



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **102172** (13) **C2**
(51) МПК (2013.01)
C12R 1/38 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 19/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2012 03110</p> <p>(22) Дата подання заявки: 16.03.2012</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.06.2013</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.10.2012, Бюл.№ 19</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.06.2013, Бюл.№ 11</p>	<p>(72) Винахідник(и): Пирог Тетяна Павлівна (UA), Антонюк Світлана Ігорівна (UA), Парфенюк Сергій Андрійович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Володимирська, 68, м. Київ-33, 01601 (UA)</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 40848 U, 27.04.2009 UA 53109 U, 27.09.2010 RU 2241037 C1, 27.11.2004 KR 970006157 B1, 24.04.1997 Пирог Т.П. та ін. Удосконалення біотехнології мікробного екзополісахариду етаполану на етанолі //Біотехнологія. - Т.1. - №3. - 2008. - С. 47-55 Пирог Т.П. та ін. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва //Біотехнологія. - Т.1. - №4. - 2008. С. 29-38 Волошина І.М., Пирог Т.П. Синтез мікробних поверхнево-активних речовин для очищення довкілля від нафти та нафтових забруднень// Міжнародна науково-практична конференція (МНПК) "І-ий Всеукраїнський з'їзд екологів". - 2006. - С. 1-4 <URL: http://eco.com.ua/content/mnpk-1VZE-arhiv></p>
---	---

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

(57) Реферат:

Винахід належить до біотехнологічної промисловості і стосується поверхнево-активних речовин, які можуть бути використані для очистки довкілля від нафти і нафтових забруднень, а також у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій промисловості. Заявлений спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і етанол як джерела вуглецю і енергії.

UA 102172 C2

Винахід належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР), які можуть бути використані для очищення довкілля від нафти і нафтових забруднень, а також у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій промисловості.

5 Відомий спосіб одержання метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями за допомогою штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 [Пат. 10467 UA, МПК С 21 N 1/02. Штам *Pseudomonas* sp. SP-17 - продуцент лозаклітинних 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 попередників синтезу і факторів росту, а також невисокий вихід цільового продукту від субстрату (до 48 %).

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення (прототип) є спосіб одержання ПАР за допомогою *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 [Пат. 53109 UA, МПК - С 21 R 1/38. Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Антонюк С.І., Щербина О.В. Опубл. 27.09.2010, Бюл. 18].

Недоліком цього способу є недостатньо висока ПАР-синтезувальна здатність (кількість грам ПАР, синтезованих 1 г біомаси).

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

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і 2 % етанолу як джерела вуглецю і енергії. Згідно з винаходом, починаючи з 20-24 год. культивування, рН підтримують на рівні 6,0-7,0 періодичним (1-2 рази на добу) підключенням культуральної рідини розчином КОН.

25 Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Підтримання рН на рівні 6,0-7,0 з 20-24 год. культивування періодичним (1-2 рази на добу) підключенням культуральної рідини розчином КОН дає змогу підвищити ПАР-синтезувальну здатність у 1,8-1,9 разів (до 2,5-2,6 г ПАР/г біомаси).

30 Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ -0,35; NaCl-1,0; Na_2HPO_4 -0,6; KH_2PO_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, рН середовища 6,8-7,0. Як джерело вуглецю і енергії використовують етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру *A. calcoaceticus* IMB B-7241 із експоненційної фази (48 год. росту), вирощену на рідкому середовищі наведеного вище складу з 1,0 % (об'ємна частка) етанолу. Кількість посівного матеріалу становить 5 % від об'єму середовища. Культивування здійснюють у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об./хв) при 30 °С упродовж 120 год. Починаючи з 20-24 год. культивування здійснюють періодичне (1-2 рази на добу) підключення культуральної рідини 1 н розчином КОН до рН 6,0-7,0.

Використання нового способу дає змогу підвищити ПАР-синтезувальну здатність у 1,8-1,9 разу (до 2,5-2,6 г ПАР/г біомаси).

Приклад 1. Ріст *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і синтез ПАР за різних значень рН.

45 Культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ -0,35; NaCl-1,0; Na_2HPO_4 -0,6; KH_2PO_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. Як джерело вуглецю і енергії використовують етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру *A. calcoaceticus* IMB B-7241 із експоненційної фази (48 год. росту), вирощену на рідкому середовищі наведеного вище складу з 1,0 % (об'ємна частка) етанолу. Кількість посівного матеріалу становить 5 % від об'єму середовища.

50 Для доведення початкового значення рН середовища до 5,0; 6,0; 7,0; і 8,0 використовують 1 н HCl і 1 н NaOH. У процесі культивування, починаючи з 20-24 год., рН культуральної рідини підтримують на заданому рівні підключенням 1 н NaOH.

55 Культивування здійснюють у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об./хв) при 30 °С упродовж 120 год.

Біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за калібрувальним графіком.

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

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

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.

Показники росту і синтезу ПАР залежно від рН наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Вплив рН на синтез ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на етанолі

рН	ПАР, г/л	г ПАР/ г біомаси	E_{24} , %
Без регуляції рН (прототип)	1,7±0,08	1,4±0,08	60±3,0
5,0	2,0±0,11	1,6±0,08	66±3,3
6,0	2,3±0,12	1,9±0,10	61±3,0
7,0	2,5±0,13	1,9±0,10	63±3,2
8,0	1,8±0,09	1,5±0,08	62±3,1

Як видно з наведених у табл. 1 даних, у разі підтримання рН на рівні 6,0-7,0 індекс емульгування практично не змінюється, а концентрація синтезованих ПАР і ПАР-синтезувальна здатність підвищуються в 1,3-1,4 рази і порівняно з показниками процесу згідно з прототипом (без регуляції рН).

Приклад 2. Вплив природи титрувального агента на синтез ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ -0,35; NaCl-1,0; Na_2HPO_4 -0,6; KH_2PO_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. Як джерело вуглецю і енергії використовують етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру *A. calcoaceticus* IMB B-7241 із експоненційної фази (48 год. росту), вирощену на рідкому середовищі наведеного вище складу з 1,0 % (об'ємна частка) етанолу. Кількість посівного матеріалу становить 5 % від об'єму середовища.

Для доведення початкового значення рН середовища до 6,0 і 7,0 використовують 1 н NaOH і 1 н КОН. У процесі культивування, починаючи з 20-24 год., рН культуральної рідини підтримують на заданому рівні підключенням 1 н NaOH і 1 н КОН.

Культивування здійснюють у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 120 год.

Визначення показників синтезу ПАР здійснюють як описано у прикладі 1.

Дані щодо впливу природи титрувального агента на синтез ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Синтез ПАРА calcoaceticus IMB B-7241 залежно від природи титрувального агента

pH	Титрувальний агент	ПАР, г/л	г ПАР/ г біомаси	E ₂₄ , %
Без регуляції pH (прототип)	-	1,7±0,08	1,4±0,08	60±3,0
6,0	KOH	3,0±0,15	2,5±0,12	64±3,2
	NaOH	2,3±0,12	1,9±0,10	61±3,0
7,0	KOH	3,1±0,15	2,6±0,13	68±3,4
	NaOH	2,5±0,13	1,9±0,10	63±3,2

Дані, наведені у табл. 2, свідчать, що заміна NaOH як титрувального агента на KOH супроводжується підвищенням показників ПАР: концентрація синтезованих ПАР і ПАР-синтезувальна здатність підвищуються в 1,3-1,4 разу порівняно з використанням для підлучення розчину їдкого натру. Ми припускаємо, що зниження показників синтезу ПАР у разі використання для регуляції pH розчину їдкого натру може бути зумовлене інгібуючим впливом катіонів натрію на активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних речовин у штаму IMB B-7241.

