



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109073** (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 02573****(22)** Дата подання заявки: **14.03.2014****(24)** Дата, з якої є чинними
права на винахід: **10.07.2015****(41)** Публікація відомостей
про заявку: **25.12.2014, Бюл.№ 24****(46)** Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.07.2015, Бюл.№ 13****(72)** Винахідник(и):**Пирог Тетяна Павлівна (UA),
Конон Анастасія Дмитрівна (UA),
Антонюк Світлана Ігорівна (UA),
Антонюк Ніна Олександрівна (UA)****(73)** Власник(и):**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,
вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601 (UA)****(56)** Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* K-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля / Т. П. Пирог, Н. А. Гриценко, Д. И. Хомяк, А. Д. Конон, С. И. Антонюк // Микробиологічний журнал. - 2011. - Т. 73, № 4. - С. 15-24Покора Х. А. Синтез поверхнево-активних речовин за умов вирощування *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 і *Acinetobacter calcoa ceticus* IMB B-7241 на відходах виробництва / Х. А. Покора // Наукові праці Національного університету харчових технологій. - 2013. - № 51. - С. 8-13
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. 17-21Интенсификация 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**(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, як джерело азоту нітрат натрію і як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин. Концентрація нітрату натрію становить 1,1-1,3 г/л, а посівного матеріалу - 15-20 % від об'єму середовища.

UA 109073 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 у концентрації 3,9-4,1 % (об'ємна частка).

Недоліком цього способу є недостатньо висока концентрація синтезованих поверхнево-активних речовин (4,9 г/л), а також недостатньо висока концентрація технічного гліцерину у середовищі, який є відходом виробництва біодизелю.

Враховуючи об'єми виробництва біодизелю у світі - понад 11 млн. т у 2008 році з щорічним наступним збільшенням на 8-10 % [Appl. Biochem. Biotechnol. 2012. 166, N 3. P. 680-699], а також кількість утворюваного як побічного продукту технічного гліцерину - 10 % від одержуваного біодизелю [Appl. Biochem. Biotechnol. 2013. - 169, N 1. - P. 110-122], стає зрозумілим, що для ефективного використання такого відходу як субстрату у біотехнологічних процесах його вміст у середовищі культивування продуцентів практично важливих метаболітів повинен бути якомога вищим.

В основу винаходу поставлено задачу створення нового способу одержання поверхнево-активних речовин, який підвищує концентрацію синтезованих ПАР і вміст технічного гліцерину у середовищі культивування.

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 азоту нітрат натрію і як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин. Згідно з винаходом концентрація нітрату натрію становить 1,1-1,3 г/л, а посівного матеріалу - 15-20 % від об'єму середовища.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Підвищення у середовищі культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 концентрації нітрату натрію до 1,1-1,3 г/л, а посівного матеріалу до 15-20 % від об'єму середовища дає змогу підвищити на 20-25 % концентрацію синтезованих ПАР (до 5,9-6,1 г/л) і вміст технічного гліцерину до 6-8 % (об'ємна частка).

Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 -1,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -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 технічний гліцерин (побічний продукт виробництва біодизелю) у концентрації 7 % (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 - 15 % 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.

Використання нового способу дає змогу підвищити на 20-25 % концентрацію синтезованих ПАР (до 5,9-6,1 г/л) і вміст технічного гліцерину у середовищі до 6-8 % (об'ємна частка).

Приклад 1. Синтез ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з технічним гліцеином залежно від концентрації інокуляту

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 технічний гліцерин у концентрації 5 і 6 % (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 - 5-25 % 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.

- 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 ліжку об'ємом 100 мл, додають 5 мл 1 М HCl, ліжку 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
- 10 фаз, після чого нижню фракцію збирають (органічний екстракт 1), а водну фазу ще раз екстрагують. При повторній екстракції у водну фазу додають 9 мл 1 М 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) и проводять екстракцію як описано
- 15 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.

