



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109074** (13) **C2**

(51) МПК

C12P 1/06 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/365 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2014 02575**

(22) Дата подання заявки: **14.03.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **10.07.2015**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **10.12.2014, Бюл.№ 23**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.07.2015, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Пирог Тетяна Павлівна (UA),
Берегова Христина Андріївна (UA),
Панасюк 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 81803 , 10.07.2013

Вплив умов культивування на синтез
поверхнево-активних речовин за умов росту
Nocardia vaccinii K-8 на гліцерині / Т. П.
Пирог, Н. А. Гриценко, Д. В. Яцук, О. О.
Боровик // Наукові праці НУХТ. – 2012. ? №
44. – С. 17?21

Интенсификация синтеза поверхностно-
активных веществ *Nocardia vaccinii* K-8 на
техническом глицерине / Т. П. Пирог, К. А.
Покора, О. Ю. Мащенко, Т. А. Шевчук //
Микробиологический журнал. - 2013. ? Т.
75, № 4. ? С. 13?22

Оптимизация синтеза поверхностно-
активных веществ *Nocardia vaccinii* K-8 при
биоконверсии отходов производства
био дизеля / Т. П. Пирог, Н. А. Гриценко, Д.
И. Хомяк, А. Д. Конон, С. И. Антонюк
// Микробиологический журнал. - 2011. - Т. 73,
№ 4. - С. 15-24

Покора Х. А. Синтез поверхнево-активних
речовин за умов вирощування *Nocardia*
vaccinii IMB B-7405 і *Acinetobacter*
calcoaceticus IMB B-7241 на відходах
виробництва / Х. А. Покора // Наукові праці
Національного університету харчових
технологій. - 2013. - № 51. - С. 8-13

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

(57) Реферат:

Винахід належить до способу одержання поверхнево-активних речовин включає культивування штаму *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин (4 %, об'ємна частка). У стаціонарній фазі росту у середовище вносять соняшникову олію у концентрації 0,07-0,09 % (об'ємна частка).

UA 109074 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.

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.]

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. 81803 UA, Штам *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 як продуцент поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Мащенко О.Ю., Покора Х.А., Гриценко Н.А. Опубл. 10.07.2013, Бюл. № 13], який включає культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на мінеральному середовищі з низьким вмістом солей (менше 2 г/л) з використанням як ростового субстрату технічного гліцерину (побічний продукт виробництва біодизелю) у концентрації 3,9-4,1 % (об'ємна частка). Недоліком цього способу є велика тривалість культивування (168 год.) і недостатньо висока концентрація синтезованих поверхнево-активних речовин (4,9 г/л).

В основу винаходу поставлено задачу створення нового способу одержання поверхнево-активних речовин, який скорочує тривалість культивування і підвищує концентрацію ПАР.

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 технічний гліцерин (4 %, об'ємна частка). Згідно винаходу у стаціонарній фазі росту у середовище вносять соняшникову олію у концентрації 0,07-0,09 % (об'ємна частка).

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Внесення 0,07-0,09 % (об'ємна частка) соняшникової олії у стаціонарній фазі росту штаму *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з 4 % (об'ємна частка) технічного гліцерину дає змогу скоротити тривалість культивування в 1,4 рази (до 120 год.) і підвищити на 20-25 % концентрацію синтезованих ПАР (до 5,9-6,1 г/л).

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); рН 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують технічний гліцерин (побічний продукт виробництва біодизелю) у концентрації 4 % (об'ємна частка). У стаціонарній фазі росту (72 год.) у середовище вносять 0,07-0,09 % соняшникової олії (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % технічного гліцерину (об'ємна 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 °С упродовж 120 год.

Використання нового способу дає змогу скоротити тривалість культивування в 1,4 рази (до 120 год.) і підвищити на 20-25 % концентрацію синтезованих ПАР (до 5,9-6,1 г/л).

