість культуральної рідини; 2 – концентрація ЕПС; 3 – концентрація глюкози. Первинне накопичення полісахариду в культуральній рідині спостерігається протягом перших двох діб культивування.

Продуктивність синтезу в цей час визначається співвідношенням N/C в середовищі. На 3-5 добу відбувається зниження концентрації ЕПС в середовищі до 0,025 г/л. На восьму добу починається період повторного синтезу екзополісахариду. Особливістю повторного синтезу ЕПС є відсутність залежності продуктивності від співвідношення азоту до вуглецю в середовищі. Продуктивність синтезу ЕПС однакова у всіх варіантах дослідів і складає 0,01 год.⁻¹. Результатом повторного періоду синтезу є накопичення у 1,7-2,5 рази більшої кількості полісахариду, ніж протягом першого періоду.

Даний винахід представляє спосіб культивування продуценту позаклітинного полісахариду *Bacillus mucilaginosus*, який може бути використаний у медицині (імуностимулююча, імуномодулююча, протівірусна, протипухлинна активність) і ветеринарії (кормова добавка в раціон сільськогосподарських тварин, консервування кормів), у нафтодобувній і гірничій промисловості, у виробництві кераміки і мастильних матеріалів, замінників відомих технічних масел, антифрикційної присадки у гальмівних та охолоджуючих розчинах [5, 6, 7].

Список використаної літератури:

1. Промышленная микробиология: учебн. пособие для вузов по спец. "Микробиология" и "Биотехнология". / З.А. Аркадьева, А.М. Безбородов, И.Н. Блохина и др. Под ред. Н.С. Егорова. - М.: Высшая школа, 1989.-688 с.

2. Патент 2140454 РФ, МКИ С 12 Р 19/04. Способ получения полисахарида *Bacillus mucilaginosus* / Г.Г. Няникова, О.В. Пестова, Е.Я. Виноградов, М.В. Рутто.

3. Авторське свідоцтво 948142 ССРСР, МКИ С 12 15/00. Штамм слизистых бацилл *Bacillus mucilaginosus* / Е.Я. Виноградов, А.И. Берденников // Открытия. Изобретения. 1984.

4. Авторське свідоцтво № 908797 ССРСР, МКИ С 12 Р 1/04. Способ получения слизи из *Bacillus mucilaginosus* / Е.Я. Виноградов, В.С. Злобин, В.П. Шишечкина и др. // Открытия. Изобретения. 1982, БИ № 48.

5. Няникова Г.Г. Биосинтез полисахарида *Bacillus mucilaginosus* и изучение его иммуностимулирующей активности: Дис. канд.биол.наук. - Л., 1990.-158 с.

6. Малиновська І.М., Косенко Л.В. із співав. Роль полісахариду *Bacillus mucilaginosus* в процесі деструкції силікатних мінералів / Микробиологія.-1990. - Т.59,вып.1. - С. 70-78.

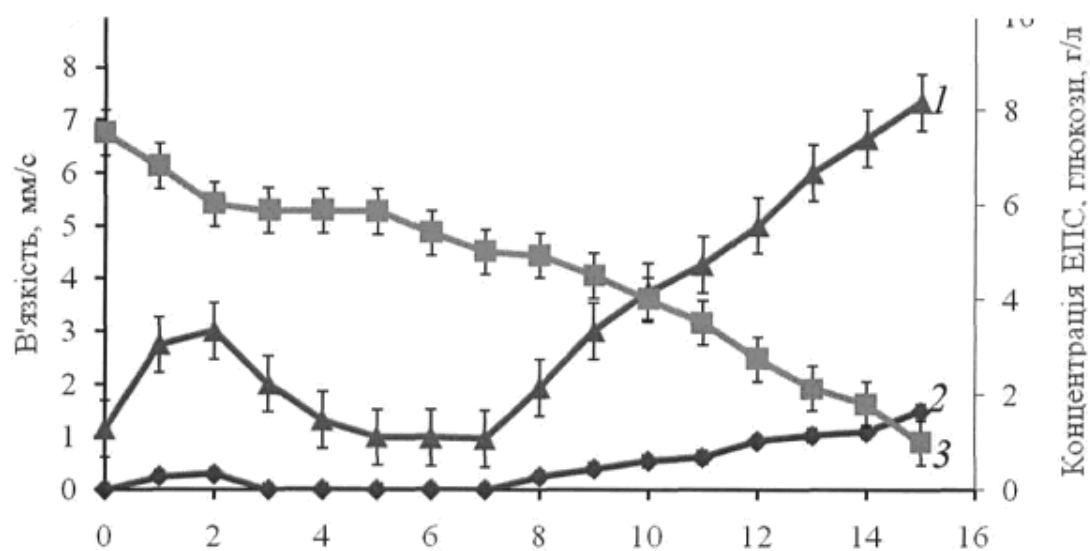
7. Авторське свідоцтво 1210452 ССРСР, МКИ С 12N 1/00 Штамм бактерії *Bacillus mucilaginosus* продуцента біостимулятора неспецифического иммунитета телят/ Виноградов Е.Я., Шишкина В.П. - № 3474518/15 Опубл.27.09.96, Бюл. № 12.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб культивування продуцента позаклітинного полісахариду *B. mucilaginosus* в рідкому поживному середовищі, який **відрізняється** тим, що використовують як посівний матеріал нативні спори продуцента, поживне середовище зі складом (г/л): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,7, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 2,0, KNO_3 - 1,0-2,5, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; субстрат (глюкоза, сахароза, фруктоза, лактоза, сорбіт, маніт і т. ін.) - 15,0.



Фиг.1



Фиг.2

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601