



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110789** (13) **U**

(51) МПК (2016.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/365 (2006.01)

C12N 5/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 03158	(72) Винахідник(и): Пирог Тетяна Павлівна (UA), Никитюк Лілія Вікторівна (UA), Тимошук Катерина Вікторівна (UA), Софілканич Анна Павлівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 28.03.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.10.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.10.2016, Бюл.№ 20	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601 (UA)

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

(57) Реферат:

Спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування штаму *Nocardia vacillii* 1MB B-7405 у рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин. Концентрація технічного гліцерину у середовищі для одержання інокуляту становить 5-7 г/л, а у середовищі для біосинтезу поверхнево-активних речовин - 22-24 г/л.

UA 110789 U

Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР), які можуть бути використані як антиадгезивні агенти у харчовій, фармацевтичній промисловості та медицині.

Відомим аналогом є спосіб одержання ПАР за допомогою штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 [Пат. 10467 UA, МПК C21N 1/02. Штам *Pseudomonas* sp. SP-17 - продуцент позаклітинних біоПАР і біополімеру /Шульга О.М., Карпенко О.В., Елісєєв С.А., Щеглова Р.А., Вільданова-Марцишин Р.І.; Опубл. 25.12.96, Бюл. № 4.]

Недоліком аналога є використання складного мінерального середовища з високим вмістом солей (12 г/л) для культивування продуцента, наявність у його складі факторів росту, а також невисокий вихід ПАР від субстрату.

Найближчим аналогом до корисної моделі є спосіб одержання ПАР за допомогою *Nocardia* vaccinii IMB B-7405 [Пат. 105975 UA, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин /Пирог Т.П., Мащенко О.Ю., Покора Х.А., Гриценко Н.А., Опубл. 10.07.2014, Бюл. № 13], який включає культивування штаму *Nocardia* vaccinii IMB B-7405 у рідкому середовищі з технічним гліцерином в концентрації 3,9-4,1 % (об'ємна частка).

Недоліком найближчого аналога є недостатньо високі антиадгезивні властивості синтезованих ПАР.

В основу корисної моделі поставлена задача створення нового способу одержання ПАР, який покращує антиадгезивні властивості поверхнево-активних речовин.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі одержання поверхнево-активних речовин включає культивування штаму *Nocardia* vaccinii IMB B-7405 у рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин, згідно з корисною моделлю, концентрація технічного гліцерину у середовищі для одержання інокуляту становить 5-7 г/л, а у середовищі для біосинтезу поверхнево-активних речовин - 22-24 г/л.

Використання для одержання інокуляту і біосинтезу ПАР технічного гліцерину у концентрації 5-7 і 22-24 г/л відповідно дає змогу одержати ПАР, після обробки розчинами яких абіотичних поверхонь адгезія мікроорганізмів на них знижується на 15-25 % (до 30-45 %).

Корисну модель виконують наступним чином.

Культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 здійснюють у рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 -0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1, KH_2PO_4 -0,1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,001, дріжджовий автолізат - 0,5 % (об'ємна частка); pH 6,8-7,0. Як джерело вуглецю використовують технічний гліцерин у концентрації 23 г/л. Як посівний матеріал використовують культуру в експоненційній фазі, вирощену у середовищі наведеного складу з 6 г/л технічного гліцерину. Інокулят, в якому чисельність бактерій становить 10^4 - 10^5 кл/мл, вносять у кількості 10 % від об'єму середовища.

Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28 °C упродовж 120 год.

Використання нового способу дає змогу одержати ПАР, після обробки розчинами яких абіотичних поверхонь адгезія мікроорганізмів на них знижується на 15-25 % (до 30-45 %).

Приклад 1. Антиадгезивні властивості ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 залежно від якості гліцерину у середовищі культивування.

Культивування штаму IMB B-7405 здійснюють у рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 -0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1, KH_2PO_4 -0,1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,001, дріжджовий автолізат - 0,5 % (об'ємна частка); pH 6,8-7,0. Як джерело вуглецю використовують очищений та технічний гліцерин (Комсомольський біопаливний завод, Полтавська обл.) у концентрації 20 г/л. Як посівний матеріал використовують культуру в експоненційній фазі, вирощену на середовищі наведеного складу з 5 г/л відповідного гліцерину.

Інокулят, в якому чисельність бактерій становить 10^4 - 10^5 кл/мл, вносять у кількості 5 % від об'єму середовища.

Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 28 °C упродовж 120 год.

