



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **52816** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12P 19/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ**

1

2

(21) u201002699

(22) 10.03.2010

(24) 10.09.2010

(46) 10.09.2010, Бюл. № 17, 2010 р.

(72) ПИРОГ ТЕТЯНА ПАВЛІВНА, ЛАЩУК НАДІЯ
ВОЛОДИМИРІВНА, ГАРБАРЧУК СЕРГІЙ ОЛЕГО-
ВИЧ(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ
ТЕХНОЛОГІЙ

(57) Спосіб одержання екзополісахариду, що включає культивування *Acinetobacter* sp. 1MB B-7005 на поживному середовищі, що містить суміш ростових субстратів, мінеральні солі і ростові фактори, який **відрізняється** тим, що як джерело вуглецевого живлення використовують суміш фумарату натрію і глюкози у молярному співвідношенні 4:1 (масовою часткою 1,8 і 0,5 %, відповідно).

Корисна модель відноситься до біотехнології, а саме, до способу одержання мікробних екзополісахаридів (ЕПС), які можуть використовуватись у нафтовидобувній, хімічній, парфумерній, харчовій та ін. промисловості, сільському господарстві, медицині.

Відомі способи одержання екзополісахаридів, продуцентами яких є *Xanthomonas campestris* 8162 [А.с. № 595379, СРСР, Опубл. 28.02.78, Бюл. № 8], *Xanthomonas campestris* NRLL B-12075 та NRLL B-12074 [патент № 4400467, США, опубл. 23.08.83], *Xanthomonas campestris* ATCC 31601 [патент №4418145, США, опубл. 29.11.83].

Однак штами *Xanthomonas campestris* є фітопатогенними, деякі з них генетично нестабільні, оскільки дисоціюють на мукоїдні і немукідоїдні форми, що спричиняє нестабільність якості синтезованих полісахаридів. Вказані негативні особливості штамів-продуцентів завдають шкоду довкіллю, а також обмежують використання препаратів.

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення є спосіб одержання ЕПС [патент України № 39398 МПК⁷ С 12 Р 19/04. Спосіб одержання екзополісахариду / Пирог Т.П., Іванушкіна Г.О. Опубл. 25. 02. 2009, Бюл. № 4], який передбачає культивування *Acinetobacter* sp. 1MB B-7005 на поживному середовищі, що містить суміш ростових субстратів, мінеральні солі і ростові фактори. Згідно корисної моделі як джерело вуглецевого живлення використовують суміш двох енергетично дефіцитних субстратів (ацетату натрію і глюкози масовою часткою 1,1 і 0,75 % відповідно).

Недоліком цього способу є високий вміст солей у середовищі культивування (9,3 г/л) і висока

тривалість культивування (120 год).

В основу корисної моделі поставлено задачу створення нового способу одержання екзополісахариду, який знижує вміст солей у середовищі, скорочує тривалість культивування і підвищує ЕПС-синтезувальну здатність продуцента.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання екзополісахариду включає культивування *Acinetobacter* sp. 1MB B-7005 на поживному середовищі, що містить суміш ростових субстратів, мінеральні солі і ростові фактори. Згідно корисної моделі як джерело вуглецевого живлення використовують суміш фумарату натрію і глюкози у молярному співвідношенні 4:1 (масовою часткою 1,8 і 0,5 % відповідно).

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Використання як джерела вуглецю суміші фумарату натрію (1,8 %) і глюкози (0,5 %) у молярному співвідношенні 4:1 дає змогу знизити у 3,5 раза вміст солей у середовищі культивування, скоротити в 1,3 раза тривалість культивування і підвищити ЕПС-синтезувальну здатність в 1, 2 раза.

Експериментально доведено, що використання суміші фумарату натрію (1,8 %) і глюкози (0,5 %) як ростового субстрату дає змогу знизити у 3,5 раза вміст солей у середовищі культивування, скоротити в 1,3 раза тривалість культивування і підвищити ЕПС-синтезувальну здатність *Acinetobacter* sp. 1MB B-7005 в 1, 2 раза.

Спосіб здійснюється таким чином. *Acinetobacter* sp. 1MB B-7005 вирощують на середовищі такого складу (г/л) : KH_2PO_4 - 1,8; NH_4Cl -

(19) **UA** (11) **52816** (13) **U**

0,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001. У середовище додатково вносять 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізу та 0,0006 % (масова частка) пантотенату кальцію. Як джерело вуглецю та енергії використовують суміш фумарату натрію (1,8 %, масова частка) і глюкози (0,5 %, масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (16-18 год), вирощену на мінеральному середовищі наведеного вище складу, що містить 0,5 % (масова частка) фумарату натрію як джерело вуглецевого живлення. Кількість посівного матеріалу становить 10 %. Культивування здійснюють у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) при 30 °С, рН 6,8-7,0 упродовж 90 год.

Використання нового способу дає змогу знизити у 3,5 раза вміст солей у середовищі культивування, скоротити в 1,3 раза тривалість культивування і підвищити ЕПС-синтезувальну здатність *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 в 1, 2 раза.

