



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **101393**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 02432**

(22) Дата подання заявки: **18.03.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.09.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.09.2015, Бюл.№ 17**

(72) Винахідник(и):

**Пирог Тетяна Павлівна (UA),
Берегова Христина Андріївна (UA),
Никитюк Лілія Вікторівна (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 включає культивування штаму *Nocardia vacsinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі. Середовище містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення - суміш ростових субстратів. Як джерело вуглецю використовують суміш глюкози масовою часткою 0,49-0,51 % і гліцерину об'ємною часткою 0,49-0,51 % у молярному співвідношенні 1:2,5 відповідно.

UA 101393 U

Корисна модель належить до галузі біотехнологій 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.

Відомим аналогом є 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.]

Недоліком аналога 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.

Найближчим аналогом до корисної моделі є спосіб одержання ПАР за допомогою *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 [Пат. 94583 UA, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Берегова Х.А. Кудря Н.В. Опубл. 25.11.2014, Бюл. № 22], який включає культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення - суміш ростових субстратів. Для підвищення концентрації синтезованих ПАР як джерело вуглецю та енергії використовують суміш технічного гліцерину (відхід виробництва біодизелю) об'ємною часткою 4,9-5,1 % та меляси масовою часткою 0,9-1,1 %.

Недоліком найближчого аналога є недостатньо висока ПАР-синтезувальна здатність (г ПАР/г біомаси).

В основу корисної моделі поставлена задача створення нового способу одержання поверхнево-активних речовин, який підвищує ПАР-синтезувальну здатність.

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 - суміш ростових субстратів, згідно з корисною моделлю, як джерело вуглецю та енергії використовують суміш глюкози масовою часткою 0,49-0,51 % і гліцерину об'ємною часткою 0,49-0,51 % у молярному співвідношенні 1:2,5 відповідно.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Використання як джерела вуглецю для культивування штаму *N. vaccinii* IMB B-7405 суміші глюкози масовою часткою 0,49-0,51 % і гліцерину об'ємною часткою 0,49-0,51 % у молярному співвідношенні 1:2,5 відповідно дає змогу підвищити в 1,3-1,4 рази ПАР-синтезувальну здатність (до 3,5-3,6 г ПАР/г біомаси).

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 суміш гліцерину (0,5 %, об'ємна частка) та глюкози (0,5 %, масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить суміш гліцерину (0,25 %, об'ємна частка) і глюкози (0,25 %, масова 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 підвищити в 1,3-1,4 рази ПАР-синтезувальну здатність.

Приклад 1

Теоретичний розрахунок оптимального молярного співвідношення глюкози та гліцерину у середовищі культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 Для встановлення співвідношення концентрацій глюкози і гліцерину в середовищі культивування штаму IMB B-7405 необхідно було:

1) розрахувати енергетичні потреби синтезу біомаси і поверхнево-активних речовин (трегалозомі-колатів) на енергетично дефіцитному субстраті (гліцерині);

2) визначити концентрацію енергетично-надлишкового субстрату (глюкози), яка б компенсувала втрати вуглецю гліцерину при його окисненні до CO_2 з метою отримання енергії для конструктивного метаболізму.

При розрахунку оптимального співвідношення концентрацій гліцерину і глюкози нами було прийнято такі припущення:

1) глюкоза використовується переважно як джерело енергії, а на синтез біомаси і трегалозоміколатів витрачається вуглець гліцерину;

2) катаболізм глюкози здійснюється у пентозофосфатному циклі;

3) перетворення гліцерину відбувається через дигідроксиацетонфосфат за участю піролохінолінхінон- та нітросо-М, ІС-диметиланілін-залежних алкогольдегідрогеназ та дигідроксиацетонкінази; 3) міколовою кислотою у складі трегалозоміколату є 3-гідрокси-2-додеканоїлдокозанова кислота, яка містить 34 атоми вуглецю;

5 4) співвідношення Р/О дорівнює 2.

Витрати енергії на синтез трегалозофосфату. Для синтезу однієї молекули трегалозофосфату необхідно вісім молей гліцерину (4 молі для утворення гліюксилату + 4 молі для синтезу ацетил-КоА, який приєднується до гліюксилату з утворенням малату). Таким чином, вісім молей АТФ витрачається на утворення дигідроксиацетонфосфату з гліцерину, вісім - на утворення ФЕП з пірувату, чотири молі - на синтез 1,3-дифосфогліцерату з фосфогліцеринової кислоти (ФГК) та вісім молей (4 НАДН) - при перетворенні 1,3-дифосфогліцерату у триозофосфат. Отже, витрати енергії становлять 28 молей АТФ. Крім того, один моль АТФ використовується при утворенні нуклеозиддифосфатсахариду (глюкозо-6-фосфат → УДФ-глюкоза), необхідного для синтезу трегалозо-6-фосфату. Таким чином, енергетичні потреби на синтез трегалозо-6-фосфату з гліцерину становлять 30 молей АТФ.

