



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **53084** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12N 1/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ МЕТАБОЛІТІВ З ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИМИ І ЕМУЛЬГУВАЛЬНИМИ ВЛАС-
ТИВОСТЯМИ**

1

2

(21) u201002787

(22) 11.03.2010

(24) 27.09.2010

(46) 27.09.2010, Бюл. № 18, 2010 р.

(72) ПИРОГ ТЕТЯНА ПАВЛІВНА, ТАРАСЕНКО
ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ЯЦУК ДМИТРО ВА-
ЛЕРІЙОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ
ТЕХНОЛОГІЙ

(57) Спосіб одержання метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями, що включає культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, джерело вуглецю і енергії, а також внесення у середовище на початку стаціонарної фази росту продуцента фумарату і цитрату, який **відрізняється** тим, що концентрація фумарату і цитрату становить 0,07-0,08 %.

Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями, які можуть бути використані для очистки довілля від нафти і нафтових забруднень, а також у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій промисловостях.

Відомий спосіб одержання метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями 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 мінерального середовища з високим вмістом солей (12 г/л) для культивування продуцента, наявність у його складі факторів росту, а також невисокий вихід цільового продукту від субстрату.

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення (прототип) є спосіб одержання поверхнево-активних речовин (ПАР) за допомогою *Rhodococcus erythropolis* EK-1 [Пат. 44144 UA, Спосіб одержання поверхнево-активних речовин /Пирог Т.П., Тарасенко Д.О., Яцук Д.В.; Опубл. 25.09.2009, Бюл. № 18], який передбачає культивування *R. erythropolis* EK-1 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі і джерело вуглецю живлення. Для підвищення показників синтезу поверхнево-активних речовин на початку стаціо-

нарної фази росту продуцента у середовище вносять 0,2-0,25 % фумарату і 0,1-0,15 % цитрату.

Недоліком цього способу є високий вміст солей у середовищі культивування продуцента (9 г/л) та недостатньо висока концентрація синтезованих метаболітів з емульгувальними властивостями (далі по тексті - емульгатора).

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

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб одержання метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями включає культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на рідкому середовищі, що містить мінеральні солі, джерело вуглецю і енергії, а також внесення у середовище на початку стаціонарної фази росту продуцента фумарату і цитрату. Згідно корисної моделі концентрація фумарату і цитрату становить 0,07-0,08 %.

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом полягає в наступному. Додавання у середовище на початку стаціонарної фази росту продуцента 0,07-0,08 % фумарату і цитрату дає

(13) **U**
(11) **53084**
(19) **UA**

змогу знизити кількість солей у середовищі культивування та підвищити синтез метаболітів з емульгуючими властивостями.

Експериментально доведено, що внесення на початку стаціонарної фази росту продуцента у середовище 0,07-0,08 % фумарату і цитрату дає змогу знизити у 3 рази вміст солей у середовищі культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 та підвищити у 1,6-2,2 разів індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини.

Спосіб здійснюється наступним чином. Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-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, pH 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* IMB Ac-5017 з середини 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 0,07-0,08 % фумарату і цитрату. 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 знизити у 3 рази вміст солей у середовищі культивування (з 9 до 2,85 г/л) і підвищити у 1,6-2,2 рази індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини (з 40-60 до 88-98 %).

Приклад 1. Вплив фумарату і цитрату на синтез поверхнево-активних речовин за умов росту *R.*

erythropolis IMB Ac-5017 на середовищах різного складу

Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-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; pH 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, pH 6,8-7,0. Як джерело вуглецю і енергії використовують гексадекан і етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру *R. erythropolis* IMB Ac-5017 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 0,2 %, а також цитрат натрію у концентрації 0,1 % (згідно прототипу). 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.

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* за умов росту штаму IMB Ac-5017 на середовищах різного складу наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Синтез поверхнево-активних речовин під час культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на середовищах різного складу за присутності фумарату (0,2 %) і цитрату (0,1 %)

Середовище	Умовна концентрація ПАР (ПАР*) за умов росту на	
	етанолі	гексадекані
1 (прототип)	5,1	6,6
2	5,1	6,6

Як видно з наведених у табл. 1 даних, показники синтезу ПАР є однаковими за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-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).