Приклад 1. Синтез екзополісахариду *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 за різного молярного співвідношення фумарату натрію і глюкози

Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу. Як джерело вуглецю і енергії використовують суміш фумарату натрію (0,9; 1,35; 1,8; 2,25 і 2,7 %, масова частка) і глюкози (0,25; 0,5; 0,75 і 1,0 %, масова частка). Як

посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (16-18 год), вирощену на мінеральному середовищі наведеного вище складу, що містить як джерело вуглецевого живлення фумарат натрію (0,5 %, масова частка). Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму середовища. Тривалість культивування 120 год.

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютну суху біомасу клітин (АСБ) у відповідності з калібрувальним графіком. Ефективність трансформації вуглецю субстратів в ЕПС оцінюють за наступними показниками: кількість синтезованих ЕПС, ЕПС-синтезувальна здатність. Кількість синтезованого екзополісахариду встановлюють ваговим методом. ЕПС-синтезувальну здатність розраховують як відношення кількості синтезованого ЕПС до біомаси та виражають у г ЕПС/г АСБ.

З даних, наведених у табл. 1, видно, що кількість ЕПС є максимальною за умов росту продуцента на суміші фумарату і глюкози у молярному співвідношенні 4:1. Проте під час дослідження синтезу ЕПС залежно від молярного співвідношення субстратів у середовищі змінювали не тільки концентрацію фумарату і глюкози, а й співвідношення С/Н, від значення якого також залежить синтез ЕПС.

Таблиця 1

Вплив молярного співвідношення концентрацій фумарату натрію і глюкози на синтез екзополісахариду

Молярне співвідношення фумарату і глюкози	Концентрація фумарату натрію, %	Концентрація глюкози, %	Співвідношення С/Н	ЕПС, г/л
2:1	0,9	0,5	44,8	4,1
	1,8	1,0	89,5	6,7
3:1	1,35	0,5	57,6	5,7
	1,8	0,75	80,0	8,3
4:1	1,8	0,5	70,5	9,8
5:1	2,25	0,5	83,3	8,5
	1,8	0,25	60,9	7,3
6:1	2,7	0,5	96,3	8,2

Приклад 2. Синтез екзополісахариду *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 за різного молярного співвідношення фумарату натрію і глюкози і постійного значення С/Н

Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу. Як джерело вуглецю і енергії використовують суміш фумарату натрію (0,9; 1,35; 1,8 і 2,25 %, масова частка) і глюкози (0,25; 0,5; 0,75 і 1,0 %, масова частка). Співвідношення концентрацій вуглецю і азоту у середовищі є постійним і становить 70,5. Як посівний

матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (16-18 год), вирощену на мінеральному середовищі наведеного вище складу, що містить як джерело вуглецевого живлення фумарат натрію (0,5 %, масова частка). Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму середовища. Тривалість культивування 120 год.

Результати культивування продуцента на суміші фумарату натрію і глюкози за співвідношення С/Н, рівного 70,5, наведено у табл. 2

Таблиця 2

Синтез ЕПС на суміші фумарату натрію і глюкози за різного співвідношення концентрацій субстратів і постійного співвідношення C/N

Молярне співвідношення фумарату і глюкози	Концентрація фумарату натрію, %	Концентрація глюкози, %	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г АСБ
2:1	0.9	0.5	5.7	9,0
	1.8	1.0	7.8	10,1
3:1	1.35	0.5	7.0	9,5
	1.8	0.75	8.7	11,2
4:1	1.8	0.5	9,8	18,6
5:1	2.25	0.5	8.9	12,0
	1.8	0.25	7.9	10,9

Отже, за підтримання постійного співвідношення C/N (70,5) і молярного співвідношення концентрацій фумарату натрію і глюкози, рівного 4:1, показники синтезу екзополісахариду є максимальними.

Приклад 3. Вплив тривалості культивування на синтез ЕПС за умов росту *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на суміші фумарату натрію і глюкози

Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу.

Як джерело вуглецю і енергії використовують суміш фумарату натрію (1,8 %, масова частка) і

глюкози (0,5 %, масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (16-18 год), вирощену на мінеральному середовищі наведеного вище складу, що містить як джерело вуглецевого живлення фумарат натрію (0,5 %, масова частка). Кількість посівного матеріалу становить 10 % від об'єму середовища. Тривалість культивування становить 90–120 год.

Як видно з даних, наведених у табл. 3, скорочення тривалості культивування до 90 год не супроводжується зниженням показників синтезу екзополісахариду.

Таблиця 3

Синтез екзополісахариду на суміші фумарату натрію і глюкози залежно від тривалості культивування *Acinetobacter* sp. IMB B-7005

Тривалість культивування, год	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г АСБ
90	9,8	18,6
100	9,85	18,2
120	9,9	18,5

Таким чином, використання як ростового субстрату суміші фумарату натрію (1,8 %) і глюкози (0,5 %) дає змогу підвищити порівняно з найближчим аналогом в 1,2 раза (до 18,6 г ЕПС/г АСБ)

ЕПС-синтезувальну здатність, скоротити зі 120 до 90 год тривалість культивування і здійснити процес одержання ЕПС на середовищі, в якому вміст солей знижено з 9,5 до 2,7 г/л.