Позаклітинні поверхнево-активні речовини виділяють так. Культуральну рідину центрифугують (5000 g, 20 хв.) для відділення біомаси. 25 мл супернатанту переносять у циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл, додають 5 мл 1М HCl, воронку закривають пришліфованим корком і струшують упродовж 3 хв., далі додають ще 4 мл 1М HCl й 16 мл суміші хлороформу й метанолу (2:1) й струшують упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишають у воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирають (органічний екстракт 1), а водну фазу ще раз екстрагують. При повторній екстракції у водну фазу додають 9 мл 1М HCl й 16 мл суміші хлороформу з метанолом (2:1) й проводять екстракцію ліпідів протягом 5 хв. Після розділення фаз збирають нижню фракцію, одержують

органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додають 25 мл суміші хлороформу з метанолом (2:1) й проводять екстракцію як описано вище, при цьому одержують органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 об'єднують і упарюють на роторному випарнику ІР-ІМ2 (Росія) при температурі 50° й абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

5 Антиадгезивні властивості ПАР визначають так. Однакові очищені пластинки досліджуваного матеріалу (1 см²) стерилізують відповідно до матеріалу: скло, кераміка, нержавіюча сталь - при 112 °С, 1 год.; пластик, лінолеум (полівінілхлорид) - 112 °С, 30 хв., після чого вносять у розчин ПАР (0,05 мг/мл) і висушують упродовж 24 год. у термостаті при 30 °С. Потім однодобові тест-культури бактерій та дріжджів вирощені на м'ясо-пептонному (МПА) та глюкозо-картопляному агарі (ГКА), суспендують у 100 мл стерильної водопровідної води, у суспензію поміщають попередньо оброблені і не оброблені (контрольні) матеріали, витримують 2 год. у термостаті і ополіскують 10 мл стерильної водопровідної води, щоб змити неадгезовані клітини. Далі пластинки матеріалів обробляють метанолом (99 %) протягом 15 хв. з метою фіксування адгезованих клітин з подальшим висушуванням при кімнатній температурі. Потім пластинки витримують у 1 % розчині генціанвіолету 5 хв. і ополіскують водопровідною водою. Після висушування досліджувані матеріали обробляють 10 мл 33 % розчином оцтової кислоти і вимірюють оптичну густину отриманої суспензії.

Кількість адгезованих клітин визначають як відношення оптичної густини суспензії, одержаної з оброблених препаратами ПАР зразків до оптичної густини з контрольних зразків і виражають у відсотках. Як тест-культури під час визначення антимікробних властивостей ПАР використовують штами бактерій (*Escherichia coli* ІЕМ-1, *Bacillus subtilis* БТ-2) і дріжджів (*Candida albicans* Д-6) з колекції живих культур кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Дані щодо адгезії мікроорганізмів на абіотичних поверхнях, оброблених ПАР, наведено у табл. 1.

Таблица 1

Антиадгезивні властивості ПАР *N. vaccini* ІМВ В-7405, синтезованих на очищеному і технічному гліцерині

Гліцерин як субстрат	Матеріал	Адгезія, %		
		<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>Candida albicans</i> Д-6	<i>Escherichia coli</i> ІЕМ-1
очищений	пластик	53	65	56
	кахель	59	66	51
	сталь	59	62	58
	лінолеум	51	67	57
технічний	пластик	39	54	44
	кахель	45	53	40
	сталь	48	50	46
	лінолеум	39	52	42

Наведені дані свідчать, що ПАР, синтезовані на технічному гліцерині, проявляють вищі антиадгезивні властивості, ніж одержані на очищеному субстраті.

30 Приклад 2. Вплив катіонів калію та натрію на активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази *N. vaccini* ІМВ В-7405

Згідно з літературними даними, аміноліпіди є ефективнішими антимікробними та антиадгезивними агентами порівняно з гліколіпідами. Оскільки штам ІМВ В-7405 синтезує комплекс гліко-, аміно- та нейтральних ліпідів, можна припустити, що у процесі культивування *N. vaccini* ІМВ В-7405 на технічному гліцерині вміст аміноліпідів у складі синтезованого комплексу ПАР є вищим, ніж одержаного на середовищі з очищеним субстратом. Однією з причин посилення синтезу аміноліпідів за умов росту штаму ІМВ В-7405 на відходах виробництва біодизелю може бути наявність у складі такого субстрату високої концентрації катіонів калію чи натрію - потенційних активаторів НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази - ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів у *N. vaccini* ІМВ В-7405. Для перевірки цього припущення аналізують вплив різних концентрацій К⁺ і Na⁺ на активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази за умов росту *N. vaccini* ІМВ В-7405 на очищеному гліцерині.

Культивування штаму ІМВ В-7405 здійснюють як описано у прикладі 1 упродовж 48 год. Як джерело вуглецю використовують очищений гліцерин) у концентрації 20 г/л.

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину центрифугують (5000 g, 20 хв., 4 °C). Отриманий осад клітин двічі відмивають від залишків середовища 0,05 М К⁺-фосфатним буфером (рН 7,0), центрифугуючи (4000 g, 15 хв., 4 °C). Відмиті клітини ресуспендують в 0,05 М К⁺-фосфатному буфері (рН 7,0) і руйнують ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 60 с при 4 °C на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугують (12000 g, 30 хв., 4 °C), осад відділяють, а супернатант використовують як безклітинний екстракт.

Активність глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.4) аналізують за утворенням глутамату під час окиснення НАДФН при 340 нм.

Як видно з наведених у табл. 2 даних, внесення у реакційну суміш 50-100 мМ катіонів калію та натрію супроводжується збільшенням активності ферменту в 1,3-2,3 рази порівняно з активністю без катіонів.

Приклад 3. Залежність антиадгезивних властивостей ПАР від концентрації технічного гліцерину у середовищі культивування *N. vassinii* IMB B-7405

Культивування штаму IMB B-7405 здійснюють як описано у прикладі 1.

Таблиця 2

Активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази *N. vassinii* IMB B-7405 за наявності різних концентрацій катіонів калію та натрію

Наявність у реакційній суміші	Концентрація, мМ	Активність, нмоль хв. ⁻¹ мг ⁻¹ білку
KCl	50	635±32
	100	1111±55
NaCl	50	794±39
	100	1111±55
Без солей (контроль)	0	476±232

Як джерело вуглецю використовують технічний гліцерин у концентрації 20-25 г/л.

Як посівний матеріал використовують культуру в експоненційній фазі, вирощену на середовищі наведеного складу з 5 г/л субстрату. Виділення ПАР і визначення антиадгезивних властивостей здійснюють як описано у прикладі 1.

Як свідчать дані, наведені у табл. 3, ступінь адгезії *S. albicans* Д-6 був мінімальним (42-46 %) на поверхнях, оброблених ПАР, синтезованими на середовищі з 22-24 г/л технічного гліцерину.

Таблиця 3

Вплив концентрації технічного гліцерину у середовищі культивування *N. vassinii* IMB B-7405 на антиадгезивні властивості ПАР

Концентрація технічного гліцерину у середовищі, г/л	Адгезія <i>S. albicans</i> Д-6 (%)		
	кахель	сталь	лінолеум
20	54	53	52
21	53	53	52
22	46	43	44
23	45	42	43
24	45	43	45
25	50	49	52

Приклад 4. Вплив концентрації технічного гліцерину у середовищі для одержання інокуляту на антиадгезивні властивості ПАР

Культивування штаму IMB B-7405 здійснюють як описано у прикладі 1.

Як джерело вуглецю використовують технічний гліцерин у концентрації 23 г/л. Як посівний матеріал використовують культуру в експоненційній фазі, вирощену на середовищі наведеного складу з 4-7 г/л субстрату.

Виділення ПАР і визначення антиадгезивних властивостей здійснюють як описано у прикладі 1.

Дані щодо адгезії *S. albicans* Д-6 на абіотичних поверхнях після обробки ПАР, синтезованими з використанням інокуляту різної якості наведено у табл. 4.

Таблиця 4

Залежність антиадгезивних властивостей ПАР N. vaccinii IMB B-7405 від концентрації технічного гліцерину у середовищі для одержання інокуляту

Концентрація технічного гліцерину у середовищі для одержання інокуляту, г/л	Адгезія <i>C. albicans</i> Д-6 (%)		
	кахель	сталь	лінолеум
4	54	53	52
5	45	33	43
6	43	42	43
7	45	43	43
8	55	53	55

Таким чином, використання посівного матеріалу, вирощеного на середовищі, що містить 5-7 г/л технічного гліцерину, супроводжується синтезом ПАР з найвищими антиадгезивними властивостями.

Приклад 5. Порівняння антиадгезивних властивостей ПАР N. vaccinii IMB B-7405, синтезованих, згідно із запропонованим способом і прототипом.

Культивування штаму IMB B-7405 здійснюють як описано у прикладі 1.

Як джерело вуглецю використовують технічний гліцерин у концентрації 23 г/л і 4 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру в експоненційній фазі, вирощену на середовищі наведеного складу з 6 г/л і 0,5 % (об'ємна частка) технічного гліцерину. Тривалість культивування становить 120 і 168 год. на середовищі, що містить 23 г/л і 4 % (об'ємна частка) технічного гліцерину відповідно.

Виділення ПАР і визначення антиадгезивних властивостей здійснюють як описано у прикладі 1.

Дані щодо адгезії мікроорганізмів на абіотичних поверхнях після обробки ПАР, синтезованими в різних умовах культивування штаму IMB B-7405 на технічному гліцерині, наведено у табл. 5.

Таблиця 5

Антиадгезивні властивості ПАР N. vaccinii IMB B-7405, синтезованих на технічному гліцерині

Спосіб одержання ПАР	Матеріал	Адгезія, %		
		<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	<i>Candida albicans</i> Д-6	<i>Escherichia coli</i> IEM-1
Запропонований спосіб	пластик	33	45	30
	кахель	39	43	35
	сталь	39	42	37
	лінолеум	31	43	30
Прототип	пластик	53	65	55
	кахель	54	63	56
	сталь	54	57	55
	лінолеум	48	58	45

Отже, використання для одержання інокуляту і біосинтезу ПАР технічного гліцерину у концентрації 5-7 і 22-24 г/л відповідно дає змогу одержати ПАР, після обробки розчинами яких абіотичних поверхонь адгезія мікроорганізмів на них знижується на 15-25 % (до 30-45 %) порівняно з застосуванням розчинів ПАР аналогічної концентрації, одержаних згідно з прототипом.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування штаму *Nocardia vassinii* 1MB B-7405 у рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин, який **відрізняється** тим, що концентрація технічного гліцерину у середовищі для одержання інокуляту становить 5-7 г/л, а у середовищі для біосинтезу поверхнево-активних речовин - 22-24 г/л.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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

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