



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 108705

(13) C2

(51) МПК

C12P 1/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/365 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2014 02241

(22) Дата подання заявки: 05.03.2014

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: 25.05.2015

(41) Публікація відомостей
про заявку: 25.12.2014, Бюл.№ 24

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: 25.05.2015, Бюл.№ 10

(72) Винахідник(и):

Пирог Тетяна Павлівна (UA),
Берегова Христина Андріївна (UA),
Кудря Надія Володимирівна (UA)

(73) Власник(и):

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,
вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601 (UA)

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

UA 10467 A, 25.12.1996

UA 81804 U, 10.07.2013

UA 81803 U, 10.07.2013

Пирог Т.П., Покора К.А., Машенко О.Ю.,
Шевчук Т.А. Интенсификация синтеза
поверхностно-активных веществ *Nocardia*
vaccinii K-8 на техническом глицерине // *Мікробіол. журн.* - 2013. - 75, № 1. - С. 13-22
Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Хомяк Д.И.,
Конон А.Д., Антонюк С.И. Оптимизация
синтеза поверхностно-активных веществ
Nocardia vaccinii K-8 при биоконверсии
отходов производства биодизеля // *Мікробіол. журн.* - 2011. - 73, № 4. - С. 15-24
Пирог Т.П., Савчук О.М. Особливості
синтезу мікробного полісахариду етаполану
на суміші фумарату та меляси // *Цукор*
України. - 2011. - № 5 (65). - С. 45-48

(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 суміш ростових субстратів, а саме використовують суміш гліцерину (0,9-1,1 %, об'ємна частка) та меляси (1,9-2,1 %, масова частка).

UA 108705 C2

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, наявність у його складі факторів росту, а також невисокий вихід ПАР від субстрату.

15 Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення (прототип) є спосіб одержання ПАР за допомогою *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 [Пат. 81804 UA, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Шулякова М.О., Машченко О.Ю. Опубл. 10.07.2013, Бюл. № 13], який включає культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і джерело вуглецю і енергії. Для підвищення умовної концентрації ПАР як джерело вуглецю та енергії використовують суміш гексадекану і гліцерину у молярному співвідношенні 1:7, а концентрація гексадекану і гліцерину становить (% , об'ємна частка) 0,59-0,61 і 0,83-0,85 відповідно.

20 Недоліком цього способу є недостатньо висока ПАР-синтезувальна здатність (кількість грам ПАР, синтезованих 1 г біомаси).

В основу винаходу поставлено задачу створення нового способу одержання поверхнево-активних речовин, який підвищує ПАР-синтезувальну здатність.

25 Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування штаму *Nocardia vacsinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення суміш ростових субстратів. Згідно з винаходом як джерело вуглецю використовують суміш гліцерину (0,9-1,1 %, об'ємна частка) та меляси (1,9-2,1 %, масова частка).

30 Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Використання як джерела вуглецю для культивування штаму *N. vacsinii* IMB B-7405 суміші гліцерину (0,9-1,1 %, об'ємна частка) та меляси (1,9-2,1 %, масова частка) дає змогу підвищити у 2,3-2,4 рази ПАР-синтезувальну здатність (до 3,1-3,2 г ПАР/г біомаси).

35 Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *N. vacsinii* 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 та енергії використовують суміш гліцерину (1,0 %, об'ємна частка) та меляси (2,0 %, масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить суміш гліцерину

40 (0,25 %, об'ємна частка) з і меляси (0,5 %, масова частка). 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 °C упродовж 120 год.

45 Використання нового способу дає змогу підвищити у 2,3-2,4 рази ПАР-синтезувальну здатність.

Приклад 1. Синтез ПАР *N. vacsinii* IMB B-7405 на суміші гліцерину та меляси залежно від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту.

50 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 та енергії використовують суміш гліцерину (0,5 %, об'ємна частка) та меляси (1,0 %, масова частка), а також моносубстрати: гліцерин (0,92 %, об'ємна частка) і мелясу (2,2 %, масова частка). Концентрації моно- і змішаного субстратів еквімолярні за вуглецем. Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі

55 наведеного складу, що містить суміш гліцерину (0,25 %, об'ємна частка) і меляси (0,5 %, масова частка), а також гліцерин (0,5 %, об'ємна частка) чи мелясу (1,0 %, масова частка). 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 °C упродовж 120 год.

Кількість синтезованих ПАР (г/л) визначають так. Культуральну рідину центрифугують (5000 g, 20 хв.) для відділення біомаси. 25 мл супернатанту переносять у циліндричну ділильну лійку об'ємом 100 мл, додають 5 мл 1 М HCl, лійку закривають пришліфованим 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 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 IP-IM2 (Росія) при температурі 50° й абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

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.

У табл. 1 наведено дані про синтез ПАР N. vaccinii IMB B-7405 залежно від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання посівного матеріалу.

Таблиця 1

Вплив природи джерела вуглецю у середовищі
для одержання інокуляту на біосинтез ПАР N. vaccinii IMB B-7405

Джерело вуглецю у середовищі для біосинтезу, %	Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту, %	Показники синтезу ПАР	
		ПАР, г/л	E_{24} , %
Гліцерин, 0,5 + Меляса, 1,0	Гліцерин, 0,5	3,0±0,15	55±2,8
	Меляса, 1,0	2,6±0,13	59±2,9
	Гліцерин, 0,25 + Меляса 0,5	3,8±0,19	55±2,8
Гліцерин, 0,92	Гліцерин 0,5	2,3±0,12	51±2,6
Меляса, 2,2	Меляса 1,0	1,9±0,09	52±2,6

Наведені у табл. 1 дані свідчать, що за умов росту штаму IMB B-7405 на змішаному субстраті показники синтезу ПАР є вищими, ніж на відповідних моносубстратах, причому найвища концентрація ПАР досягається за використання посівного матеріалу, вирощеного на суміші гліцерину і меляси.

