



УКРАЇНА

(19) UA (11) 52821 (13) U  
(51) МПК (2009)  
C12N 1/02МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

1

2

(21) u201002789

(22) 11.03.2010

(24) 10.09.2010

(46) 10.09.2010, Бюл. № 17, 2010 р.

(72) ПИРОГ ТЕТЯНА ПАВЛІВНА, ІГНАТЕНКО  
СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ, КОНОН АНАСТАСІЯ ДМИ-  
ТРІВНА(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ  
ТЕХНОЛОГІЙ(57) Спосіб одержання поверхнево-активних речо-  
вин, що включає культивування *Rhodococcus*

*erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому мінеральному середовищі з початковою концентрацією гексадекану 0,2-0,3% і наступним дробним внесенням субстрату через 5-6 год. порціями по 0,3-0,4 % до кінцевої концентрації 2,0-2,2%, який **відрізняється** тим, що концентрацію катіонів калію у середовищі знижують до 1мМ, концентрацію катіонів натрію підвищують до 36мМ, а концентрацію розчиненого кисню підтримують на рівні 65-70% від насичення повітрям.

Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання поверхнево-активних речовин (ПАР), які можуть бути використані для очистки доквілля від нафти і 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 (12г/л) для культивування продуцента, наявність у його складі попередників синтезу ПАР і факторів росту, а також невисокий вихід ПАР від субстрату (до 48%).

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення (прототип) є спосіб одержання ПАР за допомогою *Rhodococcus erythropolis* EK-1 [Патент України на винахід №84803, МПК - C12 N 1/02, C12 R 1/38. Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Ігнатенко С.В.; Опубл. 25.11.2008, Бюл. №22], який передбачає культивування бактерій у ферментаторі на рідкому мінеральному середовищі з гексадеканом. Для інтенсифікації синтезу ПАР початкову концентрацію субстрату у середовищі знижують до 0,2-0,3% і надалі через 5-6 год здійснюють дробне внесення гексадекану порціями по 0,3-0,4% до кінцевої концентрації 2,0-2,2%.

Недоліком цього способу є висока тривалість культивування продуцента у ферментаторі АК-210 на середовищі з гексадеканом (60год).

В основу корисної моделі покладено задачу створення нового способу одержання поверхнево-активних речовин, який скорочує тривалість процесу культивування *R. erythropolis* EK-1. Штам *R. erythropolis* EK-1 депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології Національної академії наук України за номером IMB Ac-5017.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому мінеральному середовищі з початковою концентрацією гексадекану 0,2-0,3% і наступним дробним внесенням субстрату через 5-6 год порціями по 0,3-0,4% до кінцевої концентрації 2,0-2,2%. Згідно корисної моделі концентрації катіонів калію у середовищі знижують до 1мМ, концентрацію катіонів натрію підвищують до 36мМ, а концентрацію розчиненого кисню підтримують на рівні 65-70% від насичення повітрям.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Зниження до 1мМ і підвищення до 36мМ у середовищі концентрації катіонів калію і натрію відповідно, а також підтримання концентрації розчиненого кисню на рівні 65-70% від насичення повітрям дає змогу скоротити тривалість культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017.

Експериментальне доведено, що зниження до 1мМ і підвищення до 36мМ у середовищі концентрації катіонів калію і натрію відповідно, а також

(13) U  
(11) 52821  
(19) UA

підтримання концентрації розчиненого кисню на рівні 65-70% від насичення повітрям дає змогу скоротити тривалість культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 до 50год. Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  - 1,3;  $\text{NaCl}$  - 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,14;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,001г/л) pH 6,8-7,0. Як посівний матеріал використовують культуру *R. erythropolis* IMB Ac-5017 з середини експоненційної фази, вирощену на рідкому середовищі з 1,0% (об'ємна частка) гексадекану. Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму середовища. Початкова концентрація гексадекану у середовищі становить 0,2-0,3% (об'ємна частка). Надалі через 5-6год культивування здійснюють дробне внесення гексадекану порціями по 0,3-0,4% до кінцевої концентрації 2,0-2,2%.

Культивування бактерій здійснюють у ферментаторі АК-210 об'ємом 10л (робочий об'єм 7л), при 25° С, упродовж 50год. На початку процесу культивування швидкість перемішування становить 250об/хв, витрати повітря 0,2л/л хв. У процесі культивування швидкість перемішування підвищують до 380-400об/хв, а витрати повітря до 1,2л/л хв, для підтримання концентрації розчиненого кисню ( $\text{pO}_2$ ) на рівні 65-70% (від насичення повітрям).

Використання нового способу дає змогу скоротити тривалість культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 з 60 до 50год.

Приклад 1. Вплив концентрації розчиненого кисню на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на гексадекані

Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 здійснюють у ферментаторі АК-210 в умовах, описаних вище, на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $\text{KNO}_3$  - 1,0;  $\text{NaCl}$  - 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,14;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,001, pH 6,8-7,0. Концентрацію розчиненого кисню упродовж культивування підтримують на рівні 50-80%.

