

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**ЄРОХІН ВОЛОДИМИР АНАТОЛІЙОВИЧ**

**УДК 579.841.11:543.395:663.15:66.069.82**

**БІОТЕХНОЛОГІЯ**  
**ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РАМНОЛІПІДІВ**  
**ШТАМУ *PSEUDOMONAS* SP. PS-17 У ФЕРМЕНТЕРІ**

**03.00.20 – біотехнологія**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**дисертації на здобуття наукового ступеня**  
**кандидата технічних наук**

**Київ – 2014**

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі хімії та біотехнології горючих копалин Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України.

**Науковий керівник:** кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник **Карпенко Олена Володимирівна**, Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, завідувач відділу хімії та біотехнології горючих копалин

**Офіційні опоненти:** доктор технічних наук **Кігель Наталя Федорівна**, Інститут продовольчих ресурсів НААН України, завідувач відділу біотехнології

доктор біологічних наук, професор **Федорович Дарія Василівна**, Інститут біології клітини НАН України, провідний науковий співробітник відділу молекулярної генетики і біотехнології

Захист відбудеться «5» березня 2015 р. о 12<sup>00</sup> год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.058.03 Національного університету харчових технологій за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 68, аудиторія А-311.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного університету харчових технологій за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 68.

Автореферат розісланий «11» грудня 2014 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради



Н.О. Бублієнко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Поверхнево-активні речовини мікробного походження (біосурфактанти, біоПАР) викликають значний інтерес у зв'язку з перспективами їх практичного використання в сучасних екологічно безпечних технологіях. Практичне значення мікробних ПАР насамперед зумовлено здатністю суттєво знижувати поверхневий і міжфазний натяг водних розчинів, їх емульгувальними, піноутворювальними властивостями, технологічними можливостями заміни синтетичних поверхнево-активних речовин, тощо [Banat I.M., 2010]. Незважаючи на те, що мікробні ПАР є відносно новим продуктом сучасної біотехнології, обґрунтовано доцільність їх застосування у нафтовидобувній, хімічній, паперово-целюлозній, харчовій, легкій, парфюмерно-косметичній, фармацевтичній промисловості, а також для очищення довкілля, у сільському господарстві та медицині [Pacwa-Рјосіniczak M., 2011].

Мікробний синтез ПАР може бути здійснений на основі дешевих субстратів, включаючи сільськогосподарські та промислові відходи [Маkкаг R., 2011]. Проте виробництво біоПАР лімітується відсутністю оптимальних біотехнологій та ефективного апаратурного рішення процесів культивування продуцентів, що пов'язано з інтенсивним піноутворенням в процесі їх біосинтезу. Вирішення цієї проблеми дозволить впровадити у виробництво України екологічно безпечні ПАР, буде сприяти вирішенню ряду актуальних проблем екології та біотехнології. У зв'язку з цим, було визначено мету та напрям наших досліджень.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є складовою частиною наукового напрямку Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України – дослідження процесів мікробного синтезу біоПАР – і пов'язана з виконанням таких робіт: бюджетної науково-дослідної теми № 0106U001027 “Фізико-хімічні закономірності впливу мікробних поверхнево-активних речовин на ферментативні процеси” (2006-2010 рр.); цільової програми № 0107U001276 “Створення нових екологічно безпечних матеріалів на основі каротиноїдів, полісахаридів та ПАР” (2007-2011 рр.).

**Мета і задачі дослідження.** Метою роботи є розроблення технології отримання поверхнево-активних рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері.

У відповідності до поставленої мети визначені наступні задачі:

- встановити оптимальний склад поживного середовища для синтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17;
- дослідити кінетичні параметри та скласти матеріальний баланс процесу ферментації;
- визначити оптимальну конструкцію біореактора для синтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17;
- встановити оптимальні умови культивування досліджуваного штаму у ферментері;

- розробити технологічну та апаратурно-технологічну схеми одержання поверхнево-активних рамноліпідів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17;

*Об'єкт дослідження* – процес біосинтезу поверхнево-активних речовин бактеріями роду *Pseudomonas*.

*Предмет дослідження* – технологія отримання рамноліпідних ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері.

**Методи дослідження.** Під час виконання дисертаційної роботи використовували наступні методи досліджень: біотехнологічні (культивування мікроорганізмів), фізико-хімічні (визначення концентрації біомаси, гліцерину, рамноліпідів, полісахаридів, білку, розчиненого кисню, поверхневого натягу, індексу емульгування) та математичні методи (математичне моделювання з використанням адитивно-решітчатих рівнянь, статистична обробка результатів досліджень).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше обґрунтовано та експериментально встановлено закономірності оптимізації процесу біосинтезу ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері. Вперше встановлено, що при культивуванні штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері з інжекційно-вихровою системою аерації нагромадження рамноліпідів зростає у 2,5 рази і становить 13,8 г/дм<sup>3</sup> та зменшується тривалість культивування на 40 % у порівнянні з ферментерами інших конструкцій. Встановлено, що керована подача кисню упродовж ферментації дозволяє збільшити максимальну продуктивність культури на 30 %, а також зменшити енерговитрати на аерацію на 30 %.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено біотехнологію поверхнево-активних продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 із використанням ферментера з інжекційно-вихровою системою аерації, яка дозволяє повністю усунути проблему піноутворення, а також збільшити ефективність використання об'єму ферментера до коефіцієнту заповнення – 0,85. Запропоновано технологічну та апаратурно-технологічну схеми їх виробництва. Показано технологічні та економічні переваги даної технології: ефективний контроль за піноутворенням, збільшення корисного об'єму ферментера, високий вихід продукту при скороченні тривалості ферментації, зниження енерговитрат та зменшення собівартості продукту. Дана технологія може бути рекомендована для виробництва поверхнево-активних продуктів мікробного синтезу.

Технологія синтезу рамноліпідних ПАР з використанням ферментера з вихровою системою аерації апробована у дослідно-промислових умовах ПрАТ «Компанія Ензим» (м. Львів).

Одержані результати наукових досліджень використовуються в науково-дослідних роботах ПАТ «Фармстандарт-Біолік» (м. Харків).

Результати досліджень використовуються в науковій роботі і навчальному процесі кафедри технології біологічно-активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка» (м. Львів) та кафедри біотехнології Національного фармацевтичного університету (м. Харків). Отримані ПАР використовуються в експериментальних

дослідженнях курсових, дипломних робіт студентів і дисертаційних робіт аспірантів та у викладанні спецкурсів, що підтверджено відповідними актами впровадження.

