



УКРАЇНА

(19) UA (11) 52817 (13) U
(51) МПК (2009)
C12P 19/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ

1

2

(21) u201002700

(22) 10.03.2010

(24) 10.09.2010

(46) 10.09.2010, Бюл. № 17, 2010 р.

(72) ПИРОГ ТЕТЯНА ПАВЛІВНА, САВЧУК ОКСА-
НА МИКОЛАЇВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ
ТЕХНОЛОГІЙ

(57) Спосіб одержання екзополісахариду, що включає культивування *Acinetobacter* sp. IMB 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 ацетату натрію і меляси масовою часткою 1,1 і 1,5 %, 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 немуюїдні 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 № 39399 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, мінеральні солі, ростові фактори і як джерело вуглецевого живлення суміш етанолу і меляси. Згідно корисної моделі, змішаний субстрат містить нейтралізовану після кислотної обробки мелясу.

Недоліком цього способу є високий вміст солей у середовищі культивування (3,7 г/л) і висока тривалість культивування (96 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 ацетату натрію і меляси масовою часткою 1,1 і 1,5 %, відповідно.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Використання як джерела вуглецю суміші ацетату натрію (1,1 %) і меляси (1,5 %) дає змогу знизити у 1,5 рази вміст солей у середовищі культивування, скоротити в 1,2 рази тривалість культивування і підвищити у 1,5 рази ЕПС-синтезувальну здатність продуцента.

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

Спосіб здійснюється таким чином. *Acinetobacter* sp. 1MB B-7005 вирощують на середовищі такого складу (г/л) : KH_2PO_4 - 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,4; $\text{CaCl}_2 \cdot x \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 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 ацетату натрію (1,1

(19) UA (11) 52817 (13) U

%, масова частка) і меляси (1,5 %, масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (16-18 год), вирощену на мінеральному середовищі наведеного вище складу, що містить суміш ацетату натрію (0,25 %, масова частка) і меляси (0,25 %, масова частка) 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 80 год.

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

Приклад 1. Синтез екзополісахариду *Acinetobacter* sp. 1MB B-7005 на середовищах з різним вмістом солей

Культивування бактерій здійснюють на мінеральних середовищах такого складу (г/л), середовище 1: KH_2PO_4 - 3,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 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; середовище 2: KH_2PO_4 - 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 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 середовища додатково вносять 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізу та 0,0006 % (масова частка) пантотенату кальцію. Як джерело вуглецю і енергії використовують суміш етанолу (0,75 %, об'ємна частка) і

меляси (0,75 % за вуглеводами, масова частка), а також суміш ацетату натрію (1,1 %, масова частка) і меляси (1,5 %, масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (16-18 год), вирощену на мінеральному середовищі 1, що містить 0,5 % (об'ємна частка) етанолу, а також на середовищі 2, що містить (0,5 % (масова частка) меляси 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 упродовж 96 год.

Концентрацію біомаси визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу клітин (АСБ) у відповідності з калібрувальним графіком. Ефективність трансформації вуглецю субстратів в ЕПС оцінюють за такими показниками: кількість синтезованих ЕПС і 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.

Як видно з наведених у табл. 1 даних, при вирощуванні продуцента на середовищі 2 із зниженим вмістом солей концентрація біомаси та ЕПС дещо знижуються, проте ЕПС-синтезувальна здатність підвищується майже на 20 %.

Таблиця 1

Синтез екзополісахариду за умов росту продуцента на середовищах з різним вмістом солей

Середовище культивування	Субстрат	АСБ, г/л	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г АСБ
1 (найближчий аналог)	Етанол + меляси	2,46	11,2	4,55
2	Ацетат + меляси	1,7	9,2	5,4

Приклад 2. Залежність синтезу екзополісахариду на суміші ацетату і меляси від способу підготовки інокуляту

Acinetobacter sp. 1MB B-7005 вирощують на середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 - 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 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 ацетату натрію (1,1 %, масова частка) і меляси (1,5 %, 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) меляси або суміш ацетату натрію (0,25 %, масова частка) і меляси (0,25 %, масова частка) 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 упродовж 96 год. Показники синтезу екзополісахариду наведено у табл. 2.

Як видно з наведених у табл. 2 даних, за використання посівного матеріалу, вирощеного на суміші ацетату натрію і меляси, спостерігається підвищення показників синтезу ЕПС порівняно із застосуванням інокуляту, вирощеного на мелясі.

Таблиця 2

Синтез екзополісахариду на суміші ацетату і меляси від способу підготовки інокуляту

Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	АСБ, г/л	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г АСБ
Меляси, 0,5 %	1,7	9,2	5,4
Ацетат натрію, 0,25 % + меляси, 0,25 %	1,6	11,0	6,9

Приклад 3. Вплив тривалості культивування на синтез екзополісахариду на суміші ацетату і меляси

Культивування бактерій здійснюють як описано у прикладі 2. Як інокулянт використовують куль-

туру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі з ацетатом натрію (0,25 %) і меляси (0,25 %), у кількості 10 %. Тривалість культивування становить 72, 80, 88, 96 і 100 год. Показники синтезу наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Синтез екзополісахариду залежно від тривалості культивування продуцента

Тривалість культивування, год	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/г АСБ
72	9,0	5,6
80	11,0	6,9
88	11,0	6,9
96	11,0	6,9
100	11,0	6,9

Як свідчать дані, наведені у табл. 3, максимальні показники синтезу екзополісахариду досягаються за тривалості культивування продуцента 80 год.

Таким чином, використання як ростового субстрату суміші ацетату натрію (1,1 %) і меляси (1,5

%) дає змогу підвищити ЕПС-синтезувальну здатність продуцента у 1,5 рази, скоротити в 1,2 рази тривалість культивування і здійснити процес одержання екзополісахариду на середовищі, в якому вміст солей знижено з 3,7 до 2,5 г/л.