- 20 У табл. 1 наведено дані про синтез ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 залежно від концентрації посівного матеріалу. Як видно з наведених у табл. 1 даних, підвищення концентрації інокуляту до 15-20 % у середовищі з 5 і 6 % технічного гліцерину супроводжується збільшенням концентрації синтезованих ПАР на 20-30 % порівняно з використанням 5 % посівного матеріалу.

Таблиця 1

Вплив концентрації інокуляту на синтез ПАР за умов росту *N. vaccinii*
IMB B-7405 на технічному гліцерині

Концентрація гліцерину, %	Концентрація інокуляту, %	ПАР (г/л), % від контролю
5	10	115
	15	130
	20	130
	25	120
6	10	110
	15	120
	20	120
	25	115

Примітка. Контроль (100 %) - концентрація ПАР за використання 5 % посівного матеріалу.

- 25 Приклад 2. Залежність синтезу ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з технічним гліцерином від концентрації джерела азотного живлення

- 30 Культивування бактерій здійснюють в умовах, описаних у прикладі 1. Концентрація нітрату натрію у середовищі становить 0,5-1,5 г/л, посівного матеріалу - 5 %. Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 28 °С упродовж 168 год. Концентрацію синтезованих ПАР визначають як описано у прикладі 1. Показники синтезу ПАР залежно від концентрації джерела азоту наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Вплив концентрації нітрату натрію на синтез ПАР за умов росту *N. vaccinii*
IMB B-7405 на середовищі з технічним гліцерином

Концентрація гліцерину, %	Концентрація нітрату натрію, г/л	ПАР (г/л), % від контролю
5	0,75	130
	1,0	135
	1,1	140
	1,2	145
	1,3	140
	1,4	130

Продовження таблиці 2

Вплив концентрації нітрату натрію на синтез ПАР за умов росту *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з технічним гліцерином

Концентрація гліцерину, %	Концентрація нітрату натрію, г/л	ПАР (г/л), % від контролю
6	0,75	135
	1,0	140
	1,1	145
	1,2	150
	1,3	145
	1,4	135

Примітка. Контроль (100 %) - концентрація ПАР на середовищі з 0,5 г/л нітрату натрію.

Отже, підвищення концентрації джерела азотного живлення до 1,1-1,3 г/л у середовищі з 5 і 6 % технічного гліцерину супроводжується збільшенням концентрації синтезованих ПАР на 40-50 % порівняно з показниками на базовому середовищі з 0,5 г/л нітрату натрію.

Приклад 3. Вплив концентрації джерела азотного живлення та інокуляту на синтез ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405

Культивування бактерій здійснюють в умовах, описаних у прикладі 1. Концентрація технічного гліцерину у середовищі становить 6-9 %, нітрату натрію - 0,5 і 1,2 г/л, посівного матеріалу - 15 %. Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 28 °C упродовж 168 год.

Кількість синтезованих ПАР (г/л) визначають як описано у прикладі 1. Як видно з наведених у табл. 3 даних, у разі підвищення концентрації посівного матеріалу до 15 % і вмісту нітрату натрію до 1,2 г/л концентрація синтезованих ПАР досягає 5,9-6,1 г/л на середовищі з 6-8 % технічного гліцерину.

Таблиця 3

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

Концентрація гліцерину (% об'ємна частка)	Концентрація нітрату натрію, г/л	ПАР, г/л
6	0,5	3,0±0,15
	1,2	5,9±0,29
7	0,5	2,9±0,14
	1,2	6,1±0,30
8	0,5	2,0±0,10
	1,2	6,0±0,30
9	0,5	1,1±0,05
	1,2	3,0±0,15

Підвищення у середовищі культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 концентрації нітрату натрію до 1,1-1,3 г/л, а посівного матеріалу до 15-20 % від об'єму середовища дає змогу підвищити на 20-25 % концентрацію синтезованих ПАР (до 5,9-6,1 г/л) і вміст технічного гліцерину до 6-8 % (об'ємна частка).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування штаму *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело азоту нітрат натрію і як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин, який **відрізняється** тим, що концентрація нітрату натрію становить 1,1-1,3 г/л, а посівного матеріалу - 15-20 % від об'єму середовища.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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