**Особистий внесок здобувача.** Експериментальна робота виконана автором особисто. Дисертантом вивчено та проаналізовано наукову літературу з даної проблеми. Автором проведено експериментальні дослідження та встановлено умови культивування продуценту в колбах та біореакторі. Розроблено технологічну та апаратурно-технологічну схеми одержання ПАР штаму *Pseudomonas* sp. PS-17.

Планування експериментів, узагальнення експериментальних даних, підготовку публікацій за результатами досліджень і їх представлення на наукових конференціях, дослідження фізико-хімічних властивостей, ідентифікацію ПАР проводили спільно з науковим керівником к.х.н., с.н.с. Карпенко О. В. Оптимізацію поживного середовища методом математичного моделювання, дослідження методів виділення цільового продукту проводили спільно з інженером Покинсьбродою Т. Я. Зазначені співробітники є співавторами публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати роботи представлені на наступних наукових конференціях: II, III Всеукраїнських науково-практичних конференціях «Біотехнологія. Освіта. Наука» (Львів, 2004; Харків, 2006); міжнародній конференції «Statistical Physics 2005: Modern problems and new applications» (Lviv, 2005); II, III, V, VI Міжнародних конференціях «Молодь та поступ біології», ЛНУ ім.І.Франка, (Львів, 2006, 2007, 2009, 2010 рр.); науково-практичному семінарі «Перспективи та напрямки сучасної біотехнології» (Київ, 2011).

**Публікації.** За результатами наукових досліджень опубліковано 16 наукових праць, із них – 6 статей, з яких 5 – у фахових виданнях, 1 – у іноземному журналі та 10 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота викладена на 159 сторінках машинописного тексту і складається з таких структурних частин: «Вступ», «Огляд літератури» (1 розділ), «Результати досліджень» (4 розділи), «Обговорення», «Висновки», «Список використаних джерел», який містить 194 посилання (з них 167 іноземних авторів). Робота містить 31 таблицю та 39 рисунків.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### Розділ 1. Огляд літератури

В огляді літератури наведено інформацію про існуючі види біоПАР та їх властивості. Представлено дані про поверхнево-активні рамноліпіди, їх продуцентів, шляхи біосинтезу та галузі застосування. Узагальнено інформацію про умови одержання ПАР бактеріями роду *Pseudomonas*, вибір складу поживного середовища та вплив його компонентів на біосинтез рамноліпідів. Описано відомі методи глибинного культивування та типи ферментерів для біосинтезу рамноліпідів, їх переваги та недоліки. Проаналізовано проблеми, що виникають у процесі промислового культивування продуцентів рамноліпідів. Розглянуто методи виділення рамноліпідів.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### Розділ 2. Матеріали, методи і методики досліджень

**Об'єкти досліджень.** Як об'єкт досліджень використовували штам бактерій *Pseudomonas* sp. PS-17 із колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України та поверхнево-активні метаболіти штаму *Pseudomonas* sp. PS-17.

**Культивування мікроорганізмів.** Культивування бактерій проводили в лабораторних умовах у колбах Ерленмейєра на ротаційній качалці (WL-2000, JV Electronic, Poland) за температури 30 °С на мінеральному середовищі наступного складу (г/дм<sup>3</sup>): гліцерин – 30; NaNO<sub>3</sub> – 3,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O – 2,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,2; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,5; натрію цитрат – 5,0; дистильована вода – до 1 дм<sup>3</sup> [Карпенко Е.В., 2009]. Як інокулянт використовували 24-год культуру в експоненційній фазі росту (титр клітин 2×10<sup>8</sup> КУО/см<sup>3</sup>). Посівний матеріал брали в кількості 10 % від об'єму поживного середовища.

Культивування проводили за швидкості обертів качалки (хв<sup>-1</sup>): 40, 100, 160, 220 і амплітуді перемішування – 10 та 20 мм.

Для дослідження впливу хімічних засобів піногасіння на ріст штаму до складу поживного середовища додавали піногасники – Struktol SB2121, Struktol SB2071 (“Struktol AG” GmbH, Germany), “Естер С” (ТОВ НВП “ЕЛЕКТРОГАЗОХІМ”, Україна), “СОФЕКСІЛ® -1520” (ЗАТ НВК “СОФЕКС”, Росія) в кількостях (% об.): 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1 та 2.

Культивування штаму здійснювали в лабораторному скляному ферментері об'ємом 5 дм<sup>3</sup> у різних модифікаціях на відповідному оптимізованому поживному середовищі. Робочий об'єм становив 2 – 4 дм<sup>3</sup>. Стерилізацію ферментера проводили разом з поживним середовищем шляхом автоклавування протягом 40 хв за температури 132 °С.

Посівний матеріал брали в кількостях 5, 7, 10 та 15 % від об'єму середовища. Тривалість вирощування посівного матеріалу – 12, 24 та 36 год.

У процесі ферментації контролювалися: концентрація джерела вуглецю (гліцерину), біомаси, рамноліпідів, рН середовища, температура, концентрація розчиненого кисню в культуральній рідині. Значення рН середовища, температури, вмісту розчиненого кисню визначалися за допомогою відповідних електродів автоматичним аналізатором "Експерт-001-4.0.1"(ООО "Эконикс-Эксперт", Росія) у режимі реального часу.

Культивування здійснювали за підтримки постійного значення рН культуральної рідини на рівні 6, 7, 8, 9 або без регулювання рН. Підтримку заданого рН здійснювали додаванням 1 н. розчинів NaOH та HCl. Температура ферментації – 26, 28, 30, 32, 34, 36 °С підтримувалася термостатуванням зовнішнім змієвиком в оболонці реактора.

Аерацію культурального середовища здійснювали за допомогою компресора (SERA air550R, “Sera”, Germany) з витратою повітря 0,25 – 6 м<sup>3</sup>/(м<sup>3</sup>·хв) та контролювали лабораторним ротаметром.

Перемішування проводили за допомогою двохлопатевої турбінної мішалки з нижнім приводом за швидкості 100 – 1000 хв<sup>-1</sup>.

