



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109831** (13) **C2**

(51) МПК

**C12P 1/06** (2006.01)**C12N 1/14** (2006.01)**C12R 1/365** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2014 03748</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Пирог Тетяна Павлівна (UA), Берегова Христина Андріївна (UA), Кудря Надія Володимирівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>10.04.2014</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601 (UA)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>12.10.2015</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 10467 A, 25.12.1996 UA 81804 U, 10.07.2013 Кудря. Н. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405 на суміші ростових субстратів / Н. Кудря, Т. Пирог // <i>Ukrainian Food Journal</i> . ? 2013. – Vol. 2. Is. 2. – С. 203?209 Пирог Т.П. Синтез поверхнево-активних речовин <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405 на суміші меляси з етанолом і гліцерином/ Т.П. Пирог, Н.В. Кудря, Х.А. Берегова // <i>Наукові праці НУХТ</i> . - 2014. – Том 20, – №1. - С. 17-23 Вплив умов культивування на синтез поверхнево-активних речовин за умов росту <i>Nocardia vaccinii</i> К-8 на гліцерині / Т. П. Пирог, Н. А. Гриценко, Д. В. Яцук, О. О. Боровик // <i>Наукові праці НУХТ</i> . – 2012. ? № 44. – С. 17?21 Покора Х. А. Синтез поверхнево-активних речовин за умов вирощування <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405 і <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241 на відходах виробництва / Х. А. Покора // <i>Наукові праці НУХТ</i> . - 2013. - № 51. - С. 8-13
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>25.12.2014, Бюл.№ 24</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>12.10.2015, Бюл.№ 19</b>	

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

Винахід належить до способу 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, причому як джерело вуглецю використовують суміш технічного гліцерину об'ємною часткою 4,9-5,1 % та меляси масовою часткою 0,9-1,1 %.

UA 109831 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.

5 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.]

10 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. 81804 UA, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Шулякова М.О., Машченко О.Ю. Опубл. 10.07.2013, Бюл. № 13], який включає культивування *R. erythropolis* 1MB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і джерело вуглецю і енергії. Для підвищення умовної концентрації ПАР як джерело вуглецю та енергії використовують суміш гексадекану і очищеного гліцерину у молярному співвідношенні 1:7, а концентрація гексадекану і гліцерину становить (% , об'ємна частка) 0,59-0,61 і 0,83-0,85 відповідно.

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

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

25 Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування штаму *Nocardia vacsinii* 1MB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення суміш ростових субстратів. Згідно з винаходом як джерело вуглецю використовують суміш технічного гліцерину (відхід виробництва біодизелю) об'ємною часткою 4,9-5,1 % та меляси масовою часткою 0,9-1,1 %.

30 Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Використання як джерела вуглецю для культивування штаму *N. vacsinii* 1MB B-7405 суміші технічного гліцерину об'ємною часткою 4,9-5,1 % та меляси масовою часткою 0,9-1,1 % дає змогу підвищити у 2,3-2,4 рази концентрацію синтезованих ПАР (до 6,2-6,4 г/л).

35 Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *N. vacsinii* 1MB B-7405 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$ -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,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -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 технічного гліцерину (5,0 %, об'ємна частка) та меляси (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 меляси (0,5 %, 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.

45 Використання нового способу дає змогу підвищити у 2,3-2,4 рази концентрацію синтезованих ПАР.

Приклад 1. Синтез ПАР *N. vacsinii* 1MB B-7405 на суміші різних концентрацій технічного гліцерину та меляси.

50 Культивування штаму 1MB B-7405 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  - 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,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -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 технічного гліцерину (1,0-6,0 %, об'ємна частка) та меляси (1,0-3,0 %, масова частка). Технічний гліцерин одержано від підприємства-виробника біодизелю (Запорізький біопаливний завод). 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 меляси (0,5 %, 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.

60 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 НСІ, лійку 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 лійці 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 1М 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.

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 (Е24) 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 N. vaccinii 1MB B-7405 залежно від концентрації технічного гліцерину і меляси у суміші.

Таблиця 1

Вплив концентрації технічного гліцерину і меляси  
у змішаному субстраті на синтез ПАР N. vaccinii 1MB B-7405

Концентрація у суміші, %		ПАР, г/л	Е <sub>24</sub> , %
технічного гліцерину	меляси		
1,0	1,0	2,8±0,14	58±2,9
2,0	1,0	3,0±0,15	58±2,9
3,0	1,0	3,6±0,18	57±2,8
4,0	1,0	4,8±0,24	59±2,9
5,0	1,0	6,4±0,32	62±3,1
6,0	1,0	5,9±0,29	58±2,9
1,0	1,5	2,1±0,10	56±2,8
1,0	2,0	2,0±0,10	55±2,8
1,0	2,5	2,3±0,11	52±2,6
1,0	3,0	1,8±0,09	52±2,6

Наведені у табл. 1 дані свідчать, що показники синтезу ПАР є найвищими за умов росту штаму 1MB B-7405 на суміші 5,0 % технічного гліцерину і 1,0 % меляси.

