



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44144 (13) U
(51) МПК (2009)
C12N 1/02
C12R 1/38 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

1

(21) u200901924
(22) 03.03.2009
(24) 25.09.2009
(46) 25.09.2009, Бюл. № 18, 2009 р.
(72) ПИРОГ ТЕТЯНА ПАВЛІВНА, ТАРАСЕНКО
ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ЯЦУК ДМИТРО ВА-
ЛЕРІЙОВИЧ
(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ
ТЕХНОЛОГІЙ

2

(57) Спосіб одержання поверхнево-активних речовин, який включає культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і джерело вуглецевого живлення, який **відрізняється** тим, що на початку стаціонарної фази росту продуцента у середовище вносять 0,2-0,25 % фумарату і 0,1-0,15 % цитрату.

Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання поверхнево-активних речовин (ПАР), які можуть бути використані для очистки довкілля від нафти і 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* ЕК-1 [Пат. 33569 UA, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т. П., Тарасенко Д. О.; Опубл. 25.06.2008, Бюл. № 12], який передбачає культивування бактерій у колбах на рідкому мінеральному середовищі. Для здешевлення процесу біосинтезу поверхнево-активних речовин як джерело вуглецевого живлення використовується етанол у концентрації 1,8-2,0 %.

Недоліком цього способу є невелика концентрація синтезованих ПАР і висока тривалість процесу культивування.

В основу корисної моделі покладено задачу створення нового способу одержання поверхнево-

активних речовин, який підвищує концентрацію ПАР та скорочує тривалість культивування *R. erythropolis* ЕК-1.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання поверхнево-активних речовин включає культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і джерело вуглецю і енергії. Згідно корисної моделі на початку стаціонарної фази росту продуцента у середовище вносять 0,2-0,25 % фумарату і 0,1-0,15 % цитрату.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Додавання на початку стаціонарної фази росту продуцента у середовище 0,2-0,25 % фумарату і 0,1-0,15 % цитрату дає змогу підвищити концентрацію ПАР та скоротити тривалість культивування бактерій.

Експериментально доведено, що внесення на початку стаціонарної фази росту продуцента у середовище 0,2-0,25 % фумарату і 0,1-0,15 % цитрату дає змогу скоротити тривалість періодичного культивування *R. erythropolis* ЕК-1 зі 120 до 100 год і підвищити у 1,5-2 рази показники синтезу ПАР.

Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *R. erythropolis* ЕК-1 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі 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. Як джерело вуглецю і енергії використовують етанол і гексадекан у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру *R. erythropolis* ЕК-1 з сходи-

(13) U
(11) 44144
(19) UA

ни експоненційної фази (44-48 год росту), вирощену на рідкому середовищі з 1,0 % (об'ємна частка) етанолу або гексадекану. Кількість посівного матеріалу становить 5 % від об'єму середовища. На початку стаціонарної фази росту (58-60 год) у середовище вносять фумарат натрію у концентрації 0,2-0,25 % і цитрат натрію у концентрації 0,1-0,15 %. Цитрат натрію і фумарат натрію додають у середовище у вигляді 10 %-них розчинів. Культивування здійснюють у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 30 °C, pH 6,8-7,0 упродовж 100 год.

Використання нового способу дає змогу скоротити тривалість культивування (зі 120 до 100 год) і підвищити умовну концентрацію ПАР майже у 2 рази (зі 3,4 до 6,6).

Приклад 1. Визначення оптимальної концентрації фумарату і цитрату у середовищі культивування *R. erythropolis* EK-1

Культивування *R. erythropolis* EK-1 здійснюють на рідкому мінеральному середовищі наведеного вище складу. Як джерело вуглецю і енергії використовують гексадекан і етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру *R. erythropolis* EK-1 з середини експоненційної фази (44-48 год росту), вирощену на рідкому середовищі з 1,0 % (об'ємна частка) етанолу або гексадекану. Концентрація посівного матеріалу становить 5 % від об'єму середовища. На початку стаціонарної фази росту (58-60 год) у середовище вносять фумарат натрію у концентрації

0,1-0,3 %, а також цитрат натрію у концентрації 0,05-0,2 %. Культивування здійснюють у колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв.) при 30 °C, pH 6,8-7,0 упродовж 120 год (на етанолі) і 168 год (на гексадекані).

Синтез ПАР оцінюють за показником умовної концентрації ПАР (ПАР*), який визначають як ступінь розведення вільної від клітин культуральної рідини у точці збільшення поверхневого натягу на кривій залежності поверхневого натягу від логарифму значення розведень. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР та виражається в безрозмірних одиницях.

Значення показника ПАР* залежно від концентрації фумарату і цитрату у середовищі культивування наведено у табл. 1.

Отже, найвищий показник ПАР* спостерігається за умови внесення у середовище як з етанолом, так і гексадеканом фумарату у концентрації 0,2-0,25 % і цитрату у концентрації 0,1-0,15 %.

