



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **93174**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 02574**

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

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.09.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.09.2014, Бюл.№ 18**

(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)**

(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, 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 93174 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 [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., Машенко 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 корисної моделі 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 корисною моделлю, 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 гліцеринном 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 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
- 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) й 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.

- 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
- 20 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

- 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.
- 30 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
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 КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування штаму *Nocardia vassinii* 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. Литвиненко

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