



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 105975

(13) C2

(51) МПК

C12N 1/02 (2006.01)

C12R 1/365 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2013 01185**
- (22) Дата подання заявки: **31.01.2013**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.07.2014**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **10.10.2013, Бюл.№ 19**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.07.2014, Бюл.№ 13**
- (72) Винахідник(и):
**Пирог Тетяна Павлівна (UA),
Мащенко Оксана Юріївна (UA),
Покора Христина Андріївна (UA),
Гриценко Наталія Анатоліївна (UA)**
- (73) Власник(и):
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,
вул. Володимирська, 68, м. Київ-33,
01601 (UA)**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Sofilkanych, A. Use of cells and metabolites of *Nocardia vaccini* k-8 in bioremediation processes / A. Sofilkanych, T. Pirog, N. Grytsenko // Development of Human Sciences : Materials of International Scientific Conference, 27.02.2012 – 29.02.2012, Poznan. - 2012. - [знайдено 25.02.2014]. Знайдено із Інтернет: <URL: <http://xn--e1aajfpcds8ay4h.com.ua/pages/view/201>>.
Гриценко, Н. А. Розробка технології поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccini* K-8 / Н. А. Гриценко // Сборник материалов VIII Международной конференции «Микробные биотехнологии: актуальность и будущее», 19-22 ноября 2012 г., г. Киев. - С. 32-33.
Antonyuk, S. O. *Nocardia vaccini* K-8 and *acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 – potential destructors of aromatic compounds / S. Antonyuk, A. Sofilkanych, T. Pirog // Materials of International Scientific Conference "Development of Human Sciences", 27.02.2012 – 29.02.2012, Poznan. - 2012. - Р. 28. [знайдено 25.02.2014]. Знайдено із Інтернет: <URL: <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/977>>.
Пирог, Т. П. Штам бактерій *Nocardia vaccini* K-8 як потенційний продуцент поверхнево-активних речовин / Т. П. Пирог, Н. А. Манжула // Харчова промисловість. - 2008. - № 7. - С. 29–32. [знайдено 25.02.2014]. Знайдено із Інтернет: <URL: <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/6029>>.
Хом'як, Д. І. Використання відходів виробництва біодизелю для синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccini* k-8 та дослідження їх впливу на біодеструкцію нафти / Д. І. Хом'як, О. О. Боровик, Н. А. Гриценко, А. Д. Конон, Т. П. Пирог // Збірник наукових праць "Технічні науки": Вінницького національного аграрного університету. – 2011. – № 8. [знайдено 25.02.2014]. Знайдено із Інтернет: <<http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/2431>>.
Яцук, Д. В. Застосування методів математичного планування для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccini* K-8 на гліцерині / Д. В. Яцук, Н. А. Гриценко, Т. П. Пирог // Наукові праці НУХТ. – 2011. – № 37-38. – С. 127-132.
F. Yassin and S. Brenner. *Nocardia elegans* sp. nov., a member of the *Nocardia vaccini* clade isolated from sputum, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn, 53127 Bonn, Germany. International journal of systematic and evolutionary microbiology (Impact Factor: 2.11). 08/2005; 55(Pt 4):1505-9. UA 10467 C2, 25.12.1996.
UA 77345 C2, 15.11.2006.
Пирог, Т. П. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва / Т. П. Пирог, С. В. Ігнатенко // Біотехнологія. - 2008. - Т. 1, № 4. - С. 29-38. [знайдено 25.02.2014]. Знайдено із Інтернет: <URL: <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/6054>>.
Морозова, А. П. Відходи промислових виробництв як субстрати для отримання поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccini* K-8 та *Rhodococcus erythropolis* EK-1 / А. П. Морозова, Н. А. Гриценко, Т. П. Пирог // Екологічна і техногенна безпека. Охорона водного і повітряного басейнів. Утилізація відходів: XVIII міжн. наук.-техн. конф., 07-11 червня 2010. - С. 57-65. [знайдено 25.02.2014]. Знайдено із Інтернет: <<http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/6028>>.
Хом'як, Д. І. Вплив органічних кислот на синтез поверхнево-активних речовин за умов росту *Nocardia vaccini* K-8 на гліцерині / Д. І. Хом'як, Н. А. Гриценко, А. Д. Конон, Т. П. Пирог // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. - № 1(17). - С. 31-38.
UKRAINIAN FOOD JOURNAL 2012 V.1 Is.1 p. 12-16, 21-24 та 46-48. [знайдено 25.02.2014]. Знайдено із Інтернет: <URL: <http://www.ufj.ho.ua/Archiv/UKRAINIAN%20FOOD%20JOURNAL%202012%20V.1%20Is.1.pdf>>.
Пирог, Т. П. Синтез поверхнево-активних речовин у процесі культивування *Nocardia vaccini* K-8 на гліцерині / Т. П. Пирог, Н. А. Манжула // Наукові праці НУХТ. – 2008. - № 25, Ч. 1. - С. 107-109. [знайдено 25.02.2014]. Знайдено із Інтернет: <<http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/6056>>.
Оптимізація синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccini* K-8 при біоконверсії відходів виробництва біодизелю / Т. П. Пирог, Н. А. Гриценко, Д. І. Хом'як, А. Д. Конон, С. І. Антонюк // Мікробіологічний журнал. – 2011. - Т. 73, № 4. - С. 15-24.