Синтез ПАР оцінюють за показником умовної концентрації ПАР (ПАР\*), який визначають як ступінь розведення вільної від клітин культуральної рідини у точці збільшення поверхневого натягу на кривій залежності поверхневого натягу від логарифму значення розведень. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР та виражається в безрозмірних одиницях.

Показники синтезу ПАР залежно від концентрації розчиненого кисню у середовищі культивування наведено у табл. 1.

Таким чином, за підтримання  $\text{pO}_2$  на рівні 50-80% упродовж процесу культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 умовна концентрація ПАР є практично однаковою, проте за концентрації розчиненого кисню 65-70% тривалість культивування скорочується до 55год.

Таблиця 1

Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 від концентрації розчиненого кисню

Концентрація розчиненого кисню, %	Тривалість культивування, год	ПАР*
50-60 (прототип)	60	6,3
65-70	55	6,3
75-80	60	6,2

Приклад 2. Вплив катіонів калію і натрію на активність алкангідроксилази *R. erythropolis* IMB Ac-5017

Бактерії вирощують на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/л), середовище 1:  $\text{KNO}_3$  - 1,0;  $\text{NaCl}$  - 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,14;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,001, pH 6,8-7,0. У середовищі 2 нітрат калію замінений на еквімолярну за азотом концентрацію нітрату натрію (1,3г/л). Концентрація катіонів натрію і калію у середовищі 2 становить 36 і 1мМ відповідно. Як джерело вуглецю і енергії використовують гексадекан у концентрації 1% (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48год), вирощену на середовищах наведеного вище складу з 0,3% гексадекану.

Вирощування бактерій здійснюють у колбах об'ємом 750мл зі 100мл середовища на качалці (220об/хв) при 30°С упродовж 72год.

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому середовищі з гексадеканом, обробляють гексаном для видалення залишків гексадекану, після чого відділяють клітини бактерій фільтруванням під вакуумом. Осад клітин на паперовому фільтрі послідовно (під вакуумом) промивають гексаном і 0,05 М  $\text{K}^+$  - фосфатним буфером (pH 7,0). Відмиті клітини ресуспендують у 0,05 М  $\text{K}^+$  - фосфатному буфері (pH 7,0) і руйнують ультразвуком (22кГц) 4 рази по 60 с при 4°С на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграційний центрифугують (12000g, 30хв, 4°С), осад відкидають, а надосадову рідину використовують як безклітинний екстракт. Активність алкангідроксилази (КФ 1.14.15.3) визначають спектрофотометрично за окисненням НАДФН при 340 нм з використанням гексадекану як донора електронів.

Дані щодо активності алкангідроксилази за присутності різних концентрацій калію і натрію у реакційній суміші наведено у табл. 1.

Таблиця 2

Вплив катіонів калію і натрію на активність алкангідроксилази *R. erythropolis* IMB Ac-5017

Концентрація у реакційній суміші, мМ		Активність (нмоль·хв <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> білка) за умов росту на	
K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	середовищі 1	середовищі 2
0	0	194	698
25	0	Н.в.	116
50	0	Н.в.	232
100	0	Н.в.	232
0	25	242	Н.в.
0	50	300	Н.в.
0	100	240	Н.в.

Примітка. Н.в. - не визначали.

Як видно з наведених даних, алкангідроксилазна активність знижується у 3-6 рази за присутності 25-100мМ K<sup>+</sup>, у той час як за наявності 50мМ Na<sup>+</sup> активність ферменту підвищується у 1,5 рази. За умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на середовищі 2, в якому вміст катіонів калію і натрію становить 1 і 36мМ відповідно, активність алкангідроксилази найвища.

Приклад 3. Синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на середовищах різного складу

Культивування *R. erythropolis* ЕК-1 здійснюють у ферментаторі АК-210 на середовищах 1 і 2, склад яких наведено вище. Як посівний матеріал використовують культуру *R. erythropolis* IMB Ac-

5017 з середини експоненційної фази, вирощену на рідкому середовищі 1 або 2 з 1,0% (об'ємна частка) гексадекану. Кількість посівного матеріалу становить 10% від об'єму середовища. Початкова концентрація гексадекану становить 0,2-0,3% (об'ємна частка). Надалі через 5-6год культивування здійснюють дробне внесення гексадекану порціями по 0,3-0,4% до кінцевої концентрації 2,0-2,2%. Концентрацію розчиненого кисню упродовж культивування підтримують на рівні 65-70%.

Рівень синтезу поверхнево-активних речовин під час культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на середовищах різного складу наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 від складу поживного середовища

Джерело азоту у середовищі	Тривалість культивування, год	ПАР*
KNO <sub>3</sub> (середовище 1)	55	6,3
NaNO <sub>3</sub> (середовище 2)	50	6,3

Примітка. Концентрації нітрату калію і нітрату натрію еквімолярні за азотом.

Таким чином, заміна у середовищі культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 нітрату калію на еквімолярну за азотом концентрацію нітрату натрію дає змогу скоротити тривалість процесу біосинтезу на 5год.

Отже, використання запропонованого способу дає змогу скоротити з 60 до 50год + тривалість культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 у ферментаторі АК-210.