



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **98571**

(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 2011 03809**

(22) Дата подання заявки: **29.03.2011**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на винахід: **25.05.2012**

(41) Публікація відомостей  
про заявку: **12.12.2011, Бюл.№ 23**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.05.2012, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

**Пирог Тетяна Павлівна (UA),  
Софілканич Анна Павлівна (UA),  
Кундєєв Максим Дмитрович (UA)**

(73) Власник(и):

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,  
вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601,  
Україна (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги  
експертизою:

UA 10467 A, 25.12.1996

UA 92819 C2, 10.12.2010

UA 77345 C2, 15.11.2006

RU 2161595 C2, 10.01.2001

RU 2384616 C2, 20.03.2010

Пристай М.В., Карпенко О.В., Петріна Р.О.,  
Ногіна Т.М., Пошук нових ефективних  
продуцентів біосурфактантів і каротиноїдів  
серед представників родів *Rhodococcus* і  
*Gordonia*, Національний університет  
"Львівська політехніка" 2007, С. 138-142  
Т.П. Пирог, Т.А.Шевчук, Ю.О. Клименко,  
Особливості синтезу поверхнево-активних  
трегалозоміколатів *Rhodococcus erythropolis*  
ЕК-1, Мікробіол. журн., 2010, Т. 72, № 2, С.  
10-15

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

(57) Реферат:

Винахід належить способу одержання поверхнево-активних речовин, який включає культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і джерело вуглецю і енергії, причому як джерело вуглецевого живлення використовують олієвмісні промислові відходи, 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 %. Спосіб дає змогу підвищити у 1,4-2 рази концентрацію синтезованих ПАР і здешевити процес біосинтезу.

UA 98571 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 промисловостях.

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* 1MB Ac-5017 [Пат. 92819 UA, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Тарасенко Д.О., Яцук Д.В. Опубл. 10.12.2010, Бюл. № 23], який передбачає культивування *R. erythropolis* 1MB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і джерело вуглецю і енергії. Для підвищення концентрації ПАР та скорочення тривалості культивування продуцента на початку стаціонарної фази росту у середовище з етанолом чи гексадеканом вносять 0,2-0,25 % фумарату і 0,1-0,15 % цитрату.

Недоліком цього способу є занадто висока вартість використовуваних джерел вуглецевого живлення, а також "нетехнологічність" водонерозчинного гідрофобного ростового субстрату - гексадекана і недостатньо висока концентрація синтезованих поверхнево-активних речовин.

В основу винаходу покладено задачу створення нового способу одержання поверхнево-активних речовин, який здешевлює процес біосинтезу і підвищує концентрацію синтезованих ПАР.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування *R. erythropolis* 1MB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і джерело вуглецю і енергії. Згідно винаходу як джерело вуглецевого живлення використовують олієвмісні промислові відходи, 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 %.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Використання як джерела вуглецевого живлення олієвмісних промислових відходів і внесення на початку процесу або в експоненційній фазі росту продуцента глюкози масовою часткою 0,1-0,2 % чи меляси масовою часткою 0,2-0,4 % дає змогу підвищити у 1,4-2 рази концентрацію синтезованих ПАР і здешевити процес біосинтезу.

Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *R. erythropolis* 1MB Ac-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  - 1,3;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1;  $\text{NaCl}$  - 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 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 відходи оліє-жирових виробництв (фузи) або використану (пересмажену) соняшникову олію у концентрації 2 % (об'ємна частка). На початку процесу або в середині експоненційної фази росту у середовище вносять глюкозу масовою часткою 0,1-0,2 % чи мелясу масовою часткою 0,2-0,4 %.

Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 1,0 % олієвмісних відходів (фузи, пересмажена олія). 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 1,4-2 рази концентрацію синтезованих ПАР і здешевити процес біосинтезу.

Приклад 1.

Синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* 1MB Ac-5017 на промислових відходах

Культивування штаму 1MB Ac-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  - 1,3;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1;  $\text{NaCl}$  - 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 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: відходи оліє-жирових виробництв (фузи), використану (пересмажену) соняшникову олію, гліцерин і рідкі парафіни у концентрації 0,5 і 1,0 % (об'ємна частка), гексадекан (контроль) у концентрації 2,0 % (об'ємна частка), а також мелясу масовою часткою 0,5 і 1,0 %. Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % відповідного джерела вуглецю. 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.

Поверхневий натяг ( $\sigma_s$ ) 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  $\sigma_s$  від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР.

У разі вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на субстратах, що можуть знижувати поверхневий натяг (гексадекан, рідкі парафіни, олія та відходи її виробництва) перед вимірюванням цього показника культуральну рідину звільняють від залишкового субстрату обробкою гексаном (якщо штам вирощують на середовищі з гексадеканом або рідкими парафінами) чи бензином (якщо культивування штаму здійснюють на олієвмісних середовищах).

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 за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на відходах різних виробництв.

Таблиця 1

Синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на відходах промислових виробництв

Субстрат	Концентрація субстрату, %	Показники синтезу ПАР		
		pH <sub>кінцеве</sub>	$E_{24}$ , %	ПАР*
Відходи оліє-жирових виробництв	0,5	7,9±0,2	38±2	4,3±0,21
	1,0	7,9±0,2	40±2	5,0±0,25
Використана (пересмажена) соняшникова олія	0,5	8,5±0,3	20±1	2,0±0,10
	1,0	7,7±0,2	65±3	4,8±0,24
Меляса	0,5	8,9±0,3	37±1,5	2,0±0,10
	1,0	9,0±0,3	40±2	3,3±0,16
Гліцерин	0,5	7,0±0,2	37±1,5	2,1±0,10
	1,0	7,1±0,2	47±2	3,2±0,16
Рідкі парафіни	0,5	7,0±0,2	39±2	4,3±0,21
	1,0	7,1±0,2	47±2	4,6±0,23
Гексадекан (контроль)	2,0	7,0±0,2	40±2	4,8±0,24

Як видно з наведених у табл. 1 даних, показники синтезу ПАР у процесі культивування штаму ЕК-1 на олієвмісних середовищах (ПАР\* 4,8-5,0) не відрізняються від таких на гексадекані і рідких парафінах (ПАР\* 4,6-4,8).

У подальших дослідженнях як субстрат для вирощування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 використовують пересмажену олію, оскільки вона у великій кількості накопичується у різних закладах громадського харчування.

Приклад 2.

Вплив глюкози на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-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). На початку процесу культивування, у середині експоненційної (48 год.) і стаціонарній фазі (72 год.) у середовище вносять глюкозу масовою часткою 0,05-0,3 %. Вибір вуглеводів як додаткового субстрату був зумовлений тим, що ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 за хімічною природою є гліколіпідами (трегалооміколатами), а отже внесення глюкози за умов росту штаму ІМВ Ас-5017 на олієвмісному середовищі може інтенсифікувати синтез ПАР за рахунок наявності майже готових блоків у середовищі культивування.

Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі з 1 % 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 °C упродовж 120 год.

Кількість синтезованих ПАР визначають так. Культуральну рідину центрифугують (5000 g, 20 хв.) для відділення біомаси. 25 мл супернатанту переносять у циліндричну ділільну воронку об'ємом 100 мл, додають 5 мл 1 М НСІ, воронку закривають пришліфованим корком і струшують упродовж 3 хв., далі додають ще 4 мл 1 М НСІ 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 НСІ 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 ІР-ІМ2 (Росія) при температурі 50° й абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

Дані з впливу різних концентрацій глюкози і моменту її внесення у олієвмісне середовище на синтез ПАР штамом ІМВ Ас-5017 наведено у табл. 2.