Приклад 3. Вплив катіонів натрію на активність ферментів біосинтезу ПАР A. calcoaceticus IMB B-7241

Культивування A. calcoaceticus IMB B-7241 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): (NH₂)₂CO-0,35; NaCl-1,0; Na₂HPO₄-0,6; KH₂PO₄-0,14; MgSO₄×7H₂O-0,1; FeSO₄×7H₂O-0,001. Як джерело вуглецю і енергії використовують етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру A. calcoaceticus IMB B-7241 із експоненційної фази (48 год. росту), вирощену на рідкому середовищі наведеного вище складу з 1,0 % (об'ємна частка) етанолу. Кількість посівного матеріалу становить 5 % від об'єму середовища. Культивування здійснюють у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °C упродовж 48 год. Упродовж культивування штаму IMB B-7241 pH не регулюють.

Для одержання безклітинних екстрактів культуральну рідину, одержану після культивування A. calcoaceticus IMB B-7241 на рідкому середовищі з етанолом, центрифугують (5000 g, 20 хв, 4 °C). Отриманий осад клітин двічі відмивають від залишків середовища 0,05 M K⁺-фосфатним буфером (pH 7,0), центрифугуючи (4000 g, 15 хв 4 °C). Відмиті клітини ресуспендують в 0,05 M K⁺-фосфатному буфері (pH 7,0) і руйнують ультразвуком (22 кГц) 3 рази по 40 с при 4 °C на апараті УЗДН-1. Одержаний дезінтеграт центрифугують (12000 g, 30 хв, 4 °C), осад відкидають, а надосадову рідину використовують як безклітинний екстракт.

Активність НАДФ⁺-залежної глутаматдегідрогенази (КФ 1.4.1.2) визначають за відновленням НАДФ⁺ при 340 нм за присутності ізоцитрату і 2-оксоглутарату відповідно, фосфоенолпіруват(ФЕП)синтетази (систематична назва ферменту - піруват, вода, дикіназа; КФ 2.7.9.2) - за швидкістю утворення пірувату, яку аналізують за окисненням НАДН при 340 нм у спряженій реакції з лактатдегідрогеназою, ФЕП-карбоксикінази (КФ 4.1.1.49) - за швидкістю утворення малату з оксалоацетату, яку визначають за окисненням НАДН при 340 нм у спряженій реакції з малатдегідрогеназою. Концентрація натрію у реакційній суміші становить 25, 50 і 100 мМ. Катіони вносять у реакційну суміш у вигляді 20 %-ного розчину NaCl.

Дані щодо впливу катіонів натрію на активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних аміно- (НАДФ⁺-залежна глутаматдегідрогеназа) і гліколіпідів (ФЕП-синтетаза і ФЕП-карбоксикіназа) наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Активність ферментів біосинтезу
ПАР A. calcoaceticus IMB B-7241 залежно від концентрації катіонів натрію

Концентрація Na ⁺ у реакційній суміші, мМ	Активність (нмоль хв ⁻¹ мг ⁻¹ білка), % від контролю		
	ФЕП-синтетаза	ФЕП-карбоксикіназа	НАДФ ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа
25	72±4	55±3	20±1
50	55±3	95±5	20±1

5 Як видно з даних, наведених у табл. 3, за наявності катіонів натрію спостерігається інгібування активності ферментів біосинтезу у *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на 30-80 %, що і є причиною нижчих показників синтезу ПАР у разі використання їдкого натру як титрувального агента порівняно із застосуванням КОН.

Отже, підтримання рН на рівні 6,0-7,0 з 20-24 год. культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 періодичним (1-2 рази на добу) підлученням культуральної рідини розчином КОН дає змогу підвищити ПАР-синтезувальну здатність у 1,8-1,9 разу (до 2,5-2,6 г ПАР/г біомаси).

10 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

15 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і 2 % етанолу як джерела вуглецю і енергії, який **відрізняється** тим, що починаючи з 20-24 год. культивування, рН підтримують на рівні 6,0-7,0 періодичним (1-2 рази на добу) підлученням культуральної рідини розчином КОН.

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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