



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **94583**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 03750**

(22) Дата подання заявки: **10.04.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.11.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.11.2014, Бюл.№ 22**

(72) Винахідник(и):

**Пирог Тетяна Павлівна (UA),
Берегова Христина Андріївна (UA),
Кудря Надія Володимирівна (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, що включає культивування штаму *Nocardia* vassinii 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 94583 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. 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* IMB 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.

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

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

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування штаму *Nocardia vacsinii* IMB B-7405 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення суміш ростових субстратів. Згідно з корисною моделлю, 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 %.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає в наступному. Використання як джерела вуглецю для культивування штаму *N. vacsinii* IMB 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).

Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *N. vacsinii* IMB B-7405 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): 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, KH_2PO_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.

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

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

Культивування штаму IMB B-7405 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): 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, KH_2PO_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.

Кількість синтезованих ПАР (г/л) визначають так. Культуральну рідину центрифугують (5000 g, 20 хв) для відділення біомаси. 25 мл супернатанту 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.

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 IMB 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 IMB B-7405

Концентрація у суміші, %		ПАР, г/л	Е ₂₄ , %
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 IMB 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 A. vaccinii IMB 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 IMB B-7405 залежно
від концентрації технічного гліцерину у суміші з мелясою (1,0 %)

Концентрація технічного гліцерину, %	ПАР, г/л	E ₂₄ , %
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 IMB 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 °С 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 IMB B-7405 залежно
від концентрації меляси у суміші з технічним гліцерином (5,0 %)

Концентрація меляси, %	ПАР, г/л	E ₂₄ , %
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 IMB Ac-5017 і N. vaccinii IMB B-7405 на суміші ростових субстратів.

25 Культивування N. vaccinii IMB 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 IMB Ac-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO₃ - 1,3; MgSO₄·7H₂O-0,1; NaCl-1,0; Na₂HPO₄-0,6; KH₂PO₄-0,14; FeSO₄·7H₂O-0,001; рН 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.

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

5 Концентрацію ПАР визначають як описано у прикладі 1.

Показники синтезу ПАР штамами *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 на суміші ростових субстратів наведено у табл. 4.

Таблиця 4

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

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

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

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15

Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування штаму *Nocardia vaccinii* IMB 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 меляси масовою часткою 0,9-1,1 %.

20

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

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