**Визначення показників росту бактерій.** Кількість біомаси бактерій визначали спектрофотометричним методом [Карпенко Е.В., 1996]. Вміст гліцерину в культуральній рідині (КР) визначали спектрофотометричним методом [Carr T., 1993]. Визначення параметрів росту культури: питомої швидкості росту, тривалості лаг-фази, виходу біомаси від субстрату розраховували за методом [Перт С., 1978].

Інтегральне стехіометричне рівняння, матеріальний баланс процесу ферментації, розрахунок теоретичного значення швидкості споживання кисню та об'ємного коефіцієнту масопереносу  $K_L a$  за методикою [Сидоров Ю.І., 2008].

**Визначення показників синтезу поверхнево-активних речовин.** Визначення поверхневого натягу супернатантів КР проводили методом Дю-Нуї за допомогою платиного кільця [Абрамзон В., 1988] на тензіометрі KRÜSS K6 ("KRÜSS" GmbH, Germany). Умовну концентрацію ПАВ визначали методом розведення супернатантів КР до значення ККМ [Guerra-Santos L., 1984]. Емульгувальну активність КР та супернатантів КР оцінювали за індексом емульгування [Gutnick B., 1988], як гідрофобну фазу використовували вазелінову олію.

**Методи виділення та ідентифікації продуктів.** Виділення ліпідів з супернатанту КР здійснювали екстракцією сумішшю розчинників хлороформ/ізопропанол (2:1) з подальшим відділенням органічної фази та випаровуванням екстракту під вакуумом [Van Dyke M.I., 1993, Folch J.A., 1957]. Кількість ліпідів визначали гравіметричним методом.

Розділення ліпідів на фракції здійснювали методом колонкової хроматографії зі застосуванням скляної колонки 220×15 мм наповненої силікагелем Silicagel 60 (Merck, Germany). Як елюент використовували систему розчинників хлороформ/метанол у різних співвідношеннях [Sim L., 1997]. Якісний аналіз ліпідів визначали за методом тонкошарової хроматографії з використанням рухомої фази хлороформ/метанол/ацетон/оцтова кислота 90:10:6:1 [Ando S., 1987].

Визначення кількості рамноліпідів в супернатанті КР здійснювали на спектрофотометрі Shimadzu UVmini-1240 за орциновим методом [Guerra-Santos L., 1984]. Концентрацію полісахаридів встановлювали ваговим та спектрофотометричними методами із застосуванням фенолу та сірчаної кислоти [Dubois M., 1956]. Вміст білка в складі біокомплексу визначали за методом Бредфорда [Bradford M., 1976].

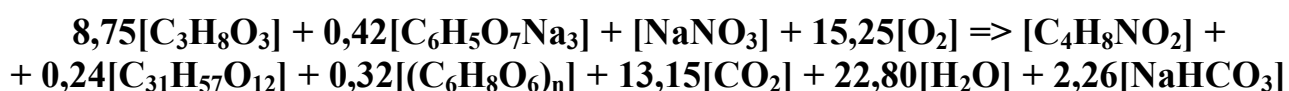
**Математичні методи.** Дослідження впливу складу поживного середовища на ріст культури та синтез продуктів проводили методом математичного моделювання з використанням адитивно-решітчатих рівнянь [Бирюков В.В., 1985].

**Статистичний аналіз.** Обробку даних здійснювали за методами варіаційної статистики [Лакін А., 1990] та програми Origin 6.1.

**Розділ 3. Дослідження росту та синтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у колбах.** Одним із найважливіших чинників, що впливає на ефективність біосинтезу цільових продуктів, є вибір оптимального складу поживного середовища. За допомогою методу адитивно-решітчастих рівнянь проведено оптимізацію складу поживного середовища для культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 за співвідношенням концентрацій джерел вуглецю (гліцерину та натрію цитрату) та азоту (натрію нітрату). За результатами математичного моделювання отримано два поживних середовища для нагромадження біомаси та рамноліпідів.

Застосування даних поживних середовищ дозволило збільшити кількість біомаси бактерій на 24 % (до 3,62 г/дм<sup>3</sup>), та кількість рамноліпідів на 54 % (до 5,54 г/дм<sup>3</sup>), при чому ПАР-синтезувальна здатність ( $Y_{p/x}$ ) культури зростала на 21 % у порівнянні з культивуванням бактерій на неоптимізованому поживному середовищі.

Досліджено динаміку росту та синтезу ПАР штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на поживному середовищі № 2 і розраховано інтегральне стехіометричне рівняння процесу ферментації:



На основі одержаних результатів розраховано теоретичну потребу культури в кисні, що становить 1 кг O<sub>2</sub>/(м<sup>3</sup>·год) та необхідний для її забезпечення об'ємний коефіцієнт масопереносу  $K_{La} = 125 \text{ год}^{-1}$ .

Встановлено залежність константи масопереносу  $K_{La}$  від швидкості та амплітуди обертів шейкера, а також оптимальні параметри вирощування культури *Pseudomonas* sp. PS-17 у колбах: швидкість обертів шейкера – 220 хв<sup>-1</sup> за амплітуди – 20 мм та коефіцієнту заповнення колби – 0,2.

**Виділення цільового продукту.** Кінцевим продуктом культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 є культуральна рідина, що проявляє поверхнево-активні властивості і вже сама є цільовим продуктом біосинтезу. Її собівартість є достатньо низькою, оскільки процес одержання включає тільки ферментацію з наступним термообробленням та відділенням осаду клітин. Показано, що за термічного оброблення супернатанту КР (80 °С, 30 хв) концентрація поверхнево-активних рамноліпідів та його емульгувальна активність залишаються незмінними. Для вилучення рамноліпідів з супернатанту КР оптимальним є метод, що передбачає попереднє кислотне осадження з подальшою екстракцією ліпідів органічним розчинником [Карпенко О.В., 1996]. Осад, одержаний за рН 3,0 містить ліпіди (рамноліпіди та жирні кислоти), полісахариди та білки. Показано, що найвищий вихід ліпідів (0,78 г/г) спостерігався при застосуванні як екстрагента сумішей хлороформ/ізопропанол та хлороформ/метанол у співвідношеннях 2:1 відповідно. Аналіз тонкошарокої хроматограми даного екстракту в комп'ютерній програмі Densitan 2.0 дозволив визначити кількісне співвідношення компонентів ліпідного екстракту, яке становить 6:1:1 у відповідності дирамноліпід (RL2): монорамноліпід (RL1):



жирні кислоти. Такий двостадійний процес виділення ліпідів з супернатанту КР через стадію кислотного осадження є доцільним з економічної точки зору, оскільки при цьому об'єми екстрагенту зменшуються в 10-15 разів порівняно з екстракцією ліпідів розчинником із супернатанту КР.

Опрацьовано методику одержання фракцій моно- та дирамноліпиду шляхом адсорбційної колонкової хроматографії. Визначено, що оптимальним для розділення рамноліпідних фракцій є послідовне застосування таких елюентів: хлороформ, хлороформ/метанол 50:3 (для видалення RL1) та хлороформ/метанол 50:10 (для видалення RL2). Запропоновано оптимізований метод для виділення тільки дирамноліпиду, який передбачає застосування як елюенту системи розчинників хлороформ/метанол 50:10 до повного видалення RL2. При цьому досягається подвійна економія екстрагенту.

**Розділ 4. Дослідження росту та синтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у біореакторі.** При масштабуванні технології виробництва біоПАР першою проблемою є вибір оптимальної моделі ферментера.

Для визначення оптимальної моделі ферментера для біосинтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 проведено порівняння ефективності його культивування у біореакторах різних типів, що відрізняються за способом підведення енергії [Резенчук О. Є., 2011].

Досліджено процес нагромадження біомаси та рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері з барботажно-аерліфтною системою аерації. Дана конструкція є найбільш простою, оскільки не містить рухомих елементів, а перемішування культуральної рідини відбувається за рахунок подачі повітря через розташований внизу апарата газорозподільний пристрій.

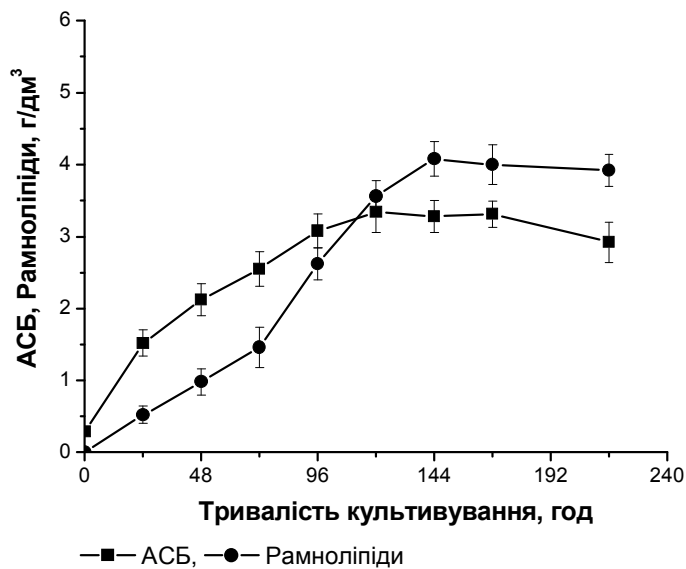
Основним недоліком таких ферментерів є низька інтенсивність масообмінних процесів. Для даної системи біореактора досліджено залежність швидкості розчинення кисню від швидкості подачі повітря через барботер (рис. 3). Визначено, що об'ємна витрата повітря повинна становити не менше  $6 \text{ м}^3/(\text{м}^3 \cdot \text{хв})$ , таким чином коефіцієнт використання кисню з повітря становить лише 1 %.

Одержані результати, у порівнянні з результатами, одержаними у колбах, показали значне зменшення нагромадження рамноліпідів (з 5,5 до 2,0 г/дм<sup>3</sup>) та збільшення тривалості культивування (з 120 до 144 год). До того ж процес супроводжувався інтенсивним піноутворенням вже з перших годин ферментації, що призводило до значної втрати продукту з піною.

До іншого типу належать ферментери, в яких енергія на перемішування подається одночасно з газовою та рідкою фазами. Встановлено залежність швидкості розчинення кисню в КР від швидкості обертів турбінної мішалки та подачі повітря на аерацію для ферментера з барботером та перемішувальним пристроєм. Визначено, що оптимальна швидкість обертів мішалки -  $500 \text{ хв}^{-1}$ , за якої досягається необхідна подача кисню у культуральна рідину; при цьому швидкість подачі повітря можна зменшити до  $1 \text{ м}^3/(\text{м}^3 \cdot \text{хв})$ , тобто коефіцієнт використання кисню повітря в даному випадку становитиме 6 %.

Показано, що при культивуванні штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері з барботером і перемішувальним пристроєм, максимальне нагромадження рамноліпідів досягається через 144 год культивування і становить 4,08 г/дм<sup>3</sup> (рис. 1), що вдвічі більше, ніж у барботажно-аерліфтному ферментері. Такий результат можна пояснити інтенсифікацією масообмінних процесів усередині біореактора за рахунок використання перемішувального пристрою (турбінної мішалки).

Одним із недоліків ферментера цієї конструкції є інтенсивне піноутворення в процесі біосинтезу рамноліпідів, що призводить до втрат культуральної рідини з піною і робить проблематичним масштабування процесу синтезу біоПАР штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 в біореакторі.



**Рисунок 1 – Динаміка нагромадження біомаси та рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері з барботером і перемішувальним пристроєм**

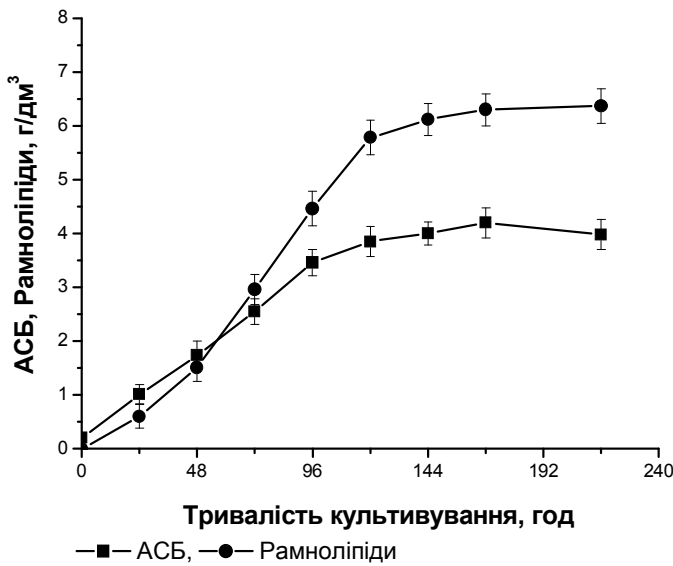
Для вирішення проблеми контролю піноутворення у технологіях виробництва рамноліпідних ПАР досліджено ефективність використання різних систем піногасіння. Показано, що механічні системи піногасіння є недостатньо ефективними і не забезпечують необхідний контроль за рівнем піноутворення в процесі культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері з барботером і перемішувальним пристроєм.

Проаналізовано також вплив низки хімічних піногасників на процес культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17.

Показано, що всі досліджувані піногасники за концентрацій більших, ніж 0,25 %, проявляють інгібувальну дію на ріст культури і нагромадження рамноліпідних ПАР, але найменшим такий вплив виявлено для піногасника марки “Struktol SB2121”. Досліджено динаміку росту та синтезу ПАР штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері з барботером і перемішувальним пристроєм з додаванням піногасника “Struktol SB2121”, який вносили по мірі необхідності порціями по 0,04 % при досягненні піною граничного рівня в об’ємі біореактора.

Виявлено, що додавання піногасника в процесі ферментації спричиняє сповільнення росту даного штаму та суттєве зниження нагромадження рамноліпідів (0,82 г/дм<sup>3</sup>). Це може бути зумовлено тим, що саме у шарі піни відбувається інтенсивний масообмін та ріст клітин. Внесення піногасника до культурального середовища у меншій кількості виявилось неефективним у зв’язку з інтенсивним піноутворенням в процесі культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17.

Третім типом конструкцій ферментерів є ферментери з підведенням енергії з рідкою фазою. Однією із таких конструкцій є ферментер із самовсмоктувальною мішалкою, основною особливістю якого є відсутність барботера. Досліджено залежність швидкості розчинення кисню в КР від швидкості обертів перемішувального пристрою у ферментері даної конструкції. Необхідна швидкість розчинення кисню ( $1 \text{ кгO}_2/\text{м}^3 \cdot \text{год}^{-1}$ ) досягається вже за швидкості обертів самовсмоктувальної мішалки  $250 \text{ хв}^{-1}$ , що вдвічі менше, ніж при аналогічному використанні турбінної мішалки у барботажній системі аерації. Швидкість подачі повітря у культуральне середовище при цьому становитиме  $0,65 \text{ м}^3/(\text{м}^3 \cdot \text{хв})$ , тобто коефіцієнт використання кисню повітря 9,2 %.

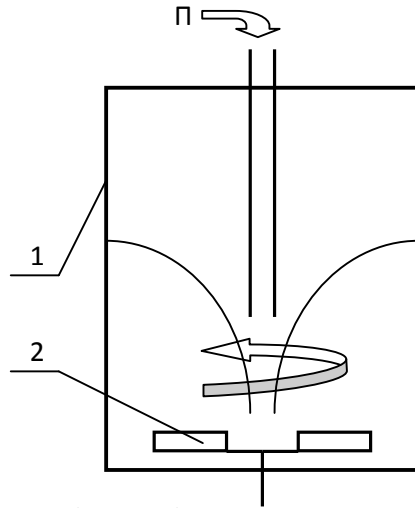


**Рисунок 2 – Динаміка нагромадження біомаси та рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері з самовсмоктувальною мішалкою**

Показано, що за культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері з самовсмоктувальною мішалкою максимальне нагромадження рамноліпідів досягається через 120 год культивування і становить  $6 \text{ г/дм}^3$  (рис. 2), що значно перевищує кількість цільового продукту, одержаного у попередніх моделях біореакторів. Ще однією важливою перевагою даного біореактора є контроль за піноутворенням завдяки відсутності барботера та можливості значного зменшення швидкості обертів перемішувального пристрою.

Упродовж останніх років було розроблено багато інших конструкцій ферментерів з метою підвищення енергетичної ефективності процесу передачі кисню. Одними із найпростіших серед них є системи з поверхневою аерацією. До них належать реактори з вихровою, газо-вихровою, плівковою та іншими способами аерації середовища. Конструктивно найпростішим є ферментер з вихровою системою аерації, що являє собою реактор без відбиваючих перегородок з нижньопривідною турбінною мішалкою (рис. 3). Відсутність перегородок в реакторі призводить до утворення центрального вихору і закрученого потоку. Процес масопереносу в системі з вихровою аерацією сильно залежить від поведінки вихору. Основною умовою функціонування вихрової системи аерації є досягнення мішалкою певної критичної швидкості перемішування ( $N_{\text{крит.}}$ ), за якої вихор досягає дна реактора, що спричиняє утворення зони від'ємного тиску всередині вихору. Завдяки цьому відбувається всмоктування повітря з атмосфери в культуральне середовище і різке зростання коефіцієнту масопереносу  $K_{La}$  [Rao A., 2009]. Для досліджуваного ферментера  $N_{\text{крит.}}$  згідно з розрахунками становила  $450 \text{ хв}^{-1}$ .

Встановлено, що при вихровій системі аерації залежність швидкості розчинення кисню від швидкості обертів мішалки ( $N$ ) є лінійною за умови, що  $N > N_{\text{крит.}}$ . При цьому необхідна швидкість подачі кисню в даному випадку ( $1 \text{ кгO}_2/\text{м}^3 \cdot \text{год}^{-1}$ ) забезпечується вже за  $N = N_{\text{крит.}}$ .



1 – корпус, 2 – нижньопривідна мішалка; П – подача повітря

### Рисунок 3 – Принципова схема біореактора з вихровою системою аерації

Визначено вплив витрати повітря на аерацію на величину швидкості розчинення кисню у вихровому біореакторі. Результати показують, що необхідної подачі кисню в даній системі реактора з вихровою аерацією можна досягнути вже за витрати повітря на аерацію  $0,5 \text{ м}^3/(\text{м}^3 \cdot \text{хв})$ . Коефіцієнт використання кисню повітря в даному випадку буде становити 12 %.

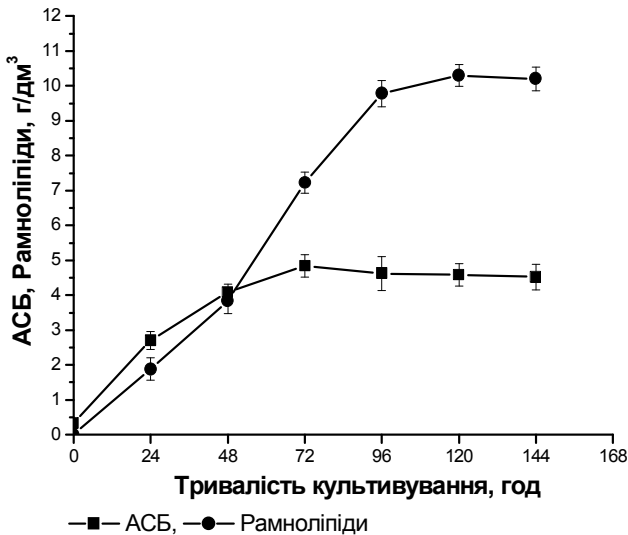


Рисунок 4 – Динаміка нагромадження біомаси та рамноліпідів штамом *Pseudomonas sp. PS-17* у ферментері з вихровою системою аерації

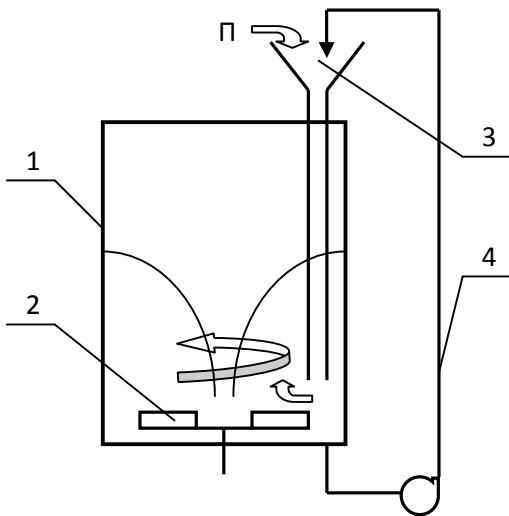
Показано, що запропонована конструкція ферментера забезпечує максимальне нагромадження цільового продукту  $10,3 \text{ г/дм}^3$ , що в 2,5 раза вище, ніж при культивуванні штаму в ферментері з барботером і перемішувальним пристроєм і в 1,7 раза вище, ніж при використанні ферментера з самовсмоктувальною мішалкою. Тривалість досягнення максимальної концентрації продукту в культуральному середовищі при цьому зменшується на 30 % та 20 % відповідно і становить 100 год (рис. 4).

Важливою перевагою вихрової системи аерації є ефективний контроль за піноутворенням, оскільки утворений тривимірний вихор засмоктує утворену піну і рівномірно розподіляє її по всьому об'єму культуральної рідини, що також забезпечує високу

швидкість подачі кисню в середовище. Це дозволяє досягти вищої питомої швидкості росту культури, а відповідно і виходу біомаси та біоПАР, а також вести процес без використання засобів піногасіння. Особливість ферментера даної конструкції дозволяє збільшити коефіцієнт заповнення до 0,85, що є ефективним з економічної точки зору.

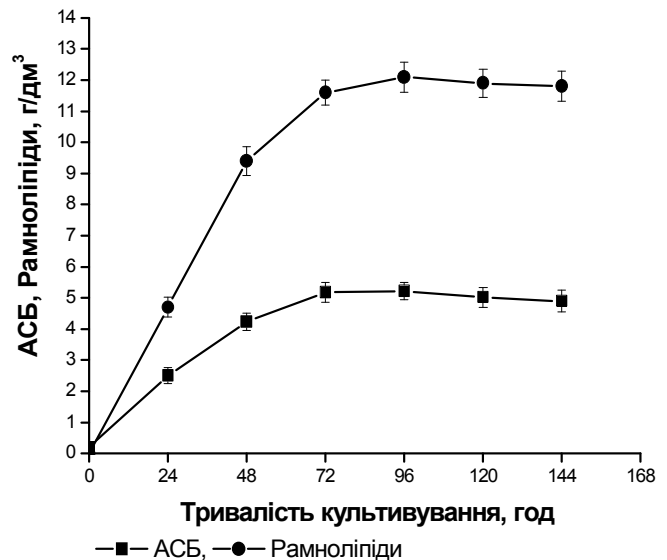
Для підвищення ефективності синтезу біоПАР штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 нами досліджено можливість поєднання інжекційної та вихрової систем аерації. Відомо, що використання інжекційної системи для подачі повітря в середовище дозволяє суттєво збільшити швидкість переносу кисню з газової фази в рідину, при цьому зменшується витрата повітря та енергії у порівнянні з традиційними системами аерації [Сидоров Ю.І., 2008], а також різко збільшується коефіцієнт масопередачі за киснем [Кислых В.И., 2000].

Біореактор з вихровою системою аерації був додатково обладнаний зовнішнім циркуляційним контуром (рис. 5). Визначено, що для забезпечення необхідної швидкості подачі кисню швидкість перекачування КР насосом через циркуляційний контур з інжектором повинна становити 40 дм<sup>3</sup>/год. За цих умов швидкість всмоктування повітря в інжекторі – 1 дм<sup>3</sup>/хв, що відповідає об'ємній витраті аераційного повітря 0,24 м<sup>3</sup>/(м<sup>3</sup>·хв). Отже, ефективність використання кисню повітря буде становити 25 %, що вдвічі більше, ніж при використанні вихрової системи аерації без інжектора (12 %).



1 – корпус, 2 – нижньопривідна мішалка, 3 – інжектор, 4 – циркуляційний контур; П – подача повітря

**Рисунок 5 – Принципова схема інжекційно-вихрового біореактора**



**Рисунок 6 – Динаміка накопичення біомаси та рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері з інжекційно-вихровою системою аерації**