Приклад 2. Визначення оптимальної для синтезу ПАР концентрації фумарату і цитрату у середовищі культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017.

Культивування *R. erythropolis* IMB Ac-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, pH 6,8-7,0. Як джерело вуглецю і енергії використовують гексадекан і етанол

у концентрації 2 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовують культуру *R. erythropolis* IMB Ac-5017 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 і цитрат натрію у концентрації 0,06-0,09 %. 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.

Значення показника ПАР* залежно від концентрації фумарату і цитрату у середовищі культивування наведено у табл. 2.

Таблиця 2

Синтез ПАР R. erythropolis IMB Ac-5017 залежно від концентрації фумарату і цитрату у середовищі з етанолом і гексадеканом

Концентрація фумарату і цитрату, %	Умовна концентрація ПАР (ПАР*) за умов росту на	
	етанолі	гексадекані
Без фумарату і цитрату (контроль)	3,0	3,6
Цитрат, 0,06 + фумарат, 0,06	3,2	4,2
Цитрат, 0,06 + фумарат, 0,07	3,3	4,4
Цитрат, 0,06 + фумарат, 0,08	3,5	4,4
Цитрат, 0,06 + фумарат, 0,09	3,6	4,5
Цитрат, 0,07 + фумарат, 0,06	4,3	6,0
Цитрат, 0,07 + фумарат, 0,07	5,1	6,6
Цитрат, 0,07 + фумарат, 0,08	5,1	6,6
Цитрат, 0,07 + фумарат, 0,09	4,9	6,3
Цитрат, 0,08 + фумарат, 0,06	4,7	6,2
Цитрат, 0,08 + фумарат, 0,07	5,1	6,6
Цитрат, 0,08 + фумарат, 0,08	5,1	6,6
Цитрат, 0,08 + фумарат, 0,09	5,0	6,2
Цитрат, 0,09 + фумарат, 0,06	4,8	5,7
Цитрат, 0,09 + фумарат, 0,07	4,7	5,6
Цитрат, 0,09 + фумарат, 0,08	4,7	5,8
Цитрат, 0,09 + фумарат, 0,09	4,6	5,5

Отже, найвищий показник ПАР* спостерігається за умови внесення у середовище як з етанолом, так і гексадеканом фумарату і цитрату у концентрації 0,07-0,08 %. За таких умов культивування показник ПАР* підвищується у 1,6-1,8 разів порівняно з вирощуванням продуцента на середовищі без фумарату і цитрату.

Приклад 3. Синтез емульгатора за умов росту R. erythropolis IMB Ac-5017 на середовищі з фумаратом і цитратом

Культивування R. erythropolis IMB Ac-5017 здійснюють в умовах, описаних вище. Як джерело вуглецю і енергії використовують гексадекан і етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). На початку стаціонарної фази росту у середовище вносять фумарат і цитрат (0,07-0,08 %).

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

Таблиця 3

Вплив фумарату і цитрату на синтез емульгатора за умов росту R. erythropolis IMB Ac-5017 на середовищі з етанолом і гексадеканом

Концентрація фумарату і цитрату, %	Показник E_{24} , % (1:49) за умов росту на	
	етанолі	гексадекані
Без фумарату і цитрату (контроль)	60	40
Цитрат, 0,07 + фумарат, 0,07	98	85
Цитрат, 0,07 + фумарат, 0,08	97	84
Цитрат, 0,08 + фумарат, 0,07	98	88
Цитрат, 0,08 + фумарат, 0,08	97	87

Таким чином, за присутності фумарату і цитрату (0,07-0,08 %) у середовищі з етанолом і гексадеканом показник індексу емульгування підвищується в 1,6 і 2,2 разів відповідно,

Отже, використання запропонованого способу дає змогу знизити у 3 рази (з 9 до 2,85 г/л) вміст

солей у середовищі культивування R. erythropolis IMB Ac-5017 та підвищити у 1,6-2,2 разів (з 40-60 до 88-98 %) індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини.