



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115495** (13) **C2**

(51) МПК

C12P 1/06 (2006.01)**C12N 1/14** (2006.01)**C12R 1/365** (2006.01)МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД****(21)** Номер заявки: **а 2016 03156****(22)** Дата подання заявки: **28.03.2016****(24)** Дата, з якої є чинними
права на винахід: **10.11.2017****(41)** Публікація відомостей
про заявку: **10.10.2016, Бюл.№ 19****(46)** Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.11.2017, Бюл.№ 21****(72)** Винахідник(и):**Пирог Тетяна Павлівна (UA),
Никитюк Лілія Вікторівна (UA),
Тимошук Катерина Вікторівна (UA)****(73)** Власник(и):**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,
вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601 (UA)****(56)** Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

UA 101395 U, 10.09.2015
Панасюк К. Вплив умов культивування
Nocardia vaccinia IMB B-7405 на
антимікробні властивості поверхнево-
активних речовин щодо фітопатогенних
бактерій / К. Панасюк, А. Конон // Наукові
здобутки молоді – вирішенню проблем
харчування людства у XXI столітті :
матеріали 80 міжнар. наукової конференції
молодих вчених, аспірантів і студентів, Київ,
10-11 червня 2014 / НУХТ. – Київ, 2014. – С.
636-637
Панасюк К. В. Вплив умов культивування
Nocardia vaccinia IMB B-7405 на
антимікробні властивості поверхнево-
активних речовин щодо фітопатогенних
бактерій // Нові ідеї в харчовій науці – нові
продукти харчової промисловості :
матеріали міжнар. наукової конференції,
присвяч. 130-річчю НУХТ, Київ, 13-17
жовтня 2014 / НУХТ. – Київ, 2014. – С. 494
Пирог Т. П. Синтез поверхностно-активних
веществ *Rhodococcus erythropolis* IMB AC-
5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241
и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на
промышленных отходах / Т. П. Пирог, А. П.
Софилканич, К. А. Покора, Т. Ф. Шевчук, Г.
А. Иутинская // Микробиологический
журнал. – 2014. – Т. 76, № 2. – С. 17-23
UA 109825 C2, 12.10.2015
UA 63962 U, 25.10.2011

UA 115495 C2

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН**(57)** Реферат:

Винахід належить до способу одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування штаму *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить

мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення пересмажену соняшкову олію. Для біосинтезу поверхнево-активних речовин і одержання інокуляту використовують відпрацьовану після смаження картоплі олію.

Винахід належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР), які можуть бути використані як антимікробні агенти у харчовій промисловості, медицині та сільському господарстві.

Відомий 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.]

Його недоліком 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.

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення (прототип) є спосіб одержання ПАР за допомогою *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 [Пат. 101395 UA, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Панасюк К.В., Никитюк Л.В. Опубл. 10.09.2015, Бюл. № 17], який включає культивування штаму *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело вуглецевого живлення пересмажену соняшникову олію, з використанням посівного матеріалу, вирощеного на мелясі.

Недоліком цього способу є недостатньо високі антимікробні властивості синтезованих ПАР.

В основу винаходу поставлено задачу створення нового способу одержання ПАР, який покращує антимікробні властивості поверхнево-активних речовин.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування штаму *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення пересмажену соняшникову олію. Згідно винаходу для біосинтезу поверхнево-активних речовин і одержання інокуляту використовують відпрацьовану після смаження картоплі олію.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Використання відпрацьованої після смаження картоплі олії для одержання інокуляту і біосинтезу ПАР дає змогу знизити мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) синтезованих ПАР у 1,8-3,5 разів (до 8-50 мкг/мл).

Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 здійснюють на 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 відпрацьовану після смаження картоплі олію (мережа ресторанів швидкого харчування McDonald's, Київ) у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру в експоненційній фазі, вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % відпрацьованої після смаження картоплі олії. 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 знизити мінімальну інгібуючу концентрацію синтезованих ПАР у 1,8-3,5 разів (до 8-50 мкг/мл).

Приклад 1. Антимікробні властивості ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 залежно від якості пересмаженої олії у середовищі культивування.

Культивування штаму IMB B-7405 здійснюють на 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 відпрацьовану після смаження картоплі і м'яса олію (мережа ресторанів швидкого харчування McDonald's, Київ) у концентрації 2 % (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовують культуру в експоненційній фазі, вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % відповідної олії. 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 ділільну лійку об'ємом 100 мл, додають 5 мл 1 М HCl, лійку закривають прищліфованим корком і струшують упродовж 3 хв, далі додають ще 4 мл 1 М HCl й 16 мл суміші хлороформу й метанолу (2:1) й струшують упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишають у лійці 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 1 М 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.

Антимікробні властивості поверхнево-активних речовин аналізують за показником мінімальної інгібуючої концентрації. МІК - це найменша концентрація препарату, що пригнічує видимий неозброєним оком ріст тест-культури. МІК є незалежним показником, за допомогою якого можна одночасно порівняти ефективність кількох антимікробних агентів. На відміну від інших методів аналізу активності відповідних препаратів, визначення МІК має ряд переваг: простота і швидкість аналізу, можливість одночасного визначення для кількох тест-культур, дослідження ефективності різних концентрацій препарату, можливість порівняння ефективності різних препаратів чи препаратів різного ступеня очищення. Визначення МІК є важливим фактором у лабораторній діагностиці для виявлення стійкості мікроорганізмів до антимікробних препаратів, а також для контролю ефективності нових лікарських засобів. У медичній практиці за допомогою цього показника обирають антибіотики та встановлюють необхідні їх дози для лікування пацієнтів.

Визначення мінімальної інгібуючої концентрації здійснюють методом двократних серійних розведень у м'ясопептонному бульйоні (МПБ) для бактерій і рідкому суслі для дріжджів. У стерильних умовах у 10 пробірок вносять по 1 мл середовища, у першу додають 1 мл розчину ПАР певної концентрації, після чого перемішують, відбирають 1 мл і переносять у наступну пробірку. Аналогічно проводять розведення для наступних дев'яти пробірок. З останньої пробірки відбирають 1 мл. Таким чином, кінцевий об'єм у кожній пробірці становить 1 мл (МПБ чи рідке сусло і розчин ПАР), а концентрація ПАР у кожній наступній пробірці знижується у 2 рази. Як контроль використовують 1 мл МПБ (рідкого сусла) без додавання розчину ПАР. Далі у кожну з пробірок вносять по 0,1 мл суспензії тест-культур (10^5 - 10^6 КУО/мл), та перемішують. Пробірки інкубують впродовж 24 год. при 28-30 °С.

Результати оцінюють візуально за помутнінням середовища: (+) - пробірки, в яких спостерігають помутніння середовища (ріст тест-культури), (-) - помутніння немає (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР визначають як середнє значення між концентраціями ПАР в останній пробірці, де ріст відсутній, і в попередній, де він наявний.

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, а також фітопа-тогенні бактерії з Української колекції мікроорганізмів (УКМ): *Pectobacterium carotovorum* УКМ В-1095, *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1015 і *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049.

Значення мінімальної інгібуючої концентрації ПАР залежно від типу пересмаженої соняшникової олії наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Мінімальна інгібуюча концентрація поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, синтезованих на олієвмісних субстратах

Олія як субстрат для синтезу ПАР	Тест-культура	МІК, мкг/мл
Відпрацьована після смаження м'яса	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	56
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	142
	<i>E. coli</i> IEM-1	28
	<i>C. albicans</i> Д-6	71
	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В- 1015	49
	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> УКМ В-1049	28
	<i>P. corotovororum</i> УКМ В-1095	90
Відпрацьована після смаження картоплі	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	16
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	50
	<i>E. coli</i> IEM-1	8
	<i>C. albicans</i> Д-6	33
	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1015	14
	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> УКМ В-1049	16
	<i>P. corotovororum</i> УКМ В-1095	50

Наведені дані свідчать, що ПАР, синтезовані на відпрацьованій після смаження картоплі олії, проявляють вищі антимікробні властивості, ніж одержані на відпрацьованому після смаження м'яса субстраті: МІК становить 8-50 і мкг/мл 28-142 відповідно.