Приклад 2. Синтез ПАР N. vaccinii IMB B-7405 на суміші вищих концентрацій гліцерину та глюкози

Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу (див. приклад 1). Як джерело вуглецю та енергії використовують суміш гліцерину (1,0 %, об'ємна частка) та меляси (2,0 %, масова частка), а також моносубстрати: гліцерин (1,84 %, об'ємна частка) і мелясу (4,4 %, масова частка). Концентрації моно- і змішаного субстратів еквімолярні за вуглецем. Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить суміш гліцерину (0,25 %, об'ємна частка) і меляси (0,5 %, масова частка), а також гліцерин (0,5 %, об'ємна частка) чи мелясу (1,0 %, масова частка). 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 °C упродовж 120 год.

Концентрацію синтезованих ПАР та індекс емульгування визначають як описано у прикладі 1. Як видно з наведених у табл. 2 даних, і у разі підвищення у два рази концентрації гліцерину та меляси у суміші показники синтезу ПАР є вищими, ніж на відповідних моносубстратах, а найвища концентрація ПАР досягається за використання посівного матеріалу, вирощеного на суміші гліцерину і меляси.

Таблиця 2

Синтез ПАР N. *vaccinii* IMB B-7405 на суміші субстратів

Джерело вуглецю у середовищі для біосинтезу, %	Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту, %	Показники синтезу ПАР	
		ПАР, г/л	E ₂₄₁ , %
Гліцерин, 1,0 + Меляса, 2,0	Гліцерин, 0,5	2,8±0,14	54±2,7
	Меляса, 1,0	2,5±0,13	61±3,0
	Гліцерин, 0,25 % + Меляса 0,5	3,9±0,19	56±2,8
Гліцерин, 1,84	Гліцерин 0,5	1,7±0,09	51±2,6
Меляса, 4,4	Меляса 1,0	2,0±0,10	52±2,6

Приклад 3. Визначення оптимальної концентрації гліцерину та меляси у змішаному субстраті для синтезу ПАР N. *vaccinii* IMB B-7405

- 5 Як джерело вуглецю та енергії використовують суміш гліцерину (0,8-1,2 %, об'ємна частка) та меляси (1,8-2,2 %, масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить суміш гліцерину (0,25 %, об'ємна частка) і меляси (0,5 %, масова частка). Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища. Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100

10 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 28 °C упродовж 120 год.
Концентрацію синтезованих ПАР визначають як описано у прикладі 1. Показники синтезу ПАР на суміші різних концентрацій гліцерину та глюкози наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Синтез ПАР N. *vaccinii* IMB B-7405 на суміші різних концентрацій гліцерину та глюкози

Концентрація гліцерину, %	Концентрація меляси, %	ПАР, г/л
0,8	2,0	3,3±0,16
0,9	2,0	3,8±0,19
1,0	2,0	3,9±0,19
1,1	2,0	3,8±0,19
1,2	2,0	3,3±0,16
1,0	1,8	3,2±0,16
1,0	1,9	3,8±0,19
1,0	2,0	3,9±0,19
1,0	2,1	3,9±0,19
1,0	2,2	3,5±0,17

- 15 Як видно з наведених у табл. 3 даних, найвища концентрація ПАР (3,8-3,9 г/л) спостерігається за концентрації гліцерину та меляси у суміші 0,9-1,1 та 1,9-2,1 % відповідно.

Приклад 4. Порівняння показників синтезу ПАР штамами R. *erythropolis* IMB Ac-5017 і N. *vaccinii* IMB B-7405 на суміші ростових субстратів

- 20 Культивування N. *vaccinii* IMB B-7405 здійснюють на середовищі, наведеному у прикладі 1.
Як джерело вуглецю та енергії використовують суміш гліцерину (1,0 %, об'ємна частка) та меляси (2,0 %, масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить суміш гліцерину (0,25 %, об'ємна частка) і меляси (0,5 %, масова частка). Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища.

- 25 Культивування штаму IMB Ac-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO₃-1,3; MgSO₄·7H₂O-0,1; NaCl-1,0; Na₂HPO₄-0,6; KH₂PO₄-0,14; FeSO₄·7H₂O-0,001; pH 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують суміш гексадекану та гліцерину об'ємною часткою 0,60 і 0,84 % відповідно. Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 30 0,5 % гексадекану. 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 °C упродовж 120 год.

Концентрацію біомаси визначають ваговим методом, концентрацію ПАР - як описано у прикладі 1. ПАР-синтезувальну здатність визначають як відношення концентрації ПАР (г/л) до концентрації біомаси (г/л) і виражають у г ПАР /г біомаси.

Показники синтезу ПАР штамми *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 на суміші ростових субстратів наведено у табл. 4.

Таблица 4

Синтез ПАР за умов росту *N. Vaccinii*
IMB B-7405 і *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на суміші ростових субстратів

Штам	Змішаний субстрат	ПАР-синтезувальна здатність, г ПАР/г біомаси
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017 (прототип)	Гексадекан + гліцерин	1,35±0,07
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	Гліцерин + м'яса	3,2±0,15

Як видно з наведених у табл. 4 даних, культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на суміші гліцерину і м'яса дає змогу підвищити ПАР-синтезувальну здатність у 2,4 разу (до 3,2 г ПАР/ г біомаси) порівняно з прототипом.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб 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 суміш ростових субстратів, який **відрізняється** тим, що як джерело вуглецю використовують суміш гліцерину (0,9-1,1 %, об'ємна частка) та м'яса (1,9-2,1 %, масова частка).

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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