Витрати енергії на синтез міколових кислот. Синтез жирних кислот відбувається таким чином: з ацетил-КоА і CO_2 шляхом АТФ-залежної реакції утворюється малоніл-КоА, а далі в результаті трьох послідовних реакцій синтезується бутирил-КоА. Утворений бутирил-КоА взаємодіє з наступною молекулою малоніл-КоА до утворення $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{CO} - \text{SKoA}$. У наступному циклі утворюється $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_6 - \text{CO} - \text{SKoA}$. Таким чином, у результаті послідовного нарощування ацетил-КоА на двовуглецевий фрагмент синтезуються вищі жирні кислоти у вигляді відповідних ацил-КоА. Відповідно, для синтезу 3-гідрокси-2-додеканоїлдокозанової кислоти, яка містить 34 атоми вуглецю, необхідно 16 таких циклів. Оскільки в одному циклі витрачається 1 моль АТФ і для утворення міколової кислоти необхідно 17 молей ацетил-КоА, на синтез яких з гліцерину витратиться 17 молей АТФ, енергетичні витрати для синтезу одного моля міколової кислоти становитимуть $16+17=33$ моля АТФ.

Генерація АТФ при синтезі трегалозоміколатів з гліцерину. Енергія генерується при утворенні ацетил-КоА (попередника жирних кислот та гліюксилату). Сумарну реакцію утворення ацетил-КоА з гліцерину можна подати у вигляді такого рівняння:

30 Гліцерин → Ацетил-КоА + АТФ + 2НАДН (1)

Оскільки нам необхідно 17 молей ацетил-КоА для синтезу міколової кислоти та 8 молей - для синтезу трегалозофосфату, рівняння (4.1) можна записати так:

25Гліцерин → 25Ацетил-КоА + 25АТФ + 50НАДН (2)

35 Враховуючи припущення, що Р/О=2, під час утворення одного моля трегалозоміколату генерація енергії становить 125 молей АТФ.

Розрахункові дані щодо витрати та генерації енергії в процесі синтезу трегалозоміколату з гліцерину можна представити у вигляді табл. 1.

Таблиця 1

Витрати та генерація енергії при синтезі трегалозоміколатів N. vaccinii IMB B-7405 з гліцерину

Витрата гліцерину, моль	Затрати енергії, моль АТФ		Генерація енергії, моль АТФ	
	На синтез ПАР	На моль використаного гліцерину	При синтезі ПАР	На моль використаного гліцерину
25	63	2,52	125	5

40 Отже, генерація енергії при синтезі трегалозоміколату з гліцерину становить $5-2,52=2,48$ моль АТФ/моль використаного гліцерину.

Енергетичні витрати при синтезі біомаси. Синтез біомаси з ФГК - ключового інтермедіата синтезу всіх клітинних компонентів - можна записати у вигляді рівняння (3):

4ФГК + NH_3 + 29АТФ + 5,5НАД(Ф)Н → $(\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N})_3$ (3),

45 де $(\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N})_3$ - формула моля біомаси.

Сумарні реакції перетворення гліцерину та глюкози в ФГК виражають таким чином:

Гліцерин → ФГК + НАД(Ф)Н (4)

Глюкоза → ФГК + 7НАД(Ф)Н + 3 CO_2 (5)

Для Р/О = 2 рівняння (4.4) і (4.5) набувають вигляду:

50 Гліцерин → ФГК + 2АТФ (6)

Глюкоза → ФГК + 14АТФ. (7)

Розрахунок "доповнюючої" концентрації глюкози. Виходячи з рівняння синтезу біомаси з ФГК (рівняння (3)) та рівняння катаболізму гліцерину до ФГК (рівняння (6)), можна порахувати, що потреба в АТФ для синтезу біомаси (в розрахунку на моль гліцерину) становить 8 молей АТФ. Ми вважаємо, що ця енергія може бути отримана з глюкози.

Враховуючи, що у процесі синтезу трегалозоміколатів з гліцерину генерується 2,5 моля АТФ на моль використаного енергетично дефіцитного субстрату, за рахунок глюкози повинно бути отримано $8 - 2,48 = 5,52$ молей АТФ. З рівняння (7) виходить, що для отримання такої кількості енергії потрібно 0,394 молей глюкози. Таким чином, молярне співвідношення глюкози і гліцерину в середовищі повинно бути 0,394:1, або 1:2,5.

