



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109071** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)
C12N 1/00
C12N 1/20 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 02237	(72) Винахідник(и):	Пирог Тетяна Павлівна (UA), Шулякова Марія Олександрівна (UA), Софілканич Анна Павлівна (UA), Савенко Інга Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	05.03.2014	(73) Власник(и):	НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Володимирська, 68, м. Київ, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.07.2015	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Пирог Т.П. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва / Т.П. Пирог, С.В. Ігнатенко // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1. - №4. – С. 29-38 Пирог Т. П. Глицерин как субстрат для синтеза поверхностно-активных веществ Acinetobacter Calcoaceticus ИМВ В-7241 и Rhodococcus Erythropolis ИМВ Ас-5017 / Т. П. Пирог, Т. А. Шевчук, М. А. Шулякова, Г. А. Иутинская, А. Д. Конон // Микробиологический журнал. - 2012. - Т. 74. - № 1. - С. 20-27 (ULR: http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/bitstream/123456789/2613/1/Konon_7.pdf) UA 44144 U, 25.09.2009 UA 73796 U, 10.10.2012 Карасева Э.В. Нефтеокисляющий штамм Rhodococcus Erythropolis В2 как основа создания биопрепарата для ликвидации углеводородных загрязнений и рекультивации земель / Э.В. Карасева, Н.Н. Волченко, А.А. Худокормов // Научный журнал КубГАУ. – 2012. - №83(09) UA 10467 A, 25.12.1996
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.12.2014, Бюл.№ 24		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.07.2015, Бюл.№ 13		

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНОЇ РЕЧОВИНИ

(57) Реферат:

Винахід належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання поверхнево-активної речовини, яка може бути використаною для очистки довкілля від нафти і нафтових забруднень, а також у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій промисловості. Спосіб одержання поверхнево-активної речовини включає культивування *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 при рН 8,0 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело азоту нітрат натрію, як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин, з внесенням у кінці експоненційної фази росту 0,2 % фумарату. Згідно винаходу концентрація нітрату натрію становить 2,3-2,5 г/л, причому після внесення фумарату рН не регулюють.

UA 109071 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 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 (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. 73796 UA, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Шулякова М.О. Опубл. 10.12.2012, Бюл. № 19], який передбачає культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецю та енергії гліцеринову фракцію (відхід виробництва біодизелю) у концентрації 1,9-2,1 % (об'ємна частка).

Недоліком цього способу є недостатньо висока концентрація синтезованих поверхнево-активних речовин, а також недостатньо висока концентрація технічного гліцерину у середовищі, який є відходом виробництва біодизелю.

Враховуючи об'єми виробництва біодизелю у світі - понад 11 млн т у 2008 році з щорічним наступним збільшенням на 8-10 % [Appl. Biochem. Biotechnol. 2012. 166, N 3. P. 680-699], а також кількість утворюваного як побічного продукту технічного гліцерину - 10 % від одержуваного біодизелю [Appl. Biochem. Biotechnol. 2013. 169, N 1. P. 110-122], стає зрозумілим, що для ефективного використання такого відходу як субстрату у біотехнологічних процесах його вміст у середовищі культивування продуцентів практично важливих метаболітів повинен бути якомога вищим.

В основу винаходу покладено задачу створення нового способу одержання поверхнево-активних речовин, який підвищує концентрацію синтезованих ПАР і вміст технічного гліцерину у середовищі культивування.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 при рН 8,0 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело азоту нітрат натрію, як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин, з внесенням у кінці експоненційної фази росту 0,2 % фумарату. Згідно винаходу концентрація нітрату натрію становить 2,3-2,5 г/л, а після внесення фумарату рН не регулюють.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Підвищення у середовищі культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 концентрації нітрату натрію до 2,3-2,5 г/л і припинення регуляції рН після внесення фумарату дає змогу підвищити у 5,9-6,1 раз концентрацію синтезованих ПАР (до 5,9-6,1 г/л) і вміст технічного гліцерину до 7-9 % (об'ємна частка).

Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 -2,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1; NaCl -1,0; Na_2HPO_4 -0,6; KH_2PO_4 -0,14; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,001; рН 7,8-8,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують технічний гліцерин (побічний продукт виробництва біодизелю) у концентрації 8 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5 % технічного гліцерину (об'ємна частка). Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища. Упродовж культивування здійснюють періодичне підключення культуральної рідини до рН 8,0 розчином їдкою натру. У кінці експоненційної фази росту (72 год.) у середовище вносять 0,2 % фумарату (масова частка) у вигляді 10 %-ного розчину фумарату натрію. Після внесення фумарату регуляцію рН припиняють.

Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 28 °С упродовж 168 год.

Використання нового способу дає змогу підвищити у 5,9-6,1 раз концентрацію синтезованих ПАР (до 5,9-6,1 г/л) і вміст технічного гліцерину до 7-9 % (об'ємна частка).

Приклад 1. Вплив рН на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на технічному гліцерині

Культивування штаму IMB Ac-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 -1,3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,1; NaCl -1,0; Na_2HPO_4 -0,6; KH_2PO_4 -0,14; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -

0,001. Початкове рН середовища 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують технічний гліцерин 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 0,5 % технічного гліцерину (об'ємна частка). Кількість інокуляту - 5 % від об'єму середовища. Упродовж культивування здійснюють періодичне підключення культуральної рідини до рН 7,0-8,5 розчином їдкого натру. Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 28 °С упродовж 168 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 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.

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 штамом ІМВ Ас-5017 залежно від рН середовища.