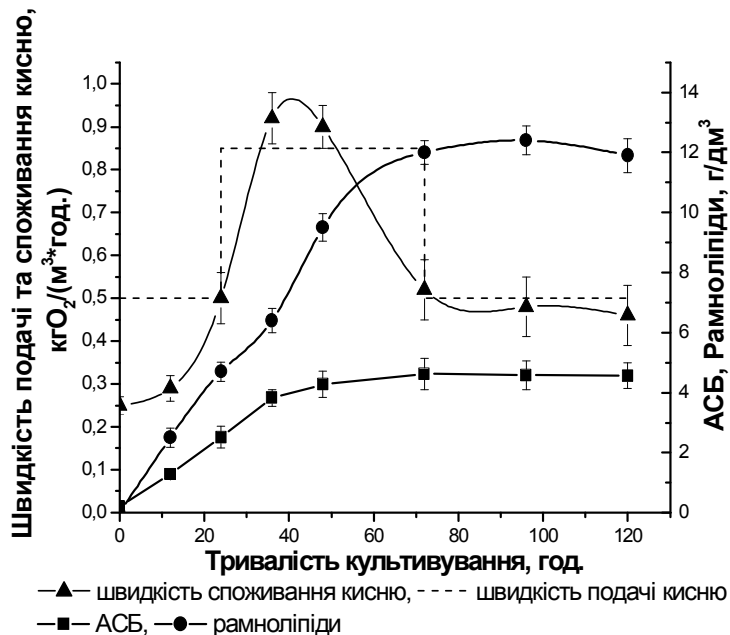
Встановлено, що запропонована конструкція ефективнішою для синтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 з усіх попередньо розглянутих: досягається найвища питома швидкість росту (0,22 год<sup>-1</sup>), найбільша

продуктивність за рамноліпідами ( $0,196 \text{ г/дм}^3 \cdot \text{год}^{-1}$ ), час культивування скорочено до 90 год, максимальне нагромадження рамноліпідів становило  $12,1 \text{ г/дм}^3$  (рис. 6). Окрім цього досягається збільшення ефективності використання кисню повітря і, як наслідок, зменшення енергетичних затрат на роботу компресора для забезпечення аерації середовища. Отже, для подальших досліджень було обрано біореактор з інжекційно-вихровою системою аерації.

Оскільки кисень в процесі ферментації використовується для нагромадження біомаси та підтримки процесів життєдіяльності, тому в процесі росту культури потреба в забезпеченні киснем не є постійною і змінюється в залежності від фази росту. Запропонована конструкція інжекційно-вихрового ферментера дозволяє підтримувати постійну концентрацію розчиненого кисню в середовищі завдяки зміні швидкості проходження культуральної рідини через інжектор. З огляду на це, досліджено процес культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 за різного постійного рівня концентрації розчиненого кисню в КР. Концентрацію розчиненого кисню протягом всього процесу ферментації підтримували на рівні 2, 4 і  $6 \text{ мг/дм}^3$ , що відповідало 26, 53 і 79 % від насичення для заданих умов. Встановлено, що нагромадження біомаси та рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 не залежить від концентрації кисню в КР в межах 2 –  $6 \text{ мг/дм}^3$  (25 – 80 % від насичення), а мінімальна та максимальна інгібувальні концентрації кисню імовірно знаходяться поза даними межами.

З метою оптимізації біосинтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 та зменшення енергозатрат на аерацію середовища досліджено ефективність керованої подачі кисню у реакторі з інжекційно-вихровою системою аерації. Експериментально визначено, що на початку культивування бактерій потреба у кисні постійно зростає і досягає максимуму -  $1 \text{ кг O}_2/(\text{м}^3 \cdot \text{год})$  на 24 – 48 год ферментації. У подальшому швидкість споживання кисню зменшується до  $0,5 \text{ кг O}_2/(\text{м}^3 \cdot \text{год})$  і залишається незмінною до кінця ферментації.

У наших дослідженнях подача кисню в середовище впродовж ферментації відбувалася у три стадії і регулювалася зміною продуктивності циркуляційного насоса, що прокачував культуральну рідину через інжектор. Перші 24 год ферментації швидкість подачі кисню становила  $0,5 \text{ кг O}_2/(\text{м}^3 \cdot \text{год})$ , чого було достатньо для забезпечення киснем культури на цій стадії росту. Потім швидкість подачі кисню збільшували до  $0,85 \text{ кг O}_2/(\text{м}^3 \cdot \text{год})$  і підтримували на цьому значенні з 24-ї до 72-ї години культивування. Далі з 72 год і до кінця ферментації подачу кисню знову знижували до рівня  $0,5 \text{ кг O}_2/(\text{м}^3 \cdot \text{год})$ . За такого режиму аерації в момент максимальної потреби в кисні (36 – 48 год) його забезпечення стає недостатнім і культура переходить в стаціонарну фазу росту [Лі Х.-Л., 2009]. Разом з цим спостерігається зростання швидкості утворення цільового продукту – рамноліпідів (рис. 7). Даний ефект можна пояснити тим, що в умовах дефіциту кисню метаболічні процеси в мікробній клітині перемикаються на синтез вторинних метаболітів, одними з яких є рамноліпіди.



**Рисунок 7 – Динаміка нагромадження біомаси та рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері з інжекційно-вихровою системою аерації в умовах керованої подачі кисню**

Отже керована подача кисню в процесі ферментації дозволила збільшити максимальну продуктивність культури на 30 % та її ПАР-синтезувальну здатність на 16 %, а також зменшити енергозатрати на аерацію середовища на 30 %.

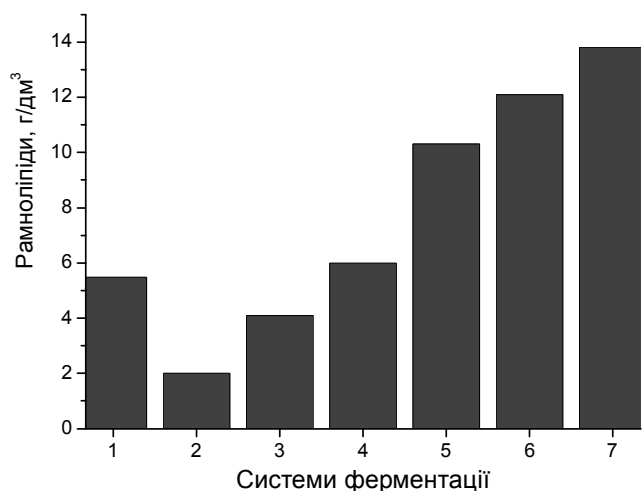
Досліджено вплив способу приготування посівного матеріалу на синтез рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17. Використання інокуляту з кінця експоненційної фази росту (36 год) дозволило зменшити тривалість лаг-фази, збільшити нагромадження кінцевого продукту ( $13,0 \text{ г/дм}^3$ ), а також скоротити тривалість ферментації до 80 год. Внесення посівного матеріалу в кількості, меншій ніж 7 %, призводило до зменшення нагромадження рамноліпідів та збільшення тривалості ферментації в цілому. Збільшення кількості інокуляту до 15 % не спричиняло відчутних змін у нагромадженні рамноліпідів. Максимальна ПАР-синтезувальна здатність штаму ( $2,83 \text{ г/г}$ ) досягалася при використанні посівного матеріалу після 36 год культивування у кількості 7 % від об'єму поживного середовища.

