



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **40848** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12N 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ ACINETOBACTER CALCOACETICUS K-4 - ПРОДУЦЕНТ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

1

2

(21) u200813911

(22) 03.12.2008

(24) 27.04.2009

(46) 27.04.2009, Бюл.№ 8, 2009 р.

(72) ПИРОГ ТЕТЯНА ПАВЛІВНА, UA, АНТОНЮК
СВІТЛАНА ІГОРІВНА, UA, СОРОКІНА АНАСТАСІЯ
ІГОРІВНА, UA

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ
ТЕХНОЛОГІЙ, UA

(57) Штам бактерій *Acinetobacter calcoaceticus* K-4
- продуцент поверхнево-активних речовин.

Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання поверхнево-активних речовин (ПАР), які можуть бути використані для очистки довкілля від нафти і нафтових забруднень, а також у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій промисловостях.

Відомий штам *Bacillus* sp. № 205, який є деструктором вуглеводнів, поверхнево-активних речовин і ксенобіотиків [Пат № 48901 UA, МПК С 12 N 1/26. Евритермальний штам мікроорганізму *Bacillus* sp. № 205 - деструктор вуглеводнів, поверхнево-активних речовин і ксенобіотиків та їх сполук / Астрова Н.Г. - № 2002031998; Заявл. 12.03.2002; Опубл. 15.08.2002, Бюл. № 8.].

Також відомо препарати для біологічного очищення ґрунту і води від забруднень нафтою і нафтопродуктами:

- "Родойл", до його складу входить штучно створена композиція природних вуглеводеньокислювальних мікроорганізмів (*Gordonia rubropertinctus* IMB B-7012, *Rhodococcus erythropolis* IMB B-7012., *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7013) [Пат. № 34894 UA, МПК С 02 F 3/34. Препарат "Родойл" для біологічного очищення ґрунту і води від забруднень нафтою та нафтопродуктами / Дульгерів О.М., Ногіна Т.М., Підгорський В.С., Думанська Т.У., Гавриленко М.М. - № 99074077; Заявл. 15.07.1999; Опубл. 15.08.2003, Бюл. № 8.];

- Консорціум мікроорганізмів "Devouroil" (*Rhodococcus* sp., *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Candida* sp.), що використовується для очищення ґрунтових та солонувато водних екосистем від забруднення нафтопродуктами [Пат. № 26495 UA, МПК С 02 F 3/34. Консорціум мікроорганізмів

"Devouroil" (*Rhodococcus* sp., *Rhodococcus maris*, *Rhodococcus erythropolis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Candida* sp.), що використовується для очищення ґрунтових та солонувато водних екосистем від забруднення нафтопродуктами / Бозренков І.А., Мільохіна Є.І., Беляєв С.С., Іванов М.В. - № 93007798; Заявл. 28.10.1993; Опубл. 11.10.1999, Бюл. № 6.];

- Мікробний препарат для очищення води і ґрунтів від нафтових забруднень (*Pseudomonas stutzeri* - 367-1, *Rhodococcus* sp - 367-2, *Rhodococcus maris* - 367-5, *Rhodococcus erythropolis* - 367-6 і *Yarrowia* або *Candida* - 367-3) [Пат. № 22690 UA, МПК С 02 N 1/20. Мікробний препарат для очищення води і ґрунтів від нафтових забруднень / Болоховський В.В., Борзенков І.А., Поспелов М.Є. та ін. - № 94032986; Заявл. 22.03.1994; Опубл. 30.06.1998, Бюл. № 3.].

- Штам *Pseudomonas* sp. PS-17 [Пат. 10467 UA, МПК С 21 N 1/02. Штам *Pseudomonas* sp. SP-17 - продуцент позаклітинних біоПАР і біополімеру / Шульга О.М., Карпенко О.В., Елісєєв С.А., Щерлова Р.А., Вільданова-Марцишин Р.І. - № 95041549; Заявл. 05.04.95; Опубл. 25.12.96, Бюл. № 4.], який є продуцентом позаклітинних ПАР (рамноліпідів) і біополімеру.

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення є штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 - продуцент поверхнево-активних речовин [Пат. 77345 UA, МПК С 21 N 1/20. Штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 - продуцент поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Волошина І.М., Ігнатенко С.В. - № 200503486; Заявл. 13.04.2005; Опубл. 15.11.2006, Бюл. № 11].