Таблиця 1

Вплив рН на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на технічному гліцерині

рН упродовж культивування	ПАР, г/л	E_{24} , %
Без регуляції рН (прототип)	1,0±0,05	55±2,7
7,0	1,4±0,07	58±2,9
7,5	1,8±0,09	68±3,4
8,0	2,0±0,10	70±3,5
8,5	1,6±0,08	68±3,4

Наведені у табл. 1 дані свідчать, що за підтримання рН на рівні 8,0 упродовж культивування штаму ІМВ Ас-5017 на середовищі з технічним гліцерином концентрація синтезованих ПАР та індекс емульгування досягають максимальних значень (2,0 г/л і 70 % відповідно).

Приклад 2. Вплив рН і фумарату на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на технічному гліцерині

Культивування штаму ІМВ Ас-5017 здійснюють в умовах, наведених у прикладі 1. Як джерело вуглецю та енергії використовують технічний гліцерин у концентрації 2-6 % (об'ємна частка). В одному з варіантів упродовж культивування здійснюють періодичне підключення культуральної рідини до рН 8,0 розчином їдкого натру. У кінці експоненційної фази росту (72 год.) у середовище вносять 0,2 % фумарату (масова частка) у вигляді 10 %-ного розчину фумарату натрію. Після внесення фумарату регуляцію рН припиняють. Концентрацію синтезованих ПАР аналізують як описано у прикладі 1. Дані про синтез ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на технічному гліцерині за присутності фумарату наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Вплив фумарату на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на технічному гліцерині

Концентрація гліцерину, %	pH упродовж культивування	ПАР, г/л
2	Без регуляції	1,0±0,05
	8,0	3,0±0,15
4	Без регуляції	2,4±0,12
	8,0	4,0±0,20
6	Без регуляції	3,8±0,19
	8,0	4,9±0,24

Отже, підвищення концентрації технічного гліцерину у середовищі до 4 і 6 %, наявність фумарату, підтримання pH на рівні 8,0 до внесення органічної кислоти супроводжувалися збільшенням синтезу ПАР до 4,0-4,9 г/л.

Приклад 3. Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 від концентрації нітрату натрію у середовищі з технічним гліцерином

Культивування штаму IMB Ac-5017 здійснюють в умовах, наведених у прикладі 1. Концентрація нітрату натрію у середовищі становить 2,1-2,7 г/л, технічного гліцерину - 6 і 7 %. Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 28 °C упродовж 168 год.

Концентрацію синтезованих ПАР визначають як описано у прикладі 1.

Показники синтезу ПАР залежно від концентрації джерела азоту наведено у табл. 3.

Отже, підвищення концентрації джерела азотного живлення до 2,3-2,5 г/л у середовищі з 6 і 7 % технічного гліцерину супроводжується збільшенням концентрації синтезованих ПАР на 40-60 % порівняно з показниками на базовому середовищі з 1,3 г/л нітрату натрію.

Приклад 4. Вплив pH і фумарату на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на середовищі з технічним гліцерином і підвищеним вмістом нітрату натрію

Культивування штаму IMB Ac-5017 здійснюють в умовах, наведених у прикладі 1. Як джерело вуглецю та енергії використовують технічний гліцерин у концентрації 6-10 % (об'ємна частка). Концентрація нітрату натрію у середовищі становить 2,5 г/л. Упродовж культивування здійснюють періодичне підлучення культуральної рідини до pH 8,0 розчином їдкою натру. У кінці експоненційної фази росту (72 год.) у середовище вносять 0,2 % фумарату (масова частка) у вигляді 10 %-ного розчину фумарату натрію. Після внесення фумарату регуляцію pH припиняють.

Таблиця 3

Вплив концентрації нітрату натрію на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на середовищі з технічним гліцерином

Концентрація гліцерину, %	Концентрація нітрату натрію, г/л	ПАР (г/л), % від контролю
6	2,1	130
	2,3	140
	2,4	140
	2,5	145
	2,6	130
	2,7	125
7	2,1	135
	2,3	145
	2,4	150
	2,5	160
	2,6	135
	2,7	130

Примітка. Контроль (100 %) - концентрація ПАР на середовищі з 1,3 г/л нітрату натрію.

Концентрацію синтезованих ПАР аналізують як описано у прикладі 1. Як видно з наведених у табл. 4 даних, підвищення концентрації джерела азоту (нітрату натрію) до 2,5 г/л, підтримання рН на рівні 8,0 до внесення фумарату дали змогу суттєво підвищити концентрацію синтезованих ПАР.

5

Таблиця 4

Синтез ПАР R. erythropolis IMB Ac-5017 на середовищі з підвищеною концентрацією технічного гліцерину і нітрату натрію за присутності фумарату

Концентрація гліцерину, %	Фумарат, %	ПАР, г/л
6	0	2,9±0,14
	0,2	4,9±0,24
7	0	3,0±0,15
	0,2	6,0±0,30
8	0	3,4±0,17
	0,2	6,1±0,30
9	0	2,8±0,14
	0,2	5,9±0,29
10	0	2,0±0,10
	0,2	3,8±0,19

Отже, використання запропонованого способу дає змогу порівняно з прототипом підвищити у 5,9-6,1 разів (до 5,9-6,1 г/л) концентрацію синтезованих R. erythropolis IMB Ac-5017 поверхнево-активних речовин і вміст технічного гліцерину у середовищі культивування штаму IMB Ac-5017 з 2 до 7-9 % (об'ємна частка).

10

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017 при рН 8,0 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело азоту нітрат натрію, як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин, з внесенням у кінці експоненційної фази росту 0,2 % фумарату, який **відрізняється** тим, що концентрація нітрату натрію становить 2,3-2,5 г/л, а після внесення фумарату рН не регулюють.

15

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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