Приклад 1. Синтез ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 залежно від моменту внесення соняшникової олії у середовище з технічним гліцерином

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); рН 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують технічний гліцерин (побічний продукт виробництва біодизелю) у концентрації 4 % (об'ємна частка). На початку процесу (лаг-фаза), в експоненційній (48 год.) і стаціонарній (72 год.) фазі росту у середовище вносять соняшникову олію у концентрації 0,05 і 0,10 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить як джерело вуглецю та енергії 0,5 % технічного гліцерину (об'ємна 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 °С упродовж 168 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 1М HCl, лійку 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 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.

У табл. 1 наведено дані про синтез ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 залежно від моменту внесення соняшникової олії у середовищі з технічним гліцерином. Як видно з наведених у табл. 1 даних, найвищі показники синтезу ПАР досягаються за внесення олії на початку стаціонарної фази росту.

Таблиця 1

Вплив моменту внесення соняшникової олії у середовище з технічним гліцерином на синтез ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405

Концентрація олії, % (об'ємна частка)	Момент внесення олії (фаза росту)	ПАР, г/л
0	(без олії, прототип)	4,9±0,24
0,05	Лаг-фаза	5,0±0,25
	Експоненційна	5,1±0,25
	Стаціонарна	5,5±0,27
0,10	Лаг-фаза	5,0±0,25
	Експоненційна	5,2±0,26
	Стаціонарна	5,6±0,28

Приклад 2. Залежність синтезу ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з технічним гліцерином від концентрації соняшникової олії

Культивування бактерій здійснюють в умовах, описаних у прикладі 1. На початку стаціонарної фази росту (72 год.) у середовище вносять 0,03-0,10 % (об'ємна частка) соняшникової олії. Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28 °C упродовж 168 год.

Концентрацію синтезованих ПАР визначають як описано у прикладі 1. 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 соняшкову олію.

Показники синтезу ПАР залежно від концентрації соняшникової олії наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Вплив концентрації соняшникової олії на біосинтез ПАР за умов росту *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з технічним гліцерином

Концентрація олії (% , об'ємна частка)	ПАР, г/л	E_{24} , %
0,03	5,3±0,30	59±2,9
0,04	5,4±0,30	59±2,9
0,05	5,5±0,27	60±3,0
0,06	5,6±0,28	60±3,0
0,07	5,9±0,29	65±3,2
0,08	6,1±0,30	65±3,2
0,09	6,0±0,30	65±3,2
0,10	5,6±0,28	60±3,0

Отже, за внесення 0,07-0,09 % соняшникової олії у середовище з 4 % технічного гліцерину концентрація синтезованих ПАР досягає 5,9-6,1 г/л.

Приклад 3. Вплив тривалості культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на синтез ПАР

5 Культивування бактерій здійснюють в умовах, описаних у прикладі 1. На початку стаціонарної фази росту (72 год.) у середовище вносять 0,07-0,09 % (об'ємна частка) соняшникової олії. Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 28 °С упродовж 120 і 168 год.

Кількість синтезованих ПАР (г/л) визначають як описано у прикладі 1.

10 Як видно з наведених у табл. 3 даних, у разі культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 згідно запропонованого способу концентрація синтезованих ПАР становить 5,9-6,1 г/л на 120 год. культивування.

Таблиця 3

Синтез ПАР залежно від тривалості культивування *N. vaccinii* IMB B-7405

Концентрація олії, (% об'ємна частка)	Тривалість культивування, год.	ПАР, г/л
Без олії (прототип)	120	4,0±0,20
	168	4,9±0,24
0,07	120	5,9±0,29
	168	5,9±0,29
0,08	120	6,1±0,30
	168	6,1±0,30
0,09	120	6,0±0,30
	168	6,0±0,30

15 Отже, внесення 0,07-0,09 % олії у стаціонарній фазі росту *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з 4 % (об'ємна частка) технічного гліцерину дає змогу скоротити тривалість культивування в 1,4 рази (до 120 год.) і підвищити на 20-25 % концентрацію синтезованих ПАР (до 5,9-6,1 г/л).

20 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 технічний гліцерин (4 %, об'ємна частка), який **відрізняється** тим, що у стаціонарній фазі росту у середовище вносять соняшкову олію у концентрації 0,07-0,09 % (об'ємна частка).

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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