



УКРАЇНА

(19) UA (11) 95380 (13) C2

(51) МПК

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/26 (2006.01)

C12P 1/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЕМУЛЬГАТОРА

1

(21) а201002793

(22) 11.03.2010

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл. № 14, 2011 р.

(72) ПИРОГ ТЕТЯНА ПАВЛІВНА, ТАРАСЕНКО
ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ, КОНОН АНАСТАСІЯ
ДМИТРІВНА(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ
ТЕХНОЛОГІЙ

(56) UA U 44244, 25.09.2009

UA A 10467, 25.12.1996

UA C2 92819, 10.12.2010

UA C2 77345, 15.11.2006

Волошина І. М., Пирог Т. П. Синтез мікробних по-
верхнево-активних речовин для очищення довкіл-
ля від нафти та нафтових забруднень. Міжнарод-
на науково-практична конференція "Перший
Всеукраїнський з'їзд екологів" Збірник матеріалів,
2006Пирог Т.П. та ін. Синтез поверхнево-активних ре-
човин у різних умовах культивування штаму
Rhodococcus erythropolis ЭК-1 // Збірник тез всеук-
раїнської науково-практичної конференції "Біотех-
нологія. Освіта. Наука". - Львів, 6-7 жовтня 2004

2

Пирог Т. П., Шевчук Т. А. Образование поверхнос-
тно-активных веществ при росте штамма
Rhodococcus erythropolis ЭК-1 на гидрофильных и
гидрофобных субстратах // Прикладная биохимия
и микробиология 2004, Т. 40, № 5, С. 544-550Волошина І.М. Розробка технології синтезу повер-
хнево-активних речовин нафтоокиснювальними
бактеріями: Автореферат дисертації на здобуття
наукового ступеня кандидата технічних наук. Київ
2008.(57) Спосіб одержання метаболітів з поверхнево-
активними і емульгувальними властивостями, де
Rhodococcus erythropolis IMB Ac-5017 культивують
на рідкому середовищі, що містить мінеральні со-
лі, як джерело вуглецю і енергії - етанол у концен-
трації 2 % при рН 6,8-7,0, а також вносять у сере-
довище на початку стаціонарної фази росту
продуцента цитрат натрію, який **відрізняється**
тим, що концентрація цитрату натрію становить
0,085-0,095 %, а вміст мінеральних солей стано-
вить: KNO₃ - 1,0; NaCl - 1,0; Na₂HPO₄ - 0,6; KH₂PO₄
- 0,14; MgSO₄ x 7H₂O - 0,1; FeSO₄ x 7H₂O - 0,001.Винахід належить до біотехнологічної промис-
ловості і стосується одержання мікробних метаболі-
тів з емульгувальними властивостями (емульга-
торів), які можуть бути використані для очистки
довкілля від нафти і нафтових забруднень, а та-
кож у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній,
харчовій промисловостях.Відомий спосіб одержання метаболітів з пове-
рхнево-активними і емульгувальними властивос-
тями за допомогою штаму Pseudomonas sp. PS-17
[Пат. 10467 UA, МПК C21N1/02. 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 мі-
нерального 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 техні-
чного рішення (прототип) є спосіб одержання ме-
таболітів з поверхнево-активними і емульгуваль-
ними властивостями за допомогою Rhodococcus
erythropolis 1MB Ac-5017 [Пат. 44244 UA, МПК -
C21N1/02. Спосіб одержання метаболітів з повер-
хнево-активними і емульгувальними властивостя-
ми / Пирог Т.П., Тарасенко Д.О., Морозова А.П.;
Опубл. 25.09.2009, Бюл. № 18], який передбачає
культивування бактерій на рідкому середовищі з 2
% етанолу у колбах на качалках. Для інтенсифіка-
ції синтезу метаболітів з емульгувальними власти-
востями (емульгатора) концентрація етанолу у
середовищі для одержання посівного матеріалу
становить 1,1-1,3 % (об'ємна частка).Недоліком цього способу є високий вміст со-
лей у середовищі культивування продуцента (9

(13) C2

(11) 95380

(19) UA

г/л) та недостатньо висока концентрація синтезованого емульгатора.

В основу винаходу покладено задачу створення нового способу одержання емульгатора, який знижує вміст солей у середовищі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 та підвищує синтез метаболітів з емульгувальними властивостями. Штам *R. erythropolis* ЕК-1 депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології Національної академії наук України за номером 1МВ Ас-5017.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання емульгатора включає культивування *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і 2 % етанолу як джерела вуглецю і енергії, а також внесення цитрату натрію на початку стаціонарної фази росту. Згідно винаходу концентрація цитрату натрію становить 0,085-0,095 %.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Внесення у середовище з етанолом цитрату натрію у концентрації 0,085-0,095 % на початку стаціонарної фази росту дає змогу знизити кількість солей у середовищі культивування *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 та підвищити синтез емульгатора.

