



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94546** (13) **U**
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 02867	(72) Винахідник(и): Пирог Тетяна Павлівна (UA), Шулякова Марія Олександрівна (UA), Антонюк Світлана Ігорівна (UA), Антонюк Ніна Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 21.03.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.11.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.11.2014, Бюл.№ 22	(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 *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело азоту сечовину, як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин, сульфату міді 0,16 мкмоль/л і сульфату цинку 38 мкмоль/л. Концентрація сечовини становить 0,7-0,9 г/л.

UA 94546 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 промисловостях.

Відомий спосіб одержання ПАР за допомогою штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 [Патент UA № 10467, 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 аналогом є спосіб одержання ПАР за допомогою *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 [Патент UA № 73796, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин /Пирог Т.П., Шулякова М.О. Опубл. 10.12.2012, Бюл. № 19], який передбачає культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 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 корисної моделі поставлено 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 *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело азоту сечовину, як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин, 0,16 мкмоль/л сульфату міді і 38 мкмоль/л сульфату цинку. Згідно з корисною моделлю концентрація сечовини становить 0,7-0,9 г/л.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Підвищення у середовищі культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 концентрації сечовини до 0,7-0,9 г/л дає змогу підвищити у 5,9-6,1 разів концентрацію синтезованих ПАР (до 5,9-6,1 г/л) і вміст технічного гліцерину до 6-8 % (об'ємна частка). Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ - 0,8, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1, NaCl - 1,0, Na_2HPO_4 - 0,6, KH_2PO_4 - 0,14, pH 6,8-7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовують технічний гліцерин (побічний продукт виробництва біодизелю) у концентрації 7 % (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.

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 5,9-6,1 раз концентрацію синтезованих ПАР (до 5,9-6,1 г/л) і вміст технічного гліцерину до 6-8 % (об'ємна частка).

Приклад 1. Вплив катіонів міді і цинку на синтез ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на технічному гліцерині.

Культивування штаму IMB Ac-5017 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, дріжджовий автолізат - 0,5 % (об'ємна частка), розчин мікроелементів, pH 6,8-7,0. Розчин мікроелементів містить такі солі (г/100 мл): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 1,1; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0,6; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,004; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,03; H_3BO_3 - 0,006; KI - 0,0001; ЕДТА (Трилон Б) - 0,5. В одному з варіантів у середовище замість дріжджового автолізату і мікроелементів вносять (у різних комбінаціях) сульфат цинку і сульфат міді в концентрації 38 і 0,16 мкмоль/л відповідно, а також хлорид калію (0,21 ммоль/л).

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

У табл. 1 наведено дані про синтез ПАР штамом ІМВ В-7241 залежно від наявності дріжджового автолізу та мікроелементів у середовищі.

Таблиця 1

Вплив дріжджового автолізу та мікроелементів на синтез ПАР за умов росту
A. calcoaceticus ІМВ В-7251 на технічному гліцерині

Наявність у середовищі культивування					ПАР, г/л
мікроелементів	дріжджового автолізу	сульфату цинку	сульфату міді	хлориду калію	
-	-	-	-	-	1,0±0,05 (прототип)
+	+	-	-	-	4,5±0,22
-	-	+	+	+	4,7±0,24
-	-	+	+	-	5,2±0,26

Наведені у табл. 1 дані свідчать, що за наявності сульфату міді і цинку у середовищі з технічним гліцерином концентрація синтезованих ПАР досягають максимального значення (5,2 г/л), що більш ніж у 5 разів вище, ніж згідно прототипу. Ці дані узгоджуються з одержаними раніше про те, що внесення у середовище з очищеним гліцерином сульфату міді (0,15-0,17 мкмоль/л), сульфату цинку (37-39 мкмоль/л) і хлориду калію (0,20-0,22 ммоль/л) дає змогу підвищити ПАР-синтезувальну здатність A. Calcoaceticus ІМВ В-7241 у 2,1-2,2 рази (до 2,9-3,0 г ПАР/г біомаси) [Пат. 81801 UA, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Конон А.Д., Парфенюк С.А. Опубл. 10.07.2013, Бюл. № 13].

Приклад 2. Залежність синтезу ПАР від концентрації технічного гліцерину у середовищі культивування A. calcoaceticus ІМВ В-7241

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). У середовище вносять сульфат цинку і сульфат міді в концентрації 38 і 0,16 мкмоль/л відповідно. Тривалість культивування 120 і 168 год. Концентрацію синтезованих ПАР аналізують як описано у прикладі 1.

Дані про синтез ПАР A. calcoaceticus ІМВ В-7241 на середовищі з різними концентраціями технічного гліцерину наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Вплив концентрації технічного гліцерину у середовищі культивування *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 на синтез ПАР

Концентрація гліцерину у середовищі, %	Тривалість культивування, год.	
	120	168
2	5,2±0,26	5,2±0,26
3	5,2±0,26	5,2±0,26
4	5,0±0,25	5,2±0,26
5	4,0±0,20	4,2±0,21
6	3,9±0,19	4,0±0,20

Отже, підвищення концентрації технічного гліцерину у середовищі до 6 % супроводжується зниженням синтезу ПАР, причому збільшення тривалості культивування продуцента не приводить до підвищення концентрації синтезованих ПАР.

Приклад 3. Залежність синтезу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 від концентрації сечовини у середовищі з технічним гліцериним

Культивування штаму IMB Ac-5017 здійснюють у умовах, наведених у прикладі 1. Концентрація сечовини у середовищі становить 0,6-1,0 г/л, технічного гліцерину - 6-8 %. У середовище вносять сульфат цинку і сульфат міді в концентрації 38 і 0,16 мкмоль/л відповідно. Концентрація синтезованих ПАР визначають як описано у прикладі 1.

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

Таблиця 3

Вплив концентрації азоту на синтез ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на технічному гліцерині

Концентрація гліцерину, %	Концентрація сечовини, г/л	ПАР, г/л
6	0,6	5,3±0,26
	0,7	5,9±0,29
	0,8	6,1±0,30
	0,9	6,1±0,30
	1,0	5,0±0,25
7	0,6	5,0±0,25
	0,7	6,0±0,30
	0,8	6,1±0,30
	0,9	5,9±0,29
	1,0	5,3±0,26
8	0,6	4,9±0,24
	0,7	6,0±0,30
	0,8	6,0±0,30
	0,9	6,0±0,30
	1,0	5,0±0,25

Наведені у табл. 3 дані свідчать, що за концентрації сечовини 0,7-0,9 г/л у середовищі з 6-8 % технічного гліцерину концентрація синтезованих ПАР становить 5,9-6,1 г/л.

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 *A. calcoaceticus* IMB B-7241 поверхнево-активних речовин і вміст технічного гліцерину у середовищі культивування штаму IMB Ac-5017 з 2 до 6-8 % (об'ємна частка).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, як джерело азоту сечовину, як джерело вуглецевого живлення технічний гліцерин, 0,16 мкмоль/л сульфату міді і 38 мкмоль/л сульфату цинку, який **відрізняється** тим, що концентрація сечовини становить 0,7-0,9 г/л.