Встановлено, що оптимальні температурні режими для росту культури і синтезу біоПАР є різними і становлять 34 та 30 °С відповідно. Показано ефективність застосування двостадійного температурного режиму для процесу синтезу біоПАР. Перші 36 год ферментації в КР підтримували температуру 34 °С, оптимальну для інтенсивного нагромадження біомаси, далі на протязі 4 год температуру поступово знижували до 30 °С і продовжували ферментацію при цій температурі, оптимальній для біосинтезу рамноліпідів. Описаний двостадійний температурний режим ферментації дозволив збільшити максимальну продуктивність культури та нагромадження цільового продукту до  $13,8 \text{ г/дм}^3$ , а також зменшити загальну тривалість процесу культивування до 70 год.

Встановлено також, що для одержання інокуляту з максимальною кількістю біомаси доцільно проводити ферментацію з контролюванням рН середовища на рівні 7,0. У той же час для максимального нагромадження

рамноліпідів оптимальним є рН середовища 8,2 – 8,4, яке досягається в процесі росту штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 і додаткової регуляції не потребує.

Проведено порівняльний аналіз нагромадження цільового продукту за різних умов культивування (рис. 8).



**Рисунок 8 – Нагромадження рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у різних системах ферментації**

1 – у колбах, 2 – барботажно-аерліфтний ферментер, 3 – ферментер з барботером і мішалкою, 4 – ферментер з самовсмоктувальною мішалкою, 5 – вихровий ферментер, 6 – інжекційно-вихровий ферментер, 7 – інжекційно-вихровий ферментер з оптимізованими умовами культивування

Показано, що використання вихрового ферментера дозволило збільшити нагромадження рамноліпідів на 87 % відносно культивування у колбах та на 151 % у порівнянні з ферментером з барботером і мішалкою, застосування інжекційно-вихрової системи аерації підвищило цей показник ще на 17 %, а оптимізація умов культивування – ще на 14 %.

**Розділ 5. Технологія одержання поверхнево-активних продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17.** На основі отриманих результатів нами розроблено технологію промислового виробництва поверхнево-активних продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. У залежності від галузі можливого практичного застосування запропоновано одержання чотирьох різних форм цільового продукту: термічно оброблена КР (1) та супернатант КР (2), суміш поверхнево-активних ліпідів (3) та окрема дирамноліпідна фракція (4). Технологія заснована на використанні ферментера з інжекційно-вихровою системою аерації. Даний ферментер може бути легко сконструйований на основі реактора з нижньопривідною мішалкою. Технологічна лінія виробництва може бути виконана з використанням стандартного обладнання на існуючих біотехнологічних виробництвах.

Технологічний процес одержання поверхнево-активних продуктів *Pseudomonas* sp. PS-17 складається із допоміжних стадій (санітарна підготовка виробництва, підготовка стерильного технологічного повітря та поживного середовища), стадії основного технологічного процесу (товарна ферментація та біосепарація цільового продукту) та стадій пакування та маркування готового продукту.



## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично обґрунтовано та практично вирішено важливе наукове завдання, що полягає у розробленні технології синтезу поверхнево-активних рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері. Використання таких шляхів вдосконалення технологій мікробного синтезу, як оптимізація поживних середовищ та умов культивування, а також вибір оптимальної конструкції біореактора, дало змогу підвищити синтез рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у 3,4 раза порівняно з класичною технологією.

1. Встановлено можливість інтенсифікації синтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 за допомогою математичного моделювання складу поживного середовища із застосуванням методу адитивно-решітчастих рівнянь. В умовах росту штаму на поживному середовищі оптимізованого складу кількість синтезованих рамноліпідів зростала на 57 % (5,5 г/дм<sup>3</sup>), а біомаси на 24 % (3,6 г/дм<sup>3</sup>) порівняно з культивуванням на вихідному поживному середовищі.

2. Встановлено ефективність використання інтегрального стехіометричного рівняння ферментації для складання матеріального балансу та розрахунку критеріїв масштабування процесу біосинтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17. Теоретично розраховано максимальну швидкість споживання кисню 1 кг O<sub>2</sub>/(м<sup>3</sup>·год) штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 та необхідний для її забезпечення об'ємний коефіцієнт масопереносу за киснем 125 год<sup>-1</sup>.

3. Визначено оптимальні параметри вирощування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 у колбах. Максимальний синтез рамноліпідів (5,5 г/дм<sup>3</sup>) відзначався за коефіцієнту заповнення колби – 0,2, швидкості обертів лабораторного шейкера – 220 хв<sup>-1</sup> за амплітуди – 20 мм.

4. Вперше встановлено, що наявність у середовищі поверхнево-активних рамноліпідів у кількості 1,0 г/дм<sup>3</sup> і більше призводить до зростання коефіцієнта масопереносу за киснем на 30 % по відношенню до початкового.

5. Здійснено порівняльний аналіз ефективності використання ферментерів різних типів для біосинтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17. Вперше показано можливість біосинтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 без контролю за піноутворенням за допомогою біореактора з вихровою системою аерації.

6. Вперше встановлено можливість біосинтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 в системі інжекційно-вихрового біореактора. Визначено оптимальні умови для біосинтезу рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 в даній системі біореактора: посівний матеріал з експоненційної фази росту (36 год) в кількості – 7 % (об.); двостадійний температурний режим (34 і 30 °С); керована подача кисню на аерацію (0,5 і 0,85 кг O<sub>2</sub>/(м<sup>3</sup>·год), що дозволило одержати 13,8 г/дм<sup>3</sup> рамноліпідів через 70 год культивування.

7. Розроблено технологічну та апаратурно-технологічну схему промислового виробництва поверхнево-активного продукту штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 із використанням інжекційно-вихрового біореактора.

Дана технологія дозволяє одержати чотири форми поверхнево-активного продукту в залежності від галузей практичного застосування.

8. Теоретичний розрахунок вартості 1 кг готової продукції рамноліпідів у вигляді культуральної рідини становить 1944 грн, що у 2 рази менше за вартість аналогічного продукту на світовому ринку (3900 грн.). Це свідчить про значну економічну перевагу запропонованої