



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **134824** (13) **U**
(51) МПК (2019.01)
A23C 9/12 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)
B82Y 30/00

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

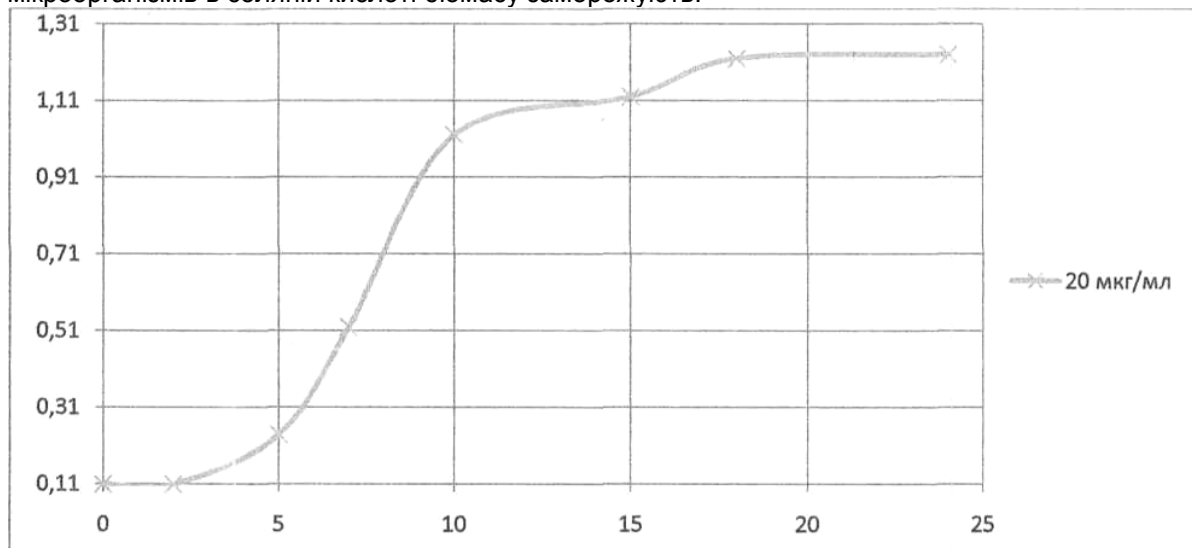
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2018 11931	(72) Винахідник(и): Зикова Наталія Сергіївна (UA), Капельянец Леонід Вікторович (UA), Бурдо Олег Григорович (UA), Зиков Олександр Вікторович (UA)
(22) Дата подання заявки: 03.12.2018	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.06.2019	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2019, Бюл.№ 11	(73) Власник(и): ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ НАНОСТРУКТУР СЕЛЕНУ

(57) Реферат:

Спосіб одержання наноструктур селену передбачає приготування та стерилізацію середовища культивування для мікроорганізмів, охолодження його до температури культивування, внесення в середовище культивування неорганічної форми селену, внесення в середовище культивування чистої культури лактобактерій, культивування мікроорганізмів, відокремлення біомаси від культуральної рідини, руйнування бактеріальних клітин за участі концентрованої соляної кислоти, відокремлення біомаси мікроорганізмів від кислоти з подальшою промивкою дистильованою водою, руйнування стінок бактеріальних клітин в мікрохвильовому полі, видалення залишків бактеріальних стінок вакуум-фільтрацією, причому як живильне середовище використовують середовище на основі сирної сироватки, а як джерело селену використовують селеніт натрію в кількості 15-20 мкг/см³, при цьому після витримки біомаси мікроорганізмів в соляній кислоті біомасу заморожують.



Фиг. 2

UA 134824 U

Корисна модель належить до біотехнології, мікробіології і призначена для отримання наноструктур селену, одержаних в процесі культивування лактобактерій на селеновмісному середовищі, в результаті його біотрансформації мікроорганізмами. Суть способу полягає у "дезорганізації" нормально функціонуючих систем клітини з метою відокремлення наноструктур селену, що містяться в цитоплазмі бактеріальної клітини.

