



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 110260

(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 ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2014 02869

(22) Дата подання заявки: 21.03.2014

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.12.2015

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

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.12.2015, Бюл.№ 23

(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 81803 U, 10.07.2013
UA 81804 U, 10.07.2013
Кудря, Н. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на суміші ростових субстратів / Н. Кудря, Т. Пирог // *Ukrainian Food Journal*. ? 2013. – Vol. 2. Is. 2. – С. 203?209
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
Пирог Т.П., Покора К.А., Мащенко О.Ю., Шевчук Т.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* K-8 на техническом глицерине // Микробиол. журн. – 2013. – 75, № 1. – С. 13-22
Мащенко О.Ю. Шляхи метаболізму гліцерину у продуцентів поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та *Nocardia vaccinii* K-8 / О.Ю. Мащенко, М.О. Шулякова // *Ukrainian Food Journal*. ? 2012. – Vol. 1. Is. 2. – С. 17-21
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 НУХТ. - 2013. - № 51. - С. 8-13

UA 110260 C2

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

(57) Реферат:

Винахід належить до способу одержання поверхнево-активних речовин, який включає культивування штаму *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело вуглецевого живлення містить технічний гліцерин у концентрації 4 % (об'ємна частка), а як попередник біосинтезу – глюкозу. Концентрація глюкози у рідкому середовищі становить 0,06-0,08 % (масова частка).

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 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. 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, як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин (4 %, об'ємна частка), а як попередник біосинтезу - глюкозу. Згідно з винаходом концентрація глюкози становить 0,06-0,08 %.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Внесення 0,06-0,08 % глюкози у середовище культивування штаму *N. vaccinii* IMB B-7405 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), а як попередник біосинтезу ПАР - 0,06-0,08 % глюкози (масова 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 °C 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 концентрації глюкози у середовищі 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). Як попередник біосинтезу ПАР у середовище вносять глюкозу у концентрації 0,03-0,10 % (масова 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 °C упродовж 168 год.

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. Перед вимірюванням цього показника культуральну рідину звільняють від залишкового субстрату обробкою бензином.

5 Кількість синтезованих ПАР (г/л) визначають 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 1 М НСІ, воронку закривають пришлифованим корком і струшують упродовж 3 хв., далі додають ще 4 мл 1 М НСІ й 16 мл суміші хлороформу й метанолу (2:1) й струшують упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишають у
10 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 НСІ 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
15 описано вище, при цьому одержують органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 об'єднують і упарюють на ротаторному випарнику ІР-ІМ2 (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
20 хв. Вимірювання індексу емульгування (Е24) 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 концентрації глюкози у середовищі з технічним гліцерином. Як видно з наведених у табл. 1 даних, найвищі
25 показники синтезу ПАР досягаються за концентрації глюкози у середовищі культивування 0,06-0,08 %.

Таблиця 1

Вплив концентрації глюкози у середовищі з
технічним гліцерином на синтез ПАР N. vaccinii IMB B-7405

Концентрація глюкози, % (масова частка)	ПАР*	ПАР, г/л	Е ₂₄ , %
0,03	7,1±0,30	5,0±0,25	58±2,9
0,04	7,2±0,36	5,1±0,25	58±2,9
0,05	7,2±0,36	5,2±0,26	59±2,9
0,06	7,5±0,37	5,9±0,29	65±3,2
0,07	7,6±0,38	6,0±0,30	65±3,2
0,08	7,5±0,37	6,1±0,30	65±3,2
0,09	7,0±0,35	5,2±0,26	60±3,0
0,10	6,0±0,30	5,2±0,26	60±3,0

30 Приклад 2. Залежність синтезу ПАР N. vaccinii IMB B-7405 на середовищі з технічним гліцерином і глюкозою від тривалості культивування

Культивування бактерій здійснюють в умовах, описаних у прикладі 1. У середовище вносять 0,07 % (масова частка) глюкози. Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 28 °С упродовж 100-168 год.

35 Концентрацію синтезованих ПАР та індекс емульгування культуральної рідини визначають, як описано у прикладі 1. Показники синтезу ПАР залежно від тривалості культивування штаму IMB B-7405 наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Вплив тривалості культивування на біосинтез ПАР за умов росту *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з технічним гліцерином і глюкозою

Тривалість культивування, год.	ПАР, г/л	E ₂₄ , %
100	5,3±0,30	59±2,9
115	5,4±0,30	59±2,9
120	6,0±0,30	65±3,2
125	6,0±0,30	65±3,2
130	6,0±0,30	65±3,2
168	6,0±0,30	65±3,2

Отже, внесення 0,07 % глюкози у середовище з 4 % технічного гліцерину дає змогу одержати 6,0 г/л ПАР на 120 год. культивування штаму IMB B-7405.

5 Приклад 3. Порівняння показників синтезу ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 згідно з прототипом і запропонованим способом

Культивування бактерій здійснюють в умовах, описаних у прикладі 1. В одному з варіантів у середовище вносять 0,07 % (масова частка) глюкози. Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 28 °C упродовж 120-168 год.

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

Як видно з наведених у табл. 3 даних, у разі культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 згідно з запропонованим способом концентрація синтезованих ПАР є вищою, а тривалість культивування нижчою, порівняно з прототипом.

15

Таблиця 3

Синтез ПАР в різних умовах культивування *N. vaccinii* IMB B-7405

Умови культивування	Тривалість культивування, год.	ПАР, г/л
Згідно з прототипом	120	4,0±0,20
	168	4,9±0,24
Згідно з запропонованим способом	120	6,0±0,30
	168	6,0±0,30

Отже, внесення 0,06-0,08 % глюкози у середовище культивування штаму *N. vaccinii* IMB B-7405 з 4 % (об'ємна частка) технічного гліцерину дає змогу скоротити тривалість культивування в 1,4 разу (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, як джерело вуглецевого живлення містить технічний гліцерин у концентрації 4 % (об'ємна частка), а як попередник біосинтезу - глюкозу, який **відрізняється** тим, що концентрація глюкози становить 0,06-0,08 % (масова частка).

25

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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