



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **94548**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 02871**

(22) Дата подання заявки: **21.03.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.11.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.11.2014, Бюл.№ 22**

(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)**

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

(57) Реферат:

Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування штаму *Nocardia vacsinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі містить мінеральні солі, як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин, а як попередник біосинтезу – глюкозу. Концентрація глюкози становить 0,06-0,08 %.

UA 94548 U

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

Відомий спосіб одержання ПАР за допомогою штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 [Патент UA №10467, 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 аналогом є спосіб одержання ПАР за допомогою *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 [Патент UA № 81803, 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 корисної моделі 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 корисною моделлю 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 °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 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 °С 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 ділительну воронку об'ємом 100 мл, додають 5 мл 1 М ПСІ, воронку закривають пришліфованим корком і струшують упродовж 3 хв, далі додають ще 4 мл 1М НСІ й 16 мл суміші хлороформу й метанолу (2:1) й струшують упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишають у 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 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.

- 20 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.

- 25 У табл. 1 наведено дані про синтез ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 залежно від концентрації глюкози у середовищі з технічним гліцерином. Як видно з наведених у табл. 1 даних, найвищі 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* ІМВ В-7405

Концентрація глюкози, % (масова частка)	ПАР*	ПАР, г/л	E_{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* ІМВ В-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 ІМВ В-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 прототипу і запропонованого способу

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 запропонованого способу 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 прототипу	120	4,0±0,20
	168	4,9±0,24
Згідно запропонованого способу	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 рази (до 120 год.) і підвищити на 20-25 % концентрацію синтезованих ПАР (до 5,9-6,1 г/л)

20

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

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 технічний гліцерин (4 %, об'ємна частка), а як попередник біосинтезу - глюкозу, який відрізняється тим, що концентрація глюкози становить 0,06-0,08 %.

25

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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