В основу корисної моделі поставлено задачу одержання ПАР з використанням невідомого рані-

(19) **UA** (11) **40848** (13) **U**

ше штаму бактерій *Acineobacter calcoaceticus* K-4, який відрізняється від вище згаданих тим, що здатний рости і синтезувати позаклітинні метаболіти з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями на простому мінеральному середовищі з низьким вмістом солей (2,4 г/л) з використанням етанолу як субстрату.

Штам *A. calcoaceticus* K-4 виділено із забруднених нафтою зразків ґрунту. Штам депоновано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ПАН України ім. Д.К.Заболотного під номером 1MB B-7241.

Штам *A. calcoaceticus* K-4 характеризується такими морфологокультуральними і фізіолого-біохімічними ознаками.

Клітини *A. calcoaceticus* K-4 в експоненційній фазі росту являють собою короткі палички, у стаціонарній - сферичні (кокоподібні), розміщені попарно, рідше - в коротких ланцюжках. Розміри клітин: 0,9-1,5x1,2-2,0 мкм. Спор не утворюють. Розмноження клітин здійснюється бінарним поділом. Клітини грамнегативні, нерухомі.

У процесі росту на м'ясо-пептонному агарі (МПА) утворює слизові, прозорі колонії білого кольору з рівними краями, поверхня колоній - гладенька, розмір колоній 2-3 мм.

Під час культивування *A. calcoaceticus* K-4 на рідких мінеральних середовищах з гідрофільними субстратами (етанол, глюкоза) утворюється однорідна гомогенна суспензія клітин молочного кольору, іноді - з жовтуватим відтінком. Під час вирощування на гідрофобних субстратах (рідкі парафіни) часто утворюються конгломерати клітин, а також спостерігається часткова їх флотація. Культивування *A. calcoaceticus* K-4 на середовищі з нафтою супроводжується коалесценцією нафти: за концентрації нафти 0,06 % (об'ємна частка) утворюються кульки діаметром 3-4 мм, а за 0,12 % нафти - диски діаметром до 7-8 мм і завтовшки 1-2 мм.

Як джерело вуглецю і енергії використовує глюкозу, етанол, рідкі парафіни, гексадекан, а також здатний асимілювати нафту, гліцерин.

Як джерело азотного живлення використовує органічний (сечовина) та мінеральний (нітратний, гірше амонійний) азот.

Не потребує факторів росту, проте рівень біомаси і синтезованих поверхнево-активних речовин підвищується за присутності у середовищі дріжджового автолізу.

Строгий аероб. Каталазопозитивний, оксидазонегативний, кислотноестійкий. Желатину не розріджує, крохмаль не гідролізує, нітрати не відновлює. Сірководень, індол та ацетоїн не утворює.

Температурний діапазон росту 10-42°C. Оптимальна температура росту 24-30°C. pH 5,5-8,0. Оптимум pH 6,5-7,5.

Умови зберігання. Штам зберігається при температурі +4°C на глюкозо-картопляному або м'ясо-пептонному агарі. Пересіви проводять через 3 місяці.

Склад середовища для отримання посівного матеріалу і біосинтезу ПАР (% , масова частка).

(NH ₂) ₂ CO	0,55
NaCl	1,0

Na ₂ HPO ₄	0,6
KH ₂ PO ₄	0,6
MgSO ₄ x7H ₂ O	0,1
FeSO ₄ x7H ₂ O	0,001
Вода дистильована	до 1 л.

Як інокулянт використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на мінеральному середовищі вказаного складу з 0,5 % (об'ємна частка) етанолу.

Культивування *A. calcoaceticus* K-4 для отримання поверхнево-активних речовин здійснювали на качалці (220 об/хв.), коефіцієнт масопереносу 0,14 г O₂ / л год, температура 30°C, pH середовища 6,8-7,0, тривалість культивування 120 год. Джерело вуглецю (етанол) - 2,0 % (об'ємна частка). Кількість посівного матеріалу - 5 % (об'ємна частка) від об'єму середовища.

Показники, за якими визначали синтез ПАР.

- Умовна концентрація ПАР (ПАР*), яку визначали для експрес-оцінки кількісного вмісту ПАР у культуральній рідині. Цей показник визначається як ступінь розведення вільної від клітин культуральної рідини у точці збільшення поверхневого натягу на кривій залежності σ_s від значення розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР та виражається в безрозмірних одиницях.