Приклад 2

Синтез ПАР залежно від молярного співвідношення концентрацій глюкози і гліцерину у середовищі культивування *N. vaccinii* IMB B-7405

Культивування штаму IMB B-7405 здійснюють у 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 суміш глюкози масовою часткою 0,5 % і гліцерину об'ємною часткою 0,2; 0,4; 0,5; 0,6 і 0,8 % у молярному співвідношенні 1:1; 1:2; 1:2,5; 1:3 и 1:4 відповідно.

Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить суміш гліцерину (0,25 %, об'ємна частка) і глюкози (0,25 %, масова 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.

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, воронку 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 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 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 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.

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.

У табл. 2 наведено дані про синтез ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 залежно від молярного співвідношення глюкози і гліцерину у суміші.

Таблиця 2

Вплив молярного співвідношення глюкози і меляси у змішаному субстраті на синтез ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405

Молярне співвідношення глюкози і гліцерину	ПАР, г/л	E_{24} , %
1:1	2,2±0,11	50±2,5
1:2	2,4±0,12	51±2,5
1:2,5	3,0±0,15	55±2,8
1:3	2,5±0,12	52±2,6
1:4	2,1±0,11	52±2,6

Наведені у табл. 2 дані свідчать, що показники синтезу ПАР є найвищими за умов росту штаму IMB B-7405 на суміші глюкози і гліцерину у молярному співвідношенні 1:2,5.

Приклад 3. Вплив концентрації глюкози і гліцерину у суміші на синтез ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405

Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу (див. приклад 1). Як джерело вуглецю та енергії використовують суміш глюкози масовою часткою 0,47-0,53 % та гліцерину об'ємною часткою 0,47-0,53 %. Молярне співвідношення глюкози і гліцерину у всіх варіантах становить 1:2,5. Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази

5

росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить суміш гліцерину (0,25 %, об'ємна частка) і глюкози (0,25 %, масова 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.

10

Концентрацію синтезованих ПАР визначають як описано у прикладі 1. Біомасу визначають ваговим методом. ПАР-синтезувальну здатність визначають як відношення концентрації ПАР (г/л) до концентрації біомаси (г/л) і виражають у г ПАР /г біомаси.

Як видно з наведених у табл. 3 даних, за концентрації глюкози масовою часткою 0,49-0,51 % та гліцерину об'ємною часткою 0,49-0,51 % ПАР-синтезувальна здатність є найвищою.

15

Таблиця 3

Синтез ПАР N. vaccinii IMB B-7405 залежно від концентрації глюкози і гліцерину у змішаному субстраті

Концентрація глюкози, % (масова частка)	Концентрація гліцерину, % (об'ємна частка)	г ПАР/ г біомаси
0,47	0,47	3,2±0,16
0,48	0,48	3,3±0,16
0,49	0,49	3,5±0,17
0,50	0,50	3,6±0,18
0,51	0,51	3,5±0,17
0,52	0,52	3,3±0,16
0,53	0,53	3,2±0,16

Приклад 4. Порівняння показників синтезу ПАР N. vaccinii IMB B-7405 на різних змішаних субстратах

Культивування N. vaccinii IMB B-7405 здійснюють на середовищі, наведеному у прикладі 1. Як джерело вуглецю та енергії використовують суміш гліцерину (0,5 %, об'ємна частка) та глюкози (0,5 %, масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить суміш гліцерину (0,25 %, об'ємна частка) і глюкози (0,25 %, масова частка). Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища.

20

Як джерело вуглецю та енергії використовують також суміш технічного гліцерину (5,0 %, об'ємна частка) та м'яси (1,0 %, масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить суміш технічного гліцерину (0,5 %, об'ємна частка) і м'яси (0,5 %, масова частка). Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища.

25

Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об./хв.) при 28 °С упродовж 120 год.

30

ПАР-синтезувальну здатність визначають як описано у прикладі 3, індекс емульгування у прикладі 2.

Показники синтезу ПАР N. vaccinii IMB B-7405 на суміші ростових субстратів наведено у табл. 4.

35

Таблиця 4

Синтез ПАР за умов росту N. vaccinii IMB B-7405 на змішаних субстратах

Змішаний субстрат	E ₂₄ , %	г ПАР/ г біомаси
Технічний гліцерин + м'яси (прототип)	62±3,1	2,6±0,13
Глюкоза + Гліцерин	55±2,8	3,6±0,18

Як видно з наведених у табл. 4 даних, культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на суміші глюкози масовою часткою 0,5 % та гліцерину об'ємною часткою 0,5 % дає змогу підвищити ПАР-синтезувальну здатність в 1,4 разу порівняно з найближчим аналогом.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування штаму *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, яке містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення - суміш ростових субстратів, який **відрізняється** тим, що як джерело вуглецю використовують суміш глюкози масовою часткою 0,49-0,51 % і гліцерину об'ємною часткою 0,49-0,51 % у молярному співвідношенні 1:2,5 відповідно.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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