



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102170** (13) **C2**
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2012 03105	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
(22) Дата подання заявки:	16.03.2012	UA 10467 A, 25.12.1996.
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.06.2013	UA 63962 U, 25.10.2011.
(41) Публікація відомостей про заяву:	10.10.2012, Бюл.№ 19	UA 92819 C2, 10.12.2010.
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.06.2013, Бюл.№ 11	UA 77345 C2, 15.11.2006.
(72) Винахідник(и):	Пирог Тетяна Павлівна (UA), Софілканіч Анна Павлівна (UA), Філюк Ірина Володимирівна (UA)	Пирог Т.П., Ігнатенко С.В., Тарасенко Д.О. Вплив якості посівного матеріалу на синтез поверхнево-активних речовин штамом <i>Rhodococcus erythropolis</i> ЕК-1 // Мікробіологічний Журнал. - 2008. - Т.70, №4. - С.9-17.
(73) Власник(и):	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Володимирська, 68, м. Київ-33, 01601 (UA)	Волошина І.М., Пирог Т.П. Синтез мікробних поверхнево-активних речовин для очищення доквілля від нафти та нафтових забруднень // Міжнародна науково-практична конференція «Перший Всеукраїнський з'їзд екологів» 4 - 7 жовтня 2006р. - Вінниця. - Збірник матеріалів. Пирог Т.П., Ігнатенко С.В. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва // Біотехнологія. - 2008. - Т.1, №4. - С.31-38. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина І.Н., Карпенко Е.В. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма <i>Rhodococcus erythropolis</i> ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикладная биохимия и микробиология. - 2005. - Т.40, №5. - С.544-550.

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН**(57) Реферат:**

Винахід належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання поверхнево-активних речовин, які можуть бути використані для очищення доквілля від нафти і нафтових забруднень, а також у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій промисловості. Спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення пересмажену соняшникову олію. Згідно з винаходом, в експоненційній фазі росту продуцента у середовище вносять 0,09-0,1 мМCu²⁺.

UA 102170 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 *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 [Пат. 63962 UA, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Софілканіч А.П., Квятківська І.В. Опубл. 25.12.2011, Бюл. № 20], який включає культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і джерело вуглецю і енергії. Для здешевлення процесу біосинтезу і підвищення концентрації синтезованих ПАР як джерело вуглецевого живлення використовують олієвмісні промислові відходи (у тому числі й пересмажену соняшникову олію), а на початку процесу або в експоненційній фазі росту продуцента у середовище вносять глюкозу масовою часткою 0,1-0,2 % чи мелясу масовою часткою 0,2-0,4 %.

Недоліком цього способу є недостатньо висока умовна концентрація поверхнево-активних речовин.

В основу винаходу поставлено задачу створення нового способу одержання поверхнево-активних речовин, який підвищує умовну концентрацію ПАР.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення пересмажену соняшникову олію. Згідно з винаходом, в експоненційній фазі росту продуцента у середовище вносять 0,09-0,1 мМ Cu^{2+} .

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Внесення 0,09-0,1 мМ Cu^{2+} в експоненційній фазі росту продуцента на середовищі з пересмаженою соняшниковою олією дає змогу підвищити у 1,4-1,5 разу умовну концентрацію ПАР (до 7,1).

Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 - 1,3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; NaCl - 1,0; Na_2HPO_4 - 0,6; KH_2PO_4 - 0,14; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; рН 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують використану (пересмажену) соняшникову олію у концентрації 2 % (об'ємна частка). В експоненційній фазі росту у середовище вносять 0,09-0,1 мМ Cu^{2+} .

Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 1,0 % пересмаженої олії. 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 у 1,4-1,5 рази умовну концентрацію ПАР.

Приклад 1. Синтез ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 залежно від моменту внесення у середовище катіонів міді.

Культивування штаму IMB Ac-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 - 1,3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; NaCl - 1,0; Na_2HPO_4 - 0,6; KH_2PO_4 - 0,14; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; рН 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують використану (пересмажену) соняшникову олію, у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 1,0 % пересмаженої олії. Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища. На початку процесу (лаг-фаза), в експоненційній і стаціонарній фазі росту у середовище вносять катіони міді у вигляді 0,1 М розчину $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Концентрація Cu^{2+} становить 0,05 мМ.

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

відповідає значенню умовної концентрації ПАР. Перед вимірюванням цього показника культуральну рідину звільняють від залишкового субстрату обробкою бензином. Біомасу визначають ваговим методом.

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. 1 наведено дані про синтез ПАР *R. erythropolis* EK-1 залежно від моменту внесення у середовище катіонів міді.

Як видно з наведених у табл. 1 даних, внесення катіонів міді в експоненційній фазі росту штаму IMB Ac-5017 супроводжується підвищенням показника умовної концентрації ПАР в 1,3 разу порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без Cu^{2+} .

Таблиця 1

Синтез ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017
за наявності у середовищі з пересмаженою олією 0,05 мМ Cu^{2+}

Момент внесення Cu^{2+} (фаза росту)	Біомаса, г/л	ПАР*	E_{24} , %
Без міді (прототип)	0,7±0,04	4,8±0,24	58±2,9
Лаг-фаза	0,3±0,01	2,3±0,1	40±2,0
Експоненційна	0,6±0,03	6,0±0,30	60±3,0
Стаціонарна	0,7±0,04	5,2±0,26	59±3,0

Приклад 2. Вплив концентрації Cu^{2+} на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на олієвмісних середовищах.

Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу (див. приклад 1). Як джерело вуглецю використовують пересмажену олію у концентрації 2,0 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 1,0 % пересмаженої олії. Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища. В експоненційній фазі росту у середовище вносять катіони міді у вигляді 0,1 М розчину $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Концентрація Cu^{2+} становить 0,01-0,3 мМ.

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

Біомасу і умовну концентрацію ПАР визначають як описано у прикладі 1.

Дані з впливу різних концентрацій Cu^{2+} на синтез ПАР штамом IMB Ac-5017 наведено у табл. 2.

Як видно з наведених у табл. 2 даних, внесення в олієвмісне середовище 0,09-0,1 мМ Cu^{2+} супроводжується підвищенням в 1,4-1,5 рази умовної концентрації ПАР порівняно з показниками на середовищі без катіонів міді.

Таблиця 2

Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017
на пересмаженій олії від концентрації Cu^{2+}

Концентрація Cu^{2+} , мМ	Біомаса, г/л	ПАР*
Без міді (прототип)	0,7±0,04	4,8±0,24
0,01	0,7±0,04	4,6±0,23
0,05	0,6±0,03	6,0±0,30
0,07	0,7±0,04	6,4±0,32
0,09	0,7±0,04	6,8±0,34
0,1	0,7±0,04	7,1±0,35
0,15	0,6±0,03	5,4±0,27
0,2	0,6±0,03	4,8±0,24
0,3	0,5±0,02	3,7±0,18

Приклад 3. Залежність індексу емульгування культуральної рідини *R. erythropolis* IMB Ac-5017 від моменту внесення і концентрації катіонів міді/

Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу (див. приклад 1). Як джерело вуглецю використовують пересмажену олію у концентрації 2,0 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 1,0 % пересмаженої олії. Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища. В експоненційній і стаціонарній фазі росту у середовище вносять катіони міді у вигляді 0,1 М розчину $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$. Концентрація Cu^{2+} становить 0,01-0,3 мМ.

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

Індекс емульгування культуральної рідини визначають як описано у прикладі 1. Дані наведено у табл. 3.

Як видно з наведених у табл. 3 даних, зниження індексу емульгування порівняно з прототипом спостерігається лише у разі внесення у середовище максимальної з досліджуваних концентрацій Cu^{2+} (0,5 мМ). У всіх інших варіантах показник E_{24} практично не змінюється.

Таблиця 3

Вплив катіонів міді на індекс емульгування культуральної рідини *R. erythropolis* IMB Ac-5017

Момент внесення Cu^{2+} (фаза росту)	Концентрація Cu^{2+} , мМ	E_{24} , %
Без міді (прототип)	0	58±2,9
Експоненційна	0,01	54±2,7
	0,05	60±3,0
	0,1	63±3,2
	0,5	42±2,1
Стаціонарна	0,01	55±2,8
	0,05	59±3,0
	0,1	57±2,8
	0,5	42±2,1

Таким чином, культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на олієвмісних субстратах з внесенням в експоненційній фазі Cu^{2+} у концентрації 0,09-0,1 мМ дає змогу підвищити в 1,4-1,5 разу умовну концентрацію ПАР (до 7,1).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, який включає культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення пересмажену соняшникову олію, який **відрізняється** тим, що в експоненційній фазі росту продуцента у середовище вносять 0,09-0,1 мМ Cu^{2+} .

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