Найближчим аналогом до корисної моделі, що заявляється, є спосіб одержання наноструктур селену синтезованих пробіотичними молочнокислими бактеріями (EazenyiP., Sztrik. A., BabkaB., ProkischJ. Elemental, Nano-Sized (100-500 nm) Selenium Production by Probiotic Lactic Acid Bacteria. // J. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics.-2011. -Vol. 1. - P. 56-64). Спосіб включає приготування середовища культивування для лактобактерій бульйону MRS (MRS broth ace. to De Man, Rogosa and Sharpe for microbiology); стерилізацію протягом 30 хвилин, при 120 °C; охолодження його до температури культивування (37-39 °C); внесення джерела селену-гідроселеніту натрію (NaHSeO_3) до середовища культивування в концентрації 20 мкг/см^3 ; внесення інокуляту культури *Lactobacillus acidophilus*; культивування протягом 36-48 годин, при 37 °C; центрифугування суспензії мікроорганізмів для відокремлення селеновмісної біомаси мікроорганізмів, при 6 000 об./хв. протягом 10-15 хвилин; руйнування бактеріальних клітин за участі концентрованої соляної кислоти (1,5:1), протягом 5 діб; центрифугування при 6 000 об./хв. протягом 10-15 хвилин та промивання дистильованою водою для видалення залишків кислоти; обробку ультразвуком протягом 10-15 хвилин; вакуум-фільтрацію для видалення залишків бактеріальних стінок.

Даний спосіб вибрано як найближчий аналог. Найближчий аналог і корисна модель, що заявляється, мають наступні спільні ознаки:

- приготування та стерилізація середовища культивування для мікроорганізмів;
- охолодження його до температури культивування;
- внесення в середовище культивування неорганічної форми селену;
- внесення в середовище культивування чистої культури лактобактерій;
- культивування мікроорганізмів;
- відокремлення біомаси від культуральної рідини;
- руйнування бактеріальних клітин за участі концентрованої соляної кислоти;
- відокремлення біомаси мікроорганізмів від кислоти з подальшою промивкою дистильованою водою;
- руйнування стінок бактеріальних клітин в мікрохвильовому полі;
- видалення залишків бактеріальних стінок вакуум-фільтрацією.

Але найближчий аналог має недоліки. Зокрема, для культивування лактобактерій, як середовище культивування було вибрано MRS середовище, однак використання цього середовища є економічно не вигідним. Окрім того, витримку в соляній кислоті проводили протягом 5 діб.

Згідно з корисною моделлю, поставлено задачу розробити покращений спосіб одержання наноструктур селену, в якому шляхом заміни середовища культивування і джерела селену, а також зміни порядку використання операції заморожування, забезпечується більш швидке отримання наноструктур селену.

Поставлена задача вирішена в способі одержання наноструктур селену в процесі біотрансформації лактобактеріями його неорганічної форми із середовища культивування для мікроорганізмів, охолодження його до температури культивування, внесення в середовище культивування неорганічної форми селену, внесення в середовище культивування чистої культури лактобактерій, культивування мікроорганізмів, відокремлення біомаси від культуральної рідини, руйнування бактеріальних клітин за участі концентрованої соляної кислоти, відокремлення біомаси мікроорганізмів від кислоти з подальшою промивкою дистильованою водою, руйнування стінок бактеріальних клітин в мікрохвильовому полі, видалення залишків бактеріальних стінок вакуум-фільтрацією, тим що, на відміну від прототипу, як живильне середовище використовують середовище на основі сирної сироватки, а як джерело селену використовують селеніт натрію в кількості 15-20 мкг/см^3 , при цьому після витримки біомаси мікроорганізмів в соляній кислоті біомасу заморожують.

Окрім того, використовують живильне середовище на основі сирної сироватки, яке містить наступні компоненти, мас. %:

натрій оцтовокислий	0,6
кукурудзяний екстракт	1,5
молоко коров'яче 11 %	1,0
сирна сироватка	решта.

Наноструктури селену (Se^0) є побічним продуктом в циклі перетворення селеноцистеїну (SeCys) до гідроселенід-аніону (H_2Se^-). Вони характеризуються меншою токсичністю, ніж його неорганічні форми та вищою біологічною доступністю для організму та легко проникають у внутрішньоклітинний простір та компенсують недостатній вміст селену шляхом включення в метаболічний ланцюг кругообігу селену в організмі людини. Отриманий препарат дає

можливість розширити асортимент відомих селеновмісних біологічно активних добавок. Новим в корисній моделі, що заявляється, є наявність наступних ознак: - використання як середовища культивування більш дешевого, але ефективного в накопиченні біомаси мікроорганізмів, середовища культивування із сирної сироватки, що містить наступні

інгредієнти, мас. %:

натрій оцтовокислий	0,6
кукурудзяний екстракт	1,5
молоко коров'яче 11 %	1,0
сирна сироватка	решта.

додавання як джерела селену селеніту натрію (Na_2SeO_3) в кількості 15-20 мкг/см³;

заморожування біомаси після руйнування клітинних стінок за участі соляної кислоти.

Запропонований спосіб здійснюють наступним методом. Готують живильне середовище для лактобактерій наступного складу, мас. %:

натрій оцтово-кислий	0,6
кукурудзяний екстракт	1,5
молоко 11 %	1,0
сирна сироватка	решта.

Значення рН середовища 6,7-7,0. Живильне середовище стерилізують при 115-120 °С, протягом 30 хвилин, охолоджують до 37-39 °С.

Водний розчин селеніту натрію вносять в середовище культивування безпосередньо перед внесенням мікроорганізмів у кількості 15-20 мкг/см³. Добову культуру *Lactobacillus acidophilus* вносять в кількості 5 об. %. Культивування проводять 24 години. Відокремлення біомаси здійснюють шляхом центрифугування при 10000 об./хв, протягом 15 хвилин та промивання дистильованою водою. Отриману біомасу витримують в концентрованій соляній кислоті протягом 4 днів. Промивають дистильованою водою, центрифугують при 10000 об./хв, протягом 15 хвилин та заморожують протягом доби. Далі біомасу витримують в умовах впливу високочастотних електромагнітних хвиль мікрохвильового діапазону, котрі створює потужний генератор - магнетрон. При потужності 70 %, температурі 90 °С біомасу витримують впродовж 15 хвилин. Для відокремлення клітинних уламків від наночасток селену біомасу розводять 30 мл стерильної дистильованої води та фільтрують у вакуум-фільтрі.

Приклад 1

Готували середовище для культивування лактобактерій, як наведено вище, стерилізували при 115 °С, протягом 30 хвилин та охолоджували до температури культивування. Селеніт натрію вносили в кількості 15 мкг/см³. Культуру лактобактерій вносили в отримане середовище. Культивування проводили при 37 °С протягом 24 годин. Отриману біомасу відділяли від культуральної рідини шляхом центрифугування при 10000 об./хв, протягом 15 хвилин та промивали стерильною дистильованою водою. Додавали концентровану соляну кислоту у співвідношенні 1:1, витримка тривала 4 доби. Біомасу промивали стерильною дистильованою водою та центрифугували при 10000 об./хв, протягом 15 хвилин. Заморожували протягом доби та витримували протягом 15 хвилин у мікрохвильовому полі, при потужності магнетрону 70 % та температурі 90 °С. Ресуспендували в 30 мл стерильної дистильованої води та фільтрували в вакуум-фільтрі, відокремлювали наноструктури селену. Динаміка накопичення біомаси мікроорганізмів представлена на фіг. 1. Клітини лактобактерій в нормі зображено на фіг. 1. Зруйновані клітини лактобактерій в умовах мікрохвильового поля зображено на фіг. 2. Наноструктури селену зображено на фіг. 3.

