



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53085 (13) U
(51) МПК (2009)
C12N 1/02МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ЕМУЛЬГАТОРА

1

2

(21) u201002788

(22) 11.03.2010

(24) 27.09.2010

(46) 27.09.2010, Бюл. № 18, 2010 р.

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

(57) Спосіб одержання емульгатора, що включає культивування *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-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, який **відрізняється** тим, що концентрація цитрату натрію становить 0,085-0,095 %.

Корисна модель належить до біотехнологічної промисловості і стосується одержання мікробних метаболітів з емульгувальними властивостями (емульгаторів), які можуть бути використані для очистки довкілля від нафти і нафтових забруднень, а також у нафтовидобувній, хімічній, фармацевтичній, харчовій промисловостях.

Відомий спосіб одержання метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями 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 попередників синтезу і факторів росту, а також невисокий вихід цільового продукту від субстрату (до 48%).

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення (прототип) є спосіб одержання метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями за допомогою *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 [Пат. 44244 UA, МПК - С 21 N 1/02. Спосіб одержання метаболітів з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями / 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 інтенсифікації синтезу метаболітів з емульгувальними властивостями (емульгатора) концентрація

етанолу у середовищі для одержання посівного матеріалу становить 1,1-1,3 % (об'ємна частка).

Недоліком цього способу є високий вміст солей у середовищі культивування продуцента (9 г/л) та недостатньо висока концентрація синтезованого емульгатора.

В основу корисної моделі покладено задачу створення нового способу одержання емульгатора, який знижує вміст солей у середовищі культивування *R. erythropolis* EK-1 та підвищує синтез метаболітів з емульгувальними властивостями. 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 емульгатора включає культивування *R. erythropolis* IMB Ac-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 корисної моделі 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* IMB Ac-5017 та підвищити синтез емульгатора.

Експериментальне доведено, що внесення у середовище з етанолом 0,085-0,095 % цитрату натрію на початку стаціонарної фази росту проду-

(19) UA (11) 53085 (13) U

цента дає змогу знизити у 3 рази вміст солей у середовищі культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 та підвищити до 70 % індекс емульгування розбавленої у 70 разів куль-туральної 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 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 1,2 % (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 °C, pH 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* 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 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 1,2 % (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 °C, pH 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* IMB Ac-5017 на середовищах різного складу наведено у табл.1.

Таблиця 1

Синтез емульгатора залежно від складу середовища культивування *R. erythropolis* IMB Ac-5017

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

Як видно з наведених у табл. 1 даних, показники синтезу емульгатора 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. Вплив цитрату на синтез емульгатора *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 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 1,2 % (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 °C, pH 6,8-7,0 упродовж 120 год.

Індекс емульгування культуральної рідини, одержаної після культивування штаму *R. erythropolis* IMB 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* IMB 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* IMB Ac-5017 залежно від моменту внесення цитрату натрію у середовище з етанолом

Вирощування *R. erythropolis* IMB Ac-5017 здійснюють як описано вище. На початку процесу культивування і на початку стаціонарної фази росту (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 °C, pH 6,8-7,0 упродовж 120 год.

Рівень синтезу емульгатора наведено у табл. 3. Як видно з наведених у табл. 3 даних, показник E_{24} 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* IMB 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* IMB Ac-

5017 та підвищити індекс емульгування розбавленої у 70 разів культуральної рідини до 70%.