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

UA 105975 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до способу одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі з технічним гліцерином в концентрації, що становить 3,9–4,1 %.

Винахід належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання поверхнево-активних речовин, які можуть бути використані для очищення доквілля від нафти і нафтових забруднень, а також у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій промисловості.

Винахід належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання поверхнево-активних речовин (ПАР), які можуть бути використані для очищення доквілля від нафти та нафтових забруднень, а також у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій промисловості.

5 Відомий спосіб одержання ПАР за допомогою штаму *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., Щеглова Р.А., Вільданова-Марцишин Р.І.; Опубл. 25.12.96, Бюл. № 4.]

10 Його недоліком є використання складного мінерального середовища з високим вмістом солей (12 г/л) для культивування продуцента і наявність у його складі факторів росту.

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. Опубл. 15.11.2006, Бюл. № 11].

15 В основу винаходу поставлено задачу одержання поверхнево-активних речовин з використанням невідомого раніше штаму бактерій *Nocardia vaccinii* К-8, який відрізняється від вище згаданих тим, що здатний рости на простому мінеральному середовищі з низьким вмістом солей (менше 2 г/л) з використанням як ростового субстрату технічного гліцерину (продукт виробництва біодизелю) у концентрації 3,9-4,1 % (об'ємна частка) і синтезувати позаклітинні

20 поверхнево-активні речовини (умовна концентрація ПАР 7,3).

Штам *N. vaccinii* К-8 виділено із забруднених нафтою зразків ґрунту. Штам депоновано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України ім. Д.К. Заболотного за номером IMB B-7405.

25 Штам *N. vaccinii* IMB B-7405 характеризується такими морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними ознаками.

Клітини фарбуються за Грамом позитивно, нерухливі.

На 24 год. росту на м'ясо-пептонному агарі (МПА) клітини мають вигляд паличок завдовжки 2-6 мкм, є окремі зігнуті палички та ланцюжки з 4-5 паличок однакової довжини. На 24 год. росту на глюкозо-картопляному агарі (ГКА) клітини паличкоподібні (2-6 мкм), рідко зустрічаються

30 окремі поодинокі коки та дуже рідко - ланцюжки з трьох коків.

На 48 год. росту на МПА - в основному палички завдовжки 2-6 мкм, є зігнуті, зустрічаються довгі рівні палички (до 10-15 мкм). Кокових форм немає. На 48 год. росту на ГКА - палички (2-6 мкм), розміщені поодинокі і попарно. Палички в основному рівні, є окремі ледь зігнуті. Багато поодиноких коків, дуже рідко зустрічаються ланцюжки з 4-7 коків.

35 На 72 год. росту на МПА клітини мають вигляд паличок (2-6 мкм), розміщених в основному поодинокі та рідко - попарно. Довгих та зігнутих паличок немає. Рідко зустрічаються моно- та диплококи. На 72 год. росту на ГКА клітини мають вигляд поодиноких паличок завдовжки 2-6 мкм, рідко ланцюжки з трьох паличок. Зустрічаються поодинокі коки.

40 У процесі вирощування на МПА і ГКА на 72 год. штам *N. vaccinii* К-8 утворює складчасті зморшкуваті колонії (3-5 мм) кремово-білого кольору.

Під час культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 у рідкому мінеральному поживному середовищі з гідрофільними субстратами (етанол, глюкоза) утворюється здебільшого гомогенна суспензія, у деяких випадках формуються окремі агрегати клітин, забарвлення культуральної рідини від мутно-білого до мутно-коричневого з рожевим відтінком залежно від умов культивування. У

45 процесі вирощування на рідких мінеральних середовищах з гідрофобними субстратами (гексадекан, рідкі парафіни) спостерігається здебільшого агрегація клітин.