Приклад 2

Готували середовище для культивування лактобактерій, як наведено вище, стерилізували при 120 °С, протягом 30 хвилин та охолоджували до температури культивування. Селеніт натрію вносили в кількості 20 мкг/см³. Культуру лактобактерій вносили в отримане середовище. Культивування проводили при 37 °С протягом 24 годин. Отриману біомасу відділяли від культуральної рідини шляхом центрифугування при 10000 об./хв, протягом 15 хвилин та промивали стерильною дистильованою водою. Додавали концентровану соляну кислоту у співвідношенні 1:1, витримку проводили 4 доби. Біомасу промивали стерильною дистильованою водою та центрифугували при 10000 об./хв, протягом 15 хвилин. Заморожували протягом доби та витримували протягом 15 хвилин у мікрохвильовому полі, при потужності магнетрону 70 % та

температурі 90 °С. Ресуспендували в 30 мл стерильної дистильованої води та фільтрували в вакуум-фільтрі, відокремлюючи наноструктури селену.

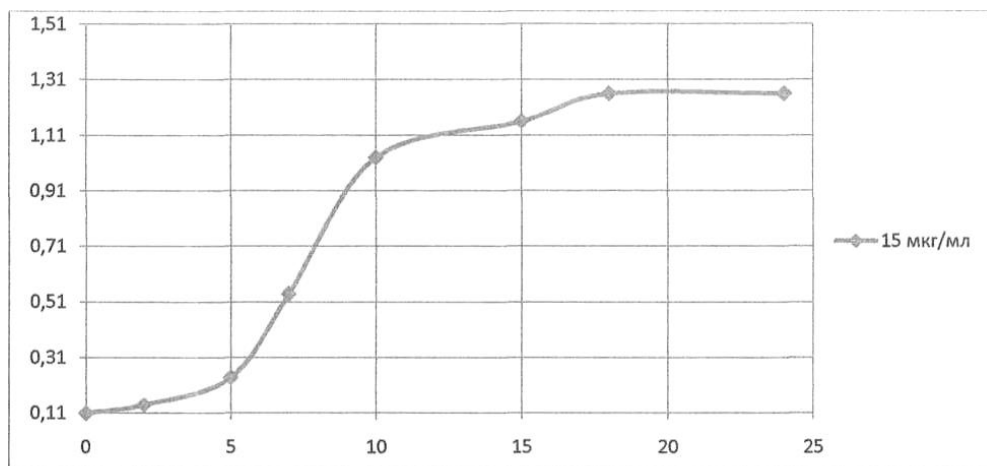
Динаміка накопичення біомаси мікроорганізмів представлена на фіг. 2. Клітини лактобактерій в нормі зображено на фіг. 1. Зруйновані клітини лактобактерій в умовах мікрохвильового поля зображено на фіг. 2.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

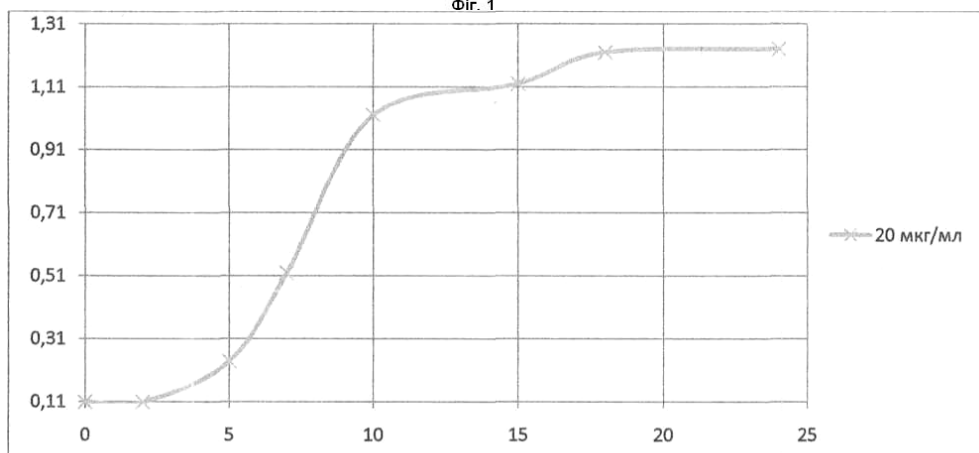
1. Спосіб одержання наноструктур селену, що передбачає приготування та стерилізацію середовища культивування для мікроорганізмів, охолодження його до температури культивування, внесення в середовище культивування неорганічної форми селену, внесення в середовище культивування чистої культури лактобактерій, культивування мікроорганізмів, відокремлення біомаси від культуральної рідини, руйнування бактеріальних клітин за участі концентрованої соляної кислоти, відокремлення біомаси мікроорганізмів від кислоти з подальшою промивкою дистильованою водою, руйнування стінок бактеріальних клітин в мікрохвильовому полі, видалення залишків бактеріальних стінок вакуум-фільтрацією, який **відрізняється** тим, що як живильне середовище використовують середовище на основі сирної сироватки, а як джерело селену використовують селеніт натрію в кількості 15-20 мкг/см³, при цьому після витримки біомаси мікроорганізмів в соляній кислоті біомасу заморожують.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що використовують живильне середовище на основі сирної сироватки, яке містить наступні компоненти, мас. %:

натрій оцтовокислий	0,6
кукурудзяний екстракт	1,5
молоко коров'яче 11 %	1,0
сирна сироватка	решта.



Фіг. 1



Фіг. 2

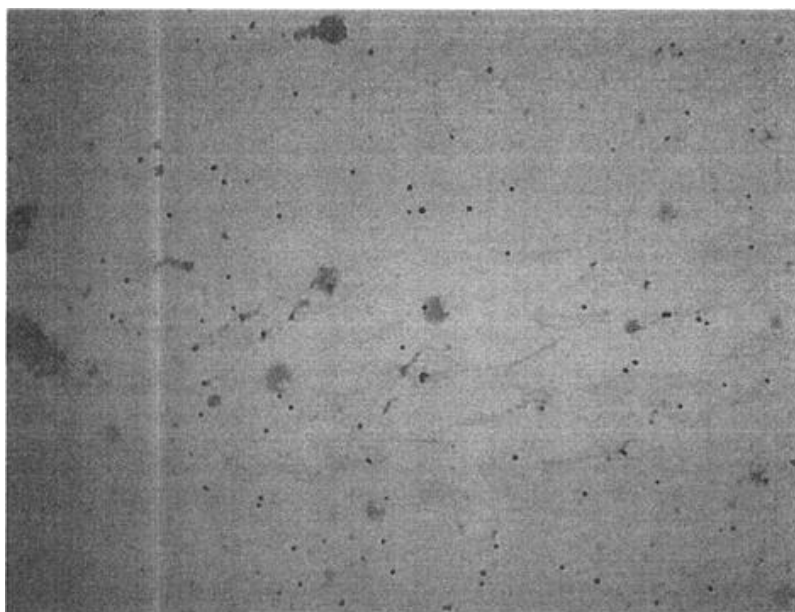
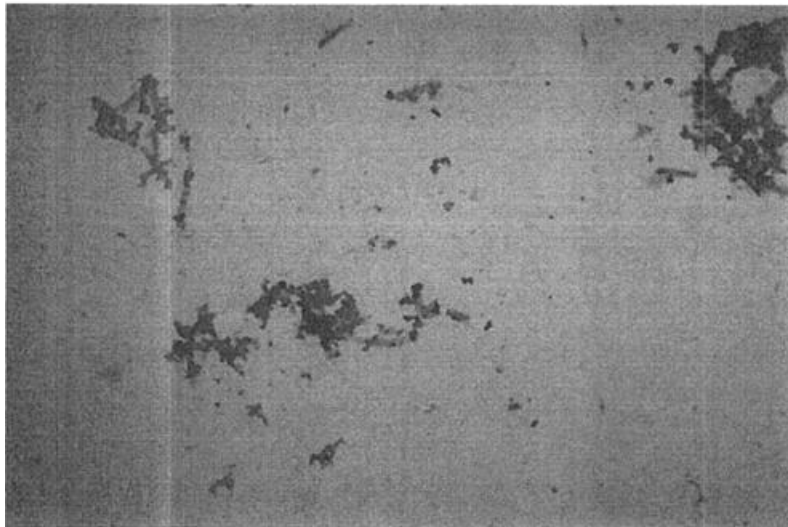


Fig. 3



Fig. 4



Фіг. 5

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601