Приклад 2. Визначення оптимальної концентрації технічного гліцерину у змішаному субстраті для синтезу ПАР N. vaccinii 1MB B-7405.

Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу (див. приклад 1). Як джерело вуглецю та енергії використовують суміш гліцерину (4,5-5,5 %, об'ємна частка) та меляси (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 меляси (0,5 %, 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.

Концентрацію синтезованих ПАР та індекс емульгування визначають як описано у прикладі 1. Як видно з наведених у табл. 2 даних, за концентрації технічного гліцерину 4,9-5,1 % (об'ємна частка) у суміші з 1,0 % меляси концентрація ПАР та індекс емульгування є найвищими.

Таблиця 2

Синтез ПАР N. vaccinii 1MB B-7405 залежно  
від концентрації технічного гліцерину у суміші з мелясою (1,0 %)

Концентрація технічного гліцерину, %	ПАР, г/л	E <sub>24</sub> , %
4,5	5,2±0,26	57±2,8
4,7	5,8±0,29	58±2,9
4,9	6,3±0,32	61±3,0
5,0	6,4±0,32	62±3,1
5,1	6,2±0,31	60±3,0
5,3	5,8±0,29	56±2,8
5,5	5,0±0,25	55±2,8

Приклад 3. Визначення оптимальної концентрації меляси у суміші з гліцерином для синтезу ПАР N. vaccinii 1MB B-7405

5 Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу (див. приклад 1). Як джерело вуглецю та енергії використовують суміш гліцерину (5,0 %, об'ємна частка) та меляси (0,8-1,5 %, 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 меляси (0,5 %, масова частка). Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища.

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

Концентрацію синтезованих ПАР та індекс емульгування визначають як описано у прикладі 1. Показники синтезу ПАР на суміші технічного гліцерину і різних концентрацій меляси наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Синтез ПАР N. vaccinii 1MB B-7405 залежно  
від концентрації меляси у суміші з технічним гліцерином (5,0 %)

Концентрація меляси, %	ПАР, г/л	E <sub>24</sub> , %
0,8	6,0±0,30	59±2,9
0,9	6,3±0,31	61±3,0
1,0	6,4±0,32	62±3,1
1,1	6,2±0,31	60±3,0
1,2	6,0±0,30	58±2,9
1,3	5,8±0,29	56±2,8
1,4	5,3±0,27	56±2,8
1,5	5,0±0,25	55±2,8

Як видно з наведених у табл. 3 даних, найвища концентрація ПАР (6,2-6,4 г/л) і найвищий індекс емульгування (60-62 %) спостерігаються за концентрації меляси у суміші 0,9-1,1 %.

20 Приклад 4. Порівняння показників синтезу ПАР штамами R. erythropolis 1MB Ac-5017 і N. vaccinii 1MB B-7405 на суміші ростових субстратів

25 Культивування N. vaccinii 1MB B-7405 здійснюють на середовищі, наведеному у прикладі 1. Як джерело вуглецю та енергії використовують суміш технічного гліцерину (5,0 %, об'ємна частка) та меляси (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 меляси (0,5 %, масова частка). Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища.

30 Культивування штаму 1MB Ac-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNCb-1,3; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-0,1; NaCl-1,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-0,14; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-0,001; pH 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують суміш гексадекану та гліцерину об'ємною часткою 0,60 і 0,84 % відповідно. Як посівний матеріал використовують

культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % гексадекану. Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища.

- 5 Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 28 °С упродовж 120 год. Концентрацію ПАР визначають як описано у прикладі 1. Показники синтезу ПАР штамми *R. erythropolis* 1MB Ac-5017 і *N. vaccinii* 1MB B-7405 на суміші ростових субстратів наведено у табл. 4.

Таблиця 4

Синтез ПАР за умов росту *N. vaccinii* 1MB B-7405 і *R. Erythropolis* 1MB Ac-5017 на суміші ростових субстратів

Штам	Змішаний субстрат	ПАР, г/л
<i>R. erythropolis</i> 1MB Ac-5017 (прототип)	Гексадекан+гліцерин	2,7±0,14
<i>N. vaccinii</i> 1MB B-7405	Технічний гліцерин+м'яса	6,4±0,32

- 10 Як видно з наведених у табл. 4 даних, культивування *N. vaccinii* 1MB B-7405 на суміші технічного гліцерину об'ємною часткою 5,0 % і м'яси масовою часткою 1,0 % дає змогу підвищити концентрацію ПАР у 2,4 разу (до 6,4 г/л) порівняно з прототипом.

#### ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

- 15 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування штаму *Nocardia vaccinii* 1MB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення суміш ростових субстратів, який **відрізняється** тим, що як джерело вуглецю використовують суміш технічного гліцерину об'ємною часткою 4,9-5,1 % та м'яси масовою часткою 0,9-1,1 %.

20

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

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