



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **93158**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 02235**

(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),
Конон Анастасія Дмитрівна (UA),
Савенко Інга 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 включає культивування штаму *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення пересмажену соняшникову олію. При цьому використовують 6-8 % посівного матеріалу, вирощеного на середовищі з глюкозою.

UA 93158 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 запропонованої корисної моделі (найближчий аналог) 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 поставлено 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 *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення пересмажену соняшникову олію (2 %, об'ємна частка). Згідно з корисною моделлю використовують 6-8 % посівного матеріалу, вирощеного на середовищі з глюкозою (0,8-1,0 %, масова частка).

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Використання 6-8 % посівного матеріалу, вирощеного на середовищі з глюкозою (0,8-1,0 %, масова частка), 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 *A. calcoaceticus* IMB B-7241 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ - 0,35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1, NaCl - 1,0, Na_2HPO_4 - 0,6, KH_2PO_4 - 0,14, pH 6,8-7,0. У середовище додатково вносять $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,16 мкмоль/л) та $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3,6 мкмоль/л) у вигляді розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ концентрацією 4 мг/100 мл і 1 % розчину $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ відповідно. 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 з 0,8-1,0 % глюкози (масова частка). Кількість інокуляту - 6-8 % 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 *A. calcoaceticus* IMB B-7241 залежно від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту.

Культивування штаму IMB B-7241 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ - 0,35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1, NaCl - 1,0, Na_2HPO_4 - 0,6, KH_2PO_4 - 0,14, pH 6,8-7,0. У середовище додатково вносять $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,16 мкмоль/л) та $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3,6 мкмоль/л) у вигляді розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ концентрацією 4 мг/100 мл і 1 % розчину $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ відповідно. 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, етанол, гексадекан (1,0 %, об'ємна частка), глюкозу, 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 (σ_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 σ_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.

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 *A. calcoaceticus* IMB B-7241 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 *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту	ПАР*	E_{24} , %
Пересмажена соняшникова олія	$6,1 \pm 0,30$	$68 \pm 3,4$
Етанол	$3,2 \pm 0,16$	$58 \pm 2,9$
Гексадекан	$2,1 \pm 0,11$	$55 \pm 2,7$
Глюкоза	$6,7 \pm 0,33$	$70 \pm 3,5$
Меляса	$6,4 \pm 0,32$	$70 \pm 3,5$

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

Приклад 2. Залежність синтезу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на пересмаженій соняшниковій олії від концентрації глюкози 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 0,5-1,8 % глюкози (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 глюкози у середовищі для одержання інокуляту 0,8-1,0 %.

Таблиця 2

Вплив концентрації глюкози у середовищі
для одержання інокуляту на біосинтез ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241

Концентрація глюкози у середовищі для одержання інокуляту (% масова частка)	ПАР*	E_{24} , %
0,5	$6,0 \pm 0,30$	$67 \pm 3,3$
0,8	$6,7 \pm 0,33$	$70 \pm 3,5$
0,9	$6,7 \pm 0,33$	$70 \pm 3,5$
1,0	$6,7 \pm 0,33$	$70 \pm 3,5$
1,3	$5,7 \pm 0,28$	$60 \pm 3,0$
1,5	$5,3 \pm 0,26$	$61 \pm 3,0$
1,8	$5,0 \pm 0,25$	$61 \pm 3,0$

Приклад 3. Вплив концентрації інокуляту на синтез ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 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 посівний матеріал використовують культуру з експоненційної фази росту (48 год.), вирощену на середовищі наведеного складу з 0,9 % глюкози. Кількість інокуляту - 5-12 % 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.

Біомасу визначають ваговим методом. Кількість синтезованих ПАР (г/л) визначають так. Культуральну рідину центрифугують (5000 g, 20 хв) для відділення біомаси. 25 мл супернатанту переносять у циліндричну ділильну 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 HCl 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 HCl 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 інокуляту на синтез ПАР штамом IMB IMB B-7241 наведено у табл. 3. Як видно з наведених даних, використання 6-8 % інокуляту, вирощеного на глюкозі, забезпечує максимальне значення як концентрації ПАР, так і ПАР-синтезувальної здатності.

Таблиця 3

Залежність синтезу ПАР
A. calcoaceticus IMB B-7241 на пересмаженій олії від концентрації меляси

Концентрація інокуляту (% , об'ємна частка)	ПАР, г/л	ПАР-синтезувальна здатність, г ПАР/г біомаси
5	1,7±0,08	2,0±0,10
6	2,2±0,11	3,1±0,15
7	2,3±0,12	3,2±0,15
8	2,3±0,12	3,1±0,15
9	1,8±0,09	2,5±0,12
10	1,8±0,09	2,2±0,11
11	1,8±0,09	2,2±0,11
12	1,7±0,08	2,0±0,10

Приклад 4. Порівняння показників синтезу ПАР штамми *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на пересмаженій соняшниковій олії.

Культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 здійснюють на середовищі, наведеному у прикладі 1. 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; pH 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують пересмажену соняшкову олію у концентрації 2 % (об'ємна частка). У середовище культивування штаму IMB Ac-5017 додатково вносять 0,1 % глюкози (масова частка).

Як посівний матеріал використовують штами *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і *R. erythropolis* IMB Ac-5017, вирощені до середини експоненційної фази росту на середовищах наведеного вище складу, що містять 0,9 % (масова частка) глюкози і 1,0 % (об'ємна частка) соняшникової олії відповідно. Кількість інокуляту - 5 % і 7 % від об'єму середовища для штамів IMB Ac-5017 та IMB B-7241 відповідно. Культивування бактерій здійснюють в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об./хв) при 28 °C упродовж 120 год.

Концентрацію біомаси, ПАР і ПАР-синтезувальну здатність визначають як описано у прикладі 3.

Показники синтезу ПАР штамми IMB B-7241 і Ac-5017 наведено у табл. 4.

Таблиця 4

Синтез ПАР за умов росту
A. calcoaceticus IMB B-7241 і R. erythropolis IMB Ac-5017 на пересмаженій соняшниковій олії

Штам	ПАР, г/л	ПАР-синтезувальна здатність, г ПАР/г біомаси
R. erythropolis TMB Ac-5017 (найближчий аналог)	5,1±0,25	1,3±0,07
A. calcoaceticus IMB B-7241	2,3±0,12	3,2±0,15

5

Як видно з наведених у табл. 4 даних, культивування A. calcoaceticus IMB B-7241 на пересмаженій соняшниковій олії з використанням 7 % посівного матеріалу, вирощеного на глюкозі (0,9 %), дає змогу підвищити ПАР-синтезувальну здатність у 2,4 разу (до 3,2 г ПАР/ г біомаси) порівняно з найближчим аналогом.

10

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, що включає культивування штаму Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і як джерело вуглецевого живлення пересмажену соняшникову олію, який **відрізняється** тим, що використовують 6-8 % посівного матеріалу, вирощеного на середовищі з глюкозою (0,8-1,0 %).

15

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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