- Емульгувальні властивості (індекс емульгування, E₂₄), які визначали через 24 год як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини у пробірці і виражали у процентах. Як субстрати для емульгування використовували соняшникову або вазелінову олію. Індекс емульгування визначали для культуральної рідини, розведеної дистильованою водою у 50 раз.

- Якісний склад ліпідів визначали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках "Silufol" ("Kavalier", Чехія). Аналіз проводили за використанням наступних систем розчинників: неполярна система: гексан - діетиловий ефір (2:1); полярна система: хлороформ - метанол - вода (85:15:1). Ідентифікацію ліпідів здійснювали шляхом зафарбовування пластинок спиртовим розчином фосфорномолібденової кислоти і парами йода (фосфоліпіди, загальні ліпіди), розчином нітродіну (пептидоліпіди), анісовим альдегідом і антроновим реактивом (гліколіпіди).

Приклад 1. Здатність *A. calcoaceticus* K-4 синтезувати поверхнево-активні речовини за умов росту на етанолі.

A. calcoaceticus K-4 культивували на мінеральному поживному середовищі наведеного вище складу.

Супернатант культуральної рідини характеризувався такими показниками - умовна концентрація ПАР* - 3,8-3,9; індекс емульгування (E₂₄) розведеної у 50 раз культуральної рідини становить 85-90 %. Препарати поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. calcoaceticus* K-4, є комплексом гліко- та пептидоліпідів. Нейтральні (неполярні) ліпіди (жирні спирти та кислоти) присутні у мінорних кількостях. Гліколіпіди представлені трегалозоміколатами і трегалозоацелатами.

Нами вперше показано можливість синтезу позаклітинних низькомолекулярних поверхнево-

активних речовин ліпідної природи представниками роду *Acinetobacter*, оскільки в науковій, науково-технічній та патентній літературі такі дані відсутні.

Приклад 2. Залежність синтезу поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* K-4 від тривалості культивування.

A. calcoaceticus K-4 культивували на мінеральному поживному середовищі наведеного вище складу. Як джерело вуглецю і енергії використовували етанол (2,0 % за об'ємом). Тривалість культивування становила 72, 120 і 168 год. рівень синтезу поверхнево-активних речовин наведено у табл. 1.

Таблиця 1.

Вплив тривалості культивування на синтез ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* K-4 на етанолі В.

Тривалість культивування, год	ПАР*	E ₂₄ , %
72	2,9	85
120	3,9	90
168	3,9	90

Отже, максимальні показники синтезу ПАР спостерігаються на 120 год росту *A. calcoaceticus* K-4.

Приклад 3. Порівняння здатності штамів *A. calcoaceticus* K-4 і *R. erythropolis* ЕК-1 до синтезу ПАР за умов росту на етанолі.

A. calcoaceticus K-4 культивували упродовж 120 год на мінеральному середовищі наведеного вище складу. *R. erythropolis* ЕК-1 вирощували

упродовж 168 год на середовищі такого складу (% масова частка): NaNO₃ - 1,3; NaCl - 1,0; Na₂HPO₄ - 0,6; KH₂PO₄ - 0,14; MgSO₄·7H₂O - 0,1; FeSO₄·7H₂O - 0,001. Як джерело вуглецю і енергії використовували етанол у концентрації 2,0 % (об'ємна частка).

У табл. 2 наведено основні показники синтезу ПАР *A. calcoaceticus* K-4 та *R. erythropolis* ЕК-1 (прототип) під час росту на середовищі з 2 % етанолу.

Таблиця 2.

Синтез ПАР у процесі росту *A. calcoaceticus* K-4 та *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі.

Продуцент	Вміст солей у середовищі, г/л	E ₂₄ , %	ПАР*	Тривалість культивування	Хімічний склад ліпідів
<i>A. calcoaceticus</i> K-4 (даний винахід)	2,4	90	3,9	120	Гліколіпіди, пептидоліпіди
<i>R. erythropolis</i> ЕК-1 (прототип)	3,1	85	3,5	168	Гліколіпіди, загальні ліпіди, фосфоліпіди, пептидоліпіди

Отже, порівняно з прототипом штам *A. calcoaceticus* K-4 має такі переваги:

- синтезує поверхнево-активні речовини на простому мінеральному середовищі з низьким вмістом солей - 2,4 г/л;

- тривалість культивування менша - 120 год;
- вищі показники синтезу ПАР у процесі росту на етанолі.