Приклад 2. Залежність антимікробних властивостей ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту. Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу (див. приклад 1). Як джерело вуглецю використовують відпрацьовану після смаження картоплі олію у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,8 % меляси (масова частка), 0,5 % відпрацьованої після смаження картоплі олії. Кількість інокуляту - 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 °С упродовж 120 год.

Виділення ПАР і визначення мінімальної інгібуючої концентрації здійснюють як описано у прикладі 1.

Як видно з наведених у табл. 2 даних, значення МІК ПАР, синтезованих з використанням для одержання інокуляту відпрацьованої після смаження картоплі олії, є в 1,8-3,5 разу нижчими, ніж показники, встановлені для ПАР, одержаних із застосуванням посівного матеріалу, вирощеного на мелясі.

Таблиця 2

Вплив природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту на антимікробні властивості ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405, синтезованих на відпрацьованій після смаження картоплі олії

Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	Тест-культури	МІК, мкг/мл
Меляса	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	45
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	90
	<i>E. coli</i> IEM-1	28
	<i>C. albicans</i> Д-6	90
Відпрацьована після смаження картоплі олія	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини)	16
	<i>B. subtilis</i> БТ-2 (спори)	50
	<i>E. coli</i> IEM-1	8
	<i>C. albicans</i> Д-6	33

Приклад 3. Активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази *N. vaccinii* IMB B-7405 від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту

Оскільки штам IMB B-7405 синтезує комплекс гліко-, фосфо-, аміно- та нейтральних ліпідів, цілком ймовірно, що в різних умовах культивування *N. vaccae* IMB B-7405 може змінюватися співвідношення компонентів комплексу. За літературними даними аміноліпіди є ефективнішими антимікробними агентами порівняно з гліколіпідами. Отже, можливо, що за використання відпрацьованої олії як для одержання інокуляту, так і біосинтезу ПАР вміст аміноліпідів у складі синтезованого комплексу є вищим, ніж при вирощуванні посівного матеріалу на середовищі з мелясою. Для перевірки цього припущення аналізують активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази - ключового ферменту біосинтезу аміноліпідів у *N. vaccae* IMB B-7405.

Культивування штаму IMB B-7405 здійснюють як описано у прикладі 2 упродовж 24 і 48 год.

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. 3 даних, активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази за умов росту *N. vaccae* IMB B-7405 на відпрацьованій після смаження картоплі олії є вищою у разі вирощування інокуляту на такому самому субстраті.

Таблиця 3

Вплив природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту на активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази *N. vaccae* IMB B-7405

Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	Активність (нмоль хв. ⁻¹ мг ⁻¹ білка) у фазі росту	
	ранній експоненційний	пізній експоненційний
Меляса	800±40	950±47
Відпрацьована після смаження картоплі олія	1200±60	1600±80

Отже, використання відпрацьованої після смаження картоплі олії для одержання інокуляту і біосинтезу ПАР *N. vaccae* IMB B-7405 дає змогу знизити мінімальну інгібуючу концентрацію синтезованих поверхнево-активних речовин у 1,8-3,5 разу (до 8-50 мкг/мл).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування штаму *Nocardia vaccae* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення пересмажену соняшникову олію, який **відрізняється** тим, що для біосинтезу поверхнево-активних речовин і одержання інокуляту використовують відпрацьовану після смаження картоплі олію.

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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