Як видно з наведених у табл. 2 даних, внесення в олієвмісне середовище на початку процесу або в експоненційній фазі росту продуцента глюкози масовою часткою 0,1-0,2 % супроводжується підвищенням у 2-3 рази концентрації синтезованих ПАР порівняно з показниками на середовищі без вуглеводів і в 1,4-2 рази порівняно з прототипом.

Приклад 3.

Дослідження можливості заміни глюкози на мелясу за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-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). На початку процесу культивування і в середині експоненційної фази росту продуцента у середовище вносять мелясу масовою часткою 0,2 і 0,4 %. Показники синтезу поверхнево-активних речовин визначають як описано у прикладі 2.

Як засвідчують дані, наведені у табл. 2 і 3, у разі використання меляси замість глюкози за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на олієвмісних середовищах концентрація синтезованих ПАР і індекс емульгування культуральної рідини практично не змінюються.

Таким чином, культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на олієвмісних промислових відходах з внесенням на початку процесу або в експоненційній фазі росту глюкози масовою часткою 0,1-0,2 % або меляси масовою часткою 0,2-0,4 % дає змогу підвищити в 1,4-2 рази концентрацію синтезованих ПАР і здешевити процес біосинтезу порівняно з прототипом.

Таблиця 2

Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017  
на пересмаженій олії від моменту внесення і концентрації глюкози

Момент внесення глюкози	Концентрація глюкози, %	pH	E <sub>24</sub> , %	Концентрація ПАР, г/л
Лаг-фаза (0 год.)	0,05	7,2	42±2,1	2,6±0,13
	0,1	7,2	47±2,3	5,1±0,25
	0,2	7,2	45±2,2	3,6±0,18
	0,3	7,2	39±2,0	2,1±0,10
Експоненційна фаза (48 год.)	0,05	7,0	42±2,1	2,5±0,12
	0,1	7,0	42±2,1	3,6±0,18
	0,2	7,0	43±2,1	4,5±0,22
	0,3	7,1	40±2,0	3,1±0,15
Стаціонарна фаза (72 год.)	0,05	7,1	38±1,9	2,8±0,14
	0,1	7,1	38±1,9	2,8±0,14
	0,2	7,3	50±2,5	2,6±0,13
	0,3	7,5	51±2,6	2,6±0,13
Контроль (без глюкози)	0	7,0	42±2,1	1,7±0,09
Прототип	0	9,3	45±2,2	2,5±0,12

Примітка. Умови культивування згідно прототипу: джерело вуглецю у середовищі - гексадекан у концентрації 2 % (об'ємна частка), на початку стаціонарної фази росту у середовище вносять фумарат і цитрат натрію масовою часткою 0,2 і 0,1 % відповідно.

Таблиця 3

Вплив меляси на синтез ПАР за умов *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на пересмаженій олії

Момент внесення меляси	Концентрація меляси, %	pH	E <sub>24</sub> , %	Концентрація ПАР, г/л
Ляг-фаза	0,2	7,2	47±2,3	5,0±0,25
	0,4	7,2	45±2,2	3,5±0,18
Експоненційна фаза	0,2	7,0	42±2,1	3,3±0,17
	0,4	7,0	43±2,1	4,4±0,22

- 5 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, який включає; культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і джерело вуглецю і енергії, який відрізняється тим, що як джерело вуглецевого живлення використовують олієвмісні промислові відходи, 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 %.

- 10 Винахід належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання метаболітів з поверхнево-активними і емульгуючими властивостями, які можуть бути використані для очистки доквілля від нафти і нафтових забруднень, а також у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій промисловості.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 15 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, який включає культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і джерело вуглецю і енергії, який **відрізняється** тим, що як джерело вуглецевого живлення використовують олієвмісні промислові відходи, а на початку процесу або в експоненційній фазі росту продуцента у середовище вносять глюкозу масовою часткою 0,1-0,2 % або мелясу масовою часткою 0,2-0,4 %.
- 20

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