



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 111046

(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

(21) Номер заявки:	а 2015 02425	(72) Винахідник(и):	Пирог Тетяна Павлівна (UA), Панасюк Катерина Вікторівна (UA), Никитюк Лілія Вікторівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	18.03.2015	(73) Власник(и):	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.03.2016	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	UA 10467 A, 25.12.1996 UA 63962 U, 25.10.2011 UA a201402240, 25.12.2014 Покора Х. А. Синтез поверхнево-активних речовин за умов вирощування <i>Nocardia</i> <i>vaccinii</i> IMB B-7405 і <i>Acinetobacter</i> <i>calcoaceticus</i> IMB B-7241 на відходах виробництва / Х. А. Покора // Наукові праці НУХТ. - 2013. - № 51. - С. 8-13 Кудря. Н. Особливості синтезу поверхнево- активних речовин <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B- 7405 на суміші ростових субстратів / Н. Кудря, Т. Пирог // Ukrainian Food Journal. ? 2013. – Vol. 2. Is. 2. – С. 203?209
(41) Публікація відомостей про заявку:	12.10.2015, Бюл.№ 19		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.03.2016, Бюл.№ 5		

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

## (57) Реферат:

Винахід належить до способу одержання поверхнево-активних речовин, який включає культивування штаму *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело вуглецевого живлення - пересмажену соняшникову олію, з використанням посівного матеріалу, вирощеного на мелясі. Концентрація пересмаженої олії становить 2,9-3,1 % (об'ємна частка), а вміст меляси у середовищі для одержання інокуляту - 0,7-0,9 % (масова частка).

UA 111046 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 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.]

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* 1MB 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 ПАР-синтезувальна здатність (кількість грам ПАР, синтезованих 1 г біомаси).

В основу винаходу поставлено задачу 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 vacinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело вуглецевого живлення - пересмажену соняшникову олію, з використанням посівного матеріалу, вирощеного на мелясі. Згідно з винаходом концентрація пересмаженої олії у середовищі становить 2,9-3,1 %, а вміст меляси у середовищі для одержання інокуляту 0,7-0,9 % (масова частка).

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Використання пересмаженої соняшникової олії у концентрації 2,9-3,1 % (об'ємна частка), а також інокуляту, вирощеного на середовищі з мелясою масовою часткою 0,7-0,9 % дає змогу підвищити в 1,1-1,2 рази ПАР-синтезувальну здатність (до 3,5-3,6 г ПАР/г біомаси).

Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *N. vacinii* 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); рН 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують відпрацьовану (пересмажену) соняшникову олію у концентрації 3 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,8 % меляси (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.

Використання нового способу дає змогу підвищити в 1,1-1,2 рази ПАР-синтезувальну здатність.

Приклад 1. Синтез ПАР *N. vacinii* 1MB B-7405 залежно від концентрації олії у середовищі культивування

Культивування штаму IMB 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); рН 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують відпрацьовану (пересмажену) соняшникову олію у концентрації 2-5 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить як джерело вуглецю мелясу (1,0 %, 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. Для видалення залишкової соняшникової олії з культуральної рідини здійснюють трикратну екстракцію її петролейним ефіром

(співвідношення 1:1). Далі культуральну рідину центрифугують (5000 г, 20 хв.) для відділення біомаси. 25 мл супернатанту переносять у циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл, додають 5 мл 1 М HCl, лійку 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 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 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 °C й абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

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. Перед вимірюванням цього показника культуральну рідину звільняють від залишкового субстрату обробкою бензином.

У табл. 1 наведено дані про синтез ПАР N. vaccinii IMB B-7405 залежно від концентрації пересмаженої соняшникової олії у середовищі культивування продуцента.

Таблиця 1

Вплив концентрації пересмаженої олії на біосинтез ПАР N. vaccinii IMB B-7405

Концентрація олії, %	ПАР*	ПАР, г/л
2	3,0±0,15	2,8±0,14
3	3,9±0,19	3,3±0,16
4	2,9±0,14	2,3±0,11
5	2,1±0,10	1,7±0,08

Наведені у табл. 1 дані свідчать, що найвищі показники синтезу ПАР досягаються у процесі вирощування штаму IMB B-7405 на середовищі з 3 % пересмаженої соняшникової олії.

Приклад 2. Залежність синтезу ПАР N. vaccinii IMB B-7405 на пересмаженій соняшниковій олії від концентрації меляси у середовищі для одержання інокуляту.

Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу (див. приклад 1). Як джерело вуглецю використовують пересмажену олію у концентрації 3 % (об'ємна частка). Як поживний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,6-1,0 % меляси (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.

Умовну концентрацію ПАР і концентрацію ПАР (г/л) 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. 2 даних, найвищі показники синтезу ПАР спостерігаються за концентрації меляси у середовищі для одержання інокуляту 0,7-0,9 %.

Таблиця 2

Вплив концентрації меляси у середовищі для одержання інокуляту на біосинтез ПАР N. vaccinii IMB B-7405

Концентрація меляси у середовищі для одержання інокуляту (% , масова частка)	ПАР*	г ПАР/г біомаси
0,6	3,0±0,15	3,0±0,15
0,7	4,6±0,30	3,5±0,17
0,8	4,7±0,33	3,6±0,18
0,9	4,7±0,33	3,5±0,17
1,0	3,9±0,19	3,2±0,16

Приклад 3. Визначення оптимальної концентрації пересмаженої олії у середовищі культивування *N. vaccinii* IMB B-7405

Культивування бактерій здійснюють на середовищі наведеного вище складу (див. приклад 1). Як джерело вуглецю використовують пересмажену олію у концентрації 2,8-3,2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,8 % меляси (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.

Умовну концентрацію ПАР визначають як описано у прикладі 1, ПАР-синтезувальну здатність - у прикладі 2.

Дані, наведені у табл. 3, засвідчують, що ПАР-синтезувальна здатність досягає максимального значення у разі вирощування штаму IMB B-7405 на середовищі з 2,9-3,1 % пересмаженої соняшникової олії.

Таблиця 3

Показники синтезу ПАР за умов росту *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з різною концентрацією пересмаженої олії

Концентрація пересмаженої олії (% об'ємна частка)	ПАР*	г ПАР/г біомаси
2,8	4,0±0,20	3,1±0,15
2,9	4,8±0,33	3,5±0,17
3,0	4,7±0,33	3,6±0,18
3,1	4,7±0,33	3,5±0,17
3,2	4,1±0,21	3,2±0,16

Приклад 4. Порівняння показників синтезу ПАР штамами *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 на пересмаженій соняшниковій олії

Культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 здійснюють на середовищі, наведеному у прикладі 1. Як джерело вуглецю використовують пересмажену олію у концентрації 3 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,8 % меляси (масова частка). Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища.

Культивування штаму IMB Ac-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO<sub>3</sub> - 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 пересмажену соняшкову олію у концентрації 2 % (об'ємна частка). У середовище культивування штаму Ac-5017 додатково вносять 0,1 % глюкози (масова частка).

Як посівний матеріал використовують штам *R. erythropolis* IMB Ac-5017, вирощений до середини експоненційної фази росту на середовищі наведеного вище складу, що містить 1,0 % (об'ємна частка) соняшникової 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.

Умовну концентрацію ПАР визначають як описано у прикладі 1, ПАР-синтезувальну здатність - у прикладі 2.

Показники синтезу ПАР штамами IMB B-7405 і Ac-5017 наведено у табл. 4.

Таблиця 4

Синтез ПАР за умов росту *N. vaccinii* IMB B-7405 і *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на пересмаженій соняшниковій олії

Штам	ПАР, г/л	ПАР-синтезувальна здатність, г ПАР/г біомаси
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017 (прототип)	5,1 ±0,25	3,1±0,15
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	4,0±0,20	3,6±0,18

Як видно з наведених у табл. 4 даних, культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на середовищі, що містить пересмажену соняшникову олію у концентрації 3 %, з використанням посівного матеріалу, вирощеного на мелясі масовою часткою 0,7 %, дає змогу підвищити ПАР-синтезувальну здатність майже в 1,2 разу порівняно з прототипом.

5

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

10

Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування штаму *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело вуглецевого живлення - пересмажену соняшникову олію, з використанням посівного матеріалу, вирощеного на мелясі, який **відрізняється** тим, що концентрація пересмаженої олії становить 2,9-3,1 % (об'ємна частка), а вміст меляси у середовищі для одержання інокуляту - 0,7-0,9 % (масова частка).

---

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

---

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