Експериментально доведено, що внесення у середовище з етанолом 0,085-0,095 % цитрату натрію на початку стаціонарної фази росту продуцента дає змогу знизити у 3 рази вміст солей у середовищі культивування *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 та підвищити до 70 % індекс емульгування розбавленої у 70 разів культуральної рідини.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Культивування *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): KNO_3 - 1,0; 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 6,8-7,0. Як джерело вуглецю і енергії використовують етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 з середини експоненційної фази (44-48 год. росту), вирощену на рідкому середовищі з 1,2 % (об'ємна частка) етанолу. Кількість посівного матеріалу становить 5 % від об'єму середовища. На початку стаціонарної фази росту (58-60 год.) у середовище

вносять 0,085-0,095 % цитрату натрію. Цитрат натрію додають у середовище у вигляді 10%-ного розчину. Культивування здійснюють у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С, рН 6,8-7,0 упродовж 120 год.

Використання нового способу дає змогу знизити у 3 рази вміст солей у середовищі культивування (з 9 до 2,85 г/л) і підвищити до 70 % індекс емульгування розбавленої у 70 разів культуральної рідини.

Приклад 1

Синтез емульгатора за умов росту *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 на середовищах різного складу.

Культивування *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі 1 (прототип) такого складу (г/л): KH_2PO_4 - 6,8; NaOH - 1,0; NH_4NO_3 - 0,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; рН 6,8-7,0; а також на середовищі 2 (г/л): KNO_3 - 1,0; 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 6,8-7,0. Як джерело вуглецю і енергії використовують етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 з середини експоненційної фази (44-48 год. росту), вирощену на рідкому середовищі з 1,2 % (об'ємна частка) етанолу. Концентрація 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, рН 6,8-7,0 упродовж 120 год.

Синтез емульгатора оцінюють за показником індексу емульгування (E_{24} , %) розбавленої у 50 і 70 разів культуральної рідини. Як субстрат для емульгування використовують соняшникову олію.

Індекс емульгування культуральної рідини, одержаної після культивування штаму *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 на середовищах різного складу, наведено у табл. 1. Як видно з наведених у табл. 1 даних, показники синтезу емульгатора є однаковими за умов росту *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 на обох середовищах. У подальших дослідженнях культивування продуцента здійснювали на середовищі 2, оскільки воно значно дешевше (містить у 3 рази менше солей, ніж середовище 1).

Таблиця 1

Синтез емульгатора залежно від складу середовища культивування *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017

Середовище	Індекс емульгування культуральної рідини (E_{24} , %)	
	1:49	1:69
1(прототип)	65	60
2	65	60

Приклад 2

Вплив цитрату на синтез емульгатора *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017.

Культивування *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): KNO_3 - 1,0; 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 6,8-7,0. Як джерело вуглецю і енергії використовують етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру *R. erythropolis* 1МВ Ас-5017 з середини експоненційної фази (44-48 год. росту), вирощену на рідкому середовищі з 1,2 % (об'ємна частка) етанолу. Концентрація посівного матеріалу

становить 5 % від об'єму середовища. На початку стаціонарної фази росту (58-60 год.) у середовище вносять цитрат натрію у концентрації 0,05-0,1 %. Культивування здійснюють у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С, рН 6,8-7,0 упродовж 120 год.

Індекс емульгування культуральної рідини, одержаної після культивування штаму *R. erythropolis* 1MB Ac-5017 на середовищі з різною концентрацією цитрату натрію, наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Синтез емульгатора залежно від концентрації цитрату натрію у середовищі культивування *R. erythropolis* 1MB Ac-5017

Концентрація цитрату натрію, %	Індекс емульгування культуральної рідини (E ₂₄ , %)	
	1:49	1:69
Без цитрату (контроль)	65	60
0,06	70	62
0,07	72	63
0,08	75	65
0,09	80	70
0,10	78	67

Як видно з наведених даних, індекс емульгування розбавленої у 70 разів культуральної рідини максимальний за концентрації цитрату у середовищі з етанолом 0,08-0,09 %.

Приклад 3

Синтез емульгатора *R. erythropolis* 1MB Ac-5017 залежно від моменту внесення цитрату натрію у середовище з етанолом.

Вирощування *R. erythropolis* 1MB Ac-5017 здійснюють як описано вище. На початку процесу культивування і на початку стаціонарної фази рос-

ту (58-60 год.) у середовище вносять цитрат натрію у концентрації 0,08-0,1 %. Культивування здійснюють у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С, рН 6,8-7,0 упродовж 120 год.

Рівень синтезу емульгатора наведено у табл. 3. Як видно з наведених у табл. 3 даних, показник E₂₄ розбавленої у 70 разів культуральної рідини досягає найвищого значення за внесення на початку стаціонарної фази росту цитрату натрію у концентрації 0,085-0,095 %.

Таблиця 3

Вплив моменту внесення різних концентрацій цитрату натрію у середовище з етанолом на синтез емульгатора *R. erythropolis* 1MB Ac-5017

Момент внесення цитрату	Концентрація цитрату, %	E ₂₄ ,% (1:69)
На початку процесу культивування	0,08	62
	0,085	64
	0,09	64
	0,095	65
	0,10	61
На початку стаціонарної фази росту	0,08	67
	0,085	69
	0,09	70
	0,095	70
	0,10	67

Отже, використання запропонованого способу дає змогу знизити у 3 рази вміст солей у середовищі культивування *R. erythropolis* 1MB Ac-5017 та

підвищити індекс емульгування розбавленої у 70 разів культуральної рідини до 70 %.