Слід зазначити, що за внесення фумарату або цитрату у досліджуваних концентраціях на початку процесу культивування *R. erythropolis* EK-1 спостерігали підвищення концентрації біомаси; при цьому умовна концентрація поверхнево-активних речовин дещо знижувалася порівняно з вирощуванням штаму EK-1 на середовищі без фумарату і цитрату. Тому у наступних дослідженнях фумарат і цитрат вносили на початку стаціонарної фази росту продуцента.

Таблиця 1

Вплив концентрації фумарату і цитрату у середовищі культивування *R. erythropolis* EK-1 на синтез ПАР

Концентрація фумарату, %	Концентрація цитрату, %	Умовна концентрація ПАР (ПАР*) за умов росту на	
		етанолі	гексадекані
Без фумарату і цитрату (контроль)		3,4	3,4
0,1	0	4,0	4,1
0,15	0	4,2	4,5
0,2	0	4,8	5,8
0,25	0	4,8	5,75
0,3	0	4,6	5,4
0	0,05	3,4	3,7
0	0,1	3,6	4,1
0	0,15	3,6	4,1
0	0,2	3,2	3,3

Приклад 2. Синтез ПАР *R. erythropolis* EK-1 за одночасної присутності у середовищі з гексадеканом і етанолом фумарату і цитрату

Культивування *R. erythropolis* EK-1 здійснюють в умовах, описаних вище. На початку стаціонарної фази росту продуцента у середовище одночасно вносять фумарат у концентрації 0,15-0,3 % і цитрат - 0,05-0,15 %. Тривалість культивування становить 120 год (на етанолі) і 168 год (на гексадекані) Рівень синтезу поверхнево-активних речовин

R. erythropolis EK-1 наведено у табл. 2.

Умовна концентрація ПАР є найвищою за умови одночасного внесення у середовище з етанолом або гексадеканом фумарату у концентрації 0,2-0,25 % і цитрату у концентрації 0,1-0,15 %. За таких умов культивування показник ПАР* підвищується майже у 1,5-2 рази порівняно з вирощуванням продуцента на середовищі без фумарату і цитрату.

Таблиця 2

Синтез ПАР *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 залежно від концентрації у середовищі з етанолом і гексадеканою суміші фумарату і цитрату

Концентрація фумарату і цитрату, %	Умовна концентрація ПАР (ПАР*) за умов росту на	
	етанолі	Гексадекані
Без фумарату і цитрату (контроль)	3,4	3,4
Цитрат, 0,05 + фумарат, 0,15	3,7	4,1
Цитрат, 0,05 + фумарат, 0,2	3,9	4,3
Цитрат, 0,05 + фумарат, 0,25	3,8	4,4
Цитрат, 0,05 + фумарат, 0,3	3,8	4,5
Цитрат, 0,1 + фумарат, 0,15	4,5	6,1
Цитрат, 0,1 + фумарат, 0,2	5,1	6,6
Цитрат, 0,1 + фумарат, 0,25	5,1	6,6
Цитрат, 0,1 + фумарат, 0,3	4,8	6,2
Цитрат, 0,15 + фумарат, 0,15	4,8	5,9
Цитрат, 0,15 + фумарат, 0,2	5,2	6,5
Цитрат, 0,15 + фумарат, 0,25	5,1	6,5
Цитрат, 0,15 + фумарат, 0,3	4,7	6,0
Цитрат, 0,2 + фумарат, 0,15	4,0	5,1
Цитрат, 0,2 + фумарат, 0,2	3,9	5,3
Цитрат, 0,2 + фумарат, 0,25	3,9	5,3
Цитрат, 0,2 + фумарат, 0,3	3,8	5,2

Приклад 3. Залежність синтезу ПАР від тривалості культивування *R. erythropolis* ЕК-1

Культивування *R. erythropolis* ЕК-1 здійснюють в умовах, описаних вище. Як джерело вуглецю і енергії використовують гексадекан і етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). На початку стаціо-

нарної фази росту у середовище вносять фумарат (0,2 %) і цитрат (0,1 %). Тривалість культивування становить 100 і 120 год.

Рівень синтезу поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 за таких умов культивування наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Вплив тривалості культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на синтез ПАР за присутності у середовищі з етанолом і гексадеканою 0,2 % фумарату і 0,1 % цитрату

Джерело вуглецевого живлення	Тривалість культивування, год	ПАР*
Гексадекан	120	6,6
	100	6,6
Етанол	120	5,1
	100	5,1

Таким чином, за присутності фумарату і цитрату у середовищі з етанолом або гексадеканою умовна концентрація ПАР досягає найвищого значення на 100 год культивування продуцента.

Отже, використання запропонованого способу

дає змогу скоротити (зі 120 до 100 год) тривалість культивування *R. erythropolis* ЕК-1 і підвищити майже у два рази (до 6,6) умовну концентрацію ПАР.