Як джерело вуглецю і енергії використовує гліцерин, глюкозу, етанол, гексадекан, рідкі парафіни. Як джерело азотного живлення використовує мінеральний (нітратний, гірше амонійний) та органічний (сечовина) азот.

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

Аероб. Температурний діапазон росту 10-42 °С. Оптимальна температура 24-30 °С. рН 5,5-8,0. Оптимум рН 6,5-7,5.

55 Умови і середовище для довготривалого зберігання штаму. Штам зберігають при температурі +4 °С на м'ясо-пептонному або глюкозо-картопляному агарі. Пересіви здійснюють через три місяці.

Склад середовища для культивування штаму (г/л). NaNO_3 -1,0; KH_2PO_4 -0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,001; рН 6,8-7,0. Джерело вуглецю - технічний гліцерин (гліцерінова фракція) у концентрації 3,9-4,1 % (об'ємна частка).

Умови культивування штаму для біосинтезу ПАР. Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного складу, що містить 0,5 % (об'ємна частка) технічного гліцерину як джерела вуглецю та енергії. Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища.

5 Культивування здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв), коефіцієнт масопереносу $0,14 \text{ г O}_2 / \text{л год.}$, температура 28-30 °C, тривалість культивування 168 год.

Приклад 1. Синтез поверхнево-активних речовин за умов росту *N. vaccinii* IMB B-7405 на очищеному і технічному гліцерині

10 *N. vaccinii* IMB B-7405 вирощують на середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 -1,0; KH_2PO_4 -0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,001; pH 6,8-7,0. Як джерело вуглецю використовують очищений гліцерин (1 %, об'ємна частка) і технічний гліцерин (2 %, об'ємна частка). Технічний гліцерин одержано від підприємства-виробника біодизелю (Запорізький біопаливний завод). Очищений і технічний гліцерин еквімолярні за вуглецем.

15 Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного складу, що містить 0,5 % (об'ємна частка) очищеного або технічного гліцерину як джерела вуглецю та енергії. Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища.

Культивування здійснюють на качалці (320 об/хв) при 28-30 °C упродовж 168 год.

20 Поверхневий натяг (σ_s) визначають за допомогою напівавтоматичного тензіометра TD1C LAUDA (Німеччина). Для оцінки кількісного вмісту ПАР у культуральній рідині використовують показник "умовної концентрації ПАР" (ПАР*). Цей показник визначають як ступінь розведення культуральної рідини в точці різкого збільшення поверхневого натягу на графіку залежності σ_s від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР.

25 Емульгувальну здатність (індекс емульгування) культуральної рідини визначають так. До 2 мл культуральної рідини додають 2 мл субстрату для емульгування та струшують упродовж 2 хв. Вимірювання індексу емульгування (E_{24}) проводять через 24 год. як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини в пробірці і виражають у відсотках. Як субстрат для емульгування використовують соняшникову олію.

30 Якісний аналіз поверхнево-активних ліпідів здійснюють методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 ("Merck", Німеччина) в 4 системах розчинників: полярна система I: хлороформ-метанол-вода (85:15:1); полярна система II: хлороформ-метанол-вода (65:15:2); неполярна система III: гексан-діетиловий ефір (2:1); неполярна система IV: гексан-діетиловий ефір-оцтова кислота (90:10:1).

35 Для ідентифікації ліпідних фракцій використовують специфічні реагенти: пластинки зафарбовують спиртовим розчином фосфомолібденової кислоти і парами йоду (нейтральні ліпіди), розчином нінгідрину (аміноліпіди), анісовим альдегідом і антроновим реактивом (гліколіпіди).

40 Екстракцію поверхнево-активних ліпідів модифікованою сумішшю Фолча здійснюють так. Культуральну рідину, отриману після культивування *N. vaccinii* IMB B-7405, центрифугують при 5000 g упродовж 20 хв для відділення біомаси. 25 мл супернатанту поміщають в циліндричну ділильну лійку об'ємом 100 мл, додають 5 мл 1M HCl, лійку закривають пришліфованою пробкою і струшують 3 хв, потім додають ще 4 мл 1M HCl і 16 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і струшують (з метою екстракції ліпідів) упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишають у лійці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирають (органічний екстракт 1), а водну фазу піддають повторній екстракції. При повторній екстракції до водної фази додають 9 мл 1M HCl і 16 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснюють екстракцію ліпідів упродовж 5 хв. Після розділення фаз збирають нижню фракцію і отримують органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додають 25 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснюють екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 об'єднують і упарюють на роторній випарній установці IP-1M2 (Росія) при температурі 50 °C і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

Показники синтезу ПАР наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Синтез ПАР N. vaccinii IMB B-7405 на середовищі з різними видами гліцерину

Гліцерин	ПАР*	E ₂₄ , %
Очищений	2,5±0,13	60±3
Технічний (відхід виробництва біодизелю)	7,1±0,35	70±4

Встановлено, що за хімічним складом позаклітинні поверхнево-активні речовини штаму K-8 є комплексом нейтральних, аміно- та гліколіпідів. Нейтральні ліпіди представлені міколовими і n-алкановими кислотами, гліколіпіди - трегалозодіацелатами і трегалозоміколатами.

Отже, за умов росту штаму IMB B-7405 на технічному гліцерині показники синтезу поверхнево-активних речовин є вищими, ніж на очищеному субстраті. Здатність бактерій роду *Nocardia* до синтезу позаклітинних трегалозоміколатів встановлено нами вперше.

Приклад 2. Вплив різних концентрацій технічного гліцерину на синтез ПАР N. vaccinii IMB B-7405

Культивування штаму IMB B-7405 здійснюють як описано у прикладі 1. Як джерело вуглецю та енергії використовують технічний гліцерин у концентрації 2-6 % (об'ємна частка). Тривалість культивування 168 і 240 год. Концентрацію синтезованих позаклітинних ПАР визначають ваговим методом після екстракції модифікованою сумішшю Фолча як описано у прикладі 1.

Показники синтезу ПАР наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Залежність синтезу ПАР від концентрації технічного гліцерину

Концентрація технічного гліцерину, %	Тривалість культивування, год.	ПАР, г/л
2	168	3,40±0,17
3	168	3,60±0,18
3,5	168	3,65±0,18
3,7	168	3,85±0,19
	240	4,00±0,20
3,9	168	4,78±0,23
	240	4,85±0,25
4,1	168	4,90±0,25
	240	4,90±0,25
4,3	168	4,20±0,21
	240	4,20±0,21
4,5	168	4,10±0,21
5	168	3,00±0,15
6	168	2,96±0,14

Отже, найвищі показники синтезу ПАР за умов росту штаму IMB B-7405 на середовищі з технічним гліцеином спостерігаються за концентрації субстрату 3,9-4,1 % (об'ємна частка). Підвищення тривалості культивування до 240 год. не супроводжується збільшенням концентрації синтезованих ПАР.

Приклад 3. Порівняння здатності штамів N. vaccinii IMB B-7405 і R. erythropolis IMB Ac-5017 до синтезу ПАР

N. vaccinii IMB B-7405 культивують упродовж 168 год. в умовах, описаних у прикладі 2. Концентрація технічного гліцерину у середовищі 4 % (об'ємна частка). R. erythropolis IMB Ac-5017 вирощують упродовж 168 год. на середовищі такого складу (г/л): 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 використовують гексадекан у концентрації 2 % (об'ємна частка).

У табл. 3 наведено основні показники синтезу ПАР N. vaccinii IMB B-7405 та R. erythropolis IMB Ac-5017 (прототип).

Таблиця 3

Основні показники синтезу ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 і *R. erythropolis* IMB Ac-5017

Продуцент	Вміст солей у середовищі, г/л	Концентрація позаклітинних ПАР (г/л)	ПАР*	Хімічний склад ліпідів
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	1,3	4,90	7,3	Гліколіпіди, нейтральні ліпіди, аміноліпіди
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017 (прототип)	3,1	3,90	6,0	Гліколіпіди, нейтральні ліпіди, фосфоліпіди

- Отже, порівняно з прототипом штам *N. vaccinii* IMB B-7405 має такі переваги: синтезує поверхнево-активні речовини на простому мінеральному середовищі з низьким вмістом солей - 1,3 г/л; синтезує ПАР на відходах виробництва біодизелю; вищі показники синтезу (як умовна концентрація ПАР, так і концентрація позаклітинних поверхнево-активних речовин).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 10 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі з гліцерином, який **відрізняється** тим, що як гліцерин використовують технічний гліцерин в концентрації, що становить 3,9-4,1 %.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

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

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