



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **93162**

(13) **U**

(51) МПК

**C12N 1/20** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 02243**

(22) Дата подання заявки: **05.03.2014**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.09.2014**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.09.2014, Бюл.№ 18**

(72) Винахідник(и):

**Пирог Тетяна Павлівна (UA),  
Берегова Христина Андріївна (UA),  
Панасюк Катерина Вікторівна (UA)**

(73) Власник(и):

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

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

### (57) Реферат:

Спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування штаму *Nocardia vacsinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело вуглецевого живлення пересмажену соняшникову олію (2 %, об'ємна частка), як попередник біосинтезу ПАР - мелясу. Концентрація меляси в олієвмісному середовищі становить 0,10-0,15 %, а посівний матеріал вирощують на середовищі з мелясою (1,0-1,5 %).

**UA 93162 U**



Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання поверхнево-активних речовин (ПАР), які можуть бути використані для очищення довкілля 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* 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 ПАР-синтезувальна здатність (кількість грам ПАР, синтезованих 1 г біомаси).

В основу корисної моделі покладено 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 (2 %, об'ємна частка), як попередник біосинтезу ПАР - мелясу. Згідно з корисною моделлю, концентрація меляси в олієвмісному середовищі становить 0,10-0,15 %, а посівний матеріал вирощують на середовищі з мелясою (1,0-1,5 %).

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає в наступному. Внесення 0,10-0,15 % меляси у середовище культивування штаму *N. vacinii* IMB B-7405 з 2 % пересмаженої соняшникової олії і використання посівного матеріалу, вирощеного на середовищі з 1,0-1,5 % меляси, дає змогу підвищити у 2,3-2,4 рази ПАР-синтезувальну здатність (до 3,1-3,2 г ПАР/г біомаси).

Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *N. vacinii* 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 % (об'ємна частка), а як попередник біосинтезу ПАР - 0,10-0,15 % меляси (масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 1,0-1,5 % 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 у 2,3-2,4 рази ПАР-синтезувальну здатність.

Приклад 1. Синтез ПАР *N. vacinii* IMB B-7405 залежно від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту.

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 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить як джерело вуглецю та енергії: пересмажену олію (0,5 %, об'ємна частка), глюкозу (0,5 %, масова частка), 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.

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. 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 N. vaccinii IMB B-7405 залежно від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання посівного матеріалу.

Таблиця 1

Вплив природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту на біосинтез ПАР N. vaccinii IMB B-7405

Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	ПАР*	$E_{24}$ , %
Пересмажена соняшникова олія	$6,0 \pm 0,30$	$58 \pm 2,9$
Глюкоза	$6,4 \pm 0,32$	$60 \pm 3,0$
Меляса	$6,7 \pm 0,33$	$60 \pm 3,0$

Наведені у табл. 1 дані свідчать, що найвища умовна концентрація ПАР (6,7) досягається за використання посівного матеріалу, вирощеного на мелясі.

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 2,0 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5-2,0 % 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 та індекс емульгування визначали як описано у прикладі 1. Як видно з наведених у табл. 2 даних, найвищі показники синтезу ПАР спостерігаються за концентрації меляси у середовищі для одержання інокуляту 1,0-1,5 %.

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*	$E_{24}$ , %
0,50	$6,0 \pm 0,30$	$57 \pm 2,8$
0,75	$6,0 \pm 0,30$	$57 \pm 2,8$
1,00	$6,7 \pm 0,33$	$60 \pm 3,0$
1,25	$6,7 \pm 0,33$	$60 \pm 3,0$
1,50	$6,8 \pm 0,33$	$61 \pm 3,0$
1,75	$5,7 \pm 0,28$	$55 \pm 2,7$
2,00	$5,7 \pm 0,28$	$55 \pm 2,7$

Приклад 3. Вплив концентрації меляси на синтез ПАР за умов росту N. vaccinii IMB B-7405 на олієвмісному середовищі

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 попередник біосинтезу ПАР у середовище вносять мелясу у концентрації 0,05-0,25 % (масова частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази

росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 1,0 % меляси. 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.

Біомасу визначають ваговим методом. Кількість синтезованих ПАР (г/л) визначають так. Культуральну рідину центрифугують (5000 g, 20 хв) для відділення біомаси. 25 мл супернаганту переносять у циліндричну ділильну 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.

ПАР-синтезувальну здатність визначають як відношення концентрації ПАР (г/л) до концентрації біомаси (г/л) і виражають у г ПАР/г біомаси.

Дані з впливу різних концентрацій меляси на синтез ПАР штамом IMB B-7405 наведено у табл. 3. Як видно з наведених даних, внесення в олієвмісне середовище 0,10-0,15 % меляси забезпечує максимальне значення як концентрації ПАР, так і ПАР-синтезу вальної здатності.

Таблиця 3

Залежність синтезу ПАР *N. vaccinii* IMB B-7405 на пересмаженій олії від концентрації меляси

Концентрація меляси (%, масова частка)	ПАР, г/л	ПАР-синтезувальна здатність, г ПАР/г біомаси
0	1,7±0,08	1,5±0,08
0,05	2,7±0,13	2,0±0,10
0,10	4,6±0,23	3,1±0,15
0,15	4,7±0,23	3,2±0,15
0,20	3,7±0,18	2,5±0,12
0,25	3,5±0,17	2,5±0,12
0,3	3,5±0,17	2,5±0,12

Приклад 4. Порівняння показників синтезу ПАР штамми *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. 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; рН 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують пересмажену соняшкову олію у концентрації 2 % (об'ємна частка). У середовище культивування штаму IMB B-7405 додатково вносять 0,15 % меляси (масова частка), а у середовище культивування штаму Ac-5017 - 0,1 % глюкози (масова частка).

Як посівний матеріал використовують штами *N. vaccinii* IMB B-7405 і *R. erythropolis* IMB Ac-5017, вирощені до середини експоненційної фази росту на середовищах наведеного вище складу, що містять 1,0 % меляси (масова частка) і 1,0 % (об'ємна частка) соняшникової олії відповідно. 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 біомаси, ПАР і ПАР-синтезувальну здатність визначають як описано у прикладі 3.

Показники синтезу ПАР штамми 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	1,35±0,07
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	4,7±0,23	3,2±0,15

- 5 Як видно з наведених у табл. 4 даних, культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 на пересмаженій соняшниковій олії з внесенням 0,15 % меляси і використанням посівного матеріалу, вирощеного на мелясі (1,0 %), дає змогу підвищити ПАР-синтезувальну здатність у 2,4 рази (до 3,2 г ПАР/г біомаси) порівняно з прототипом.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 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 соняшкову олію (2 %, об'ємна частка), як попередник біосинтезу ПАР - мелясу, який **відрізняється** тим, що концентрація меляси в олієвмісному середовищі становить 0,10-0,15 %, а посівний матеріал вирощують на середовищі з мелясою (1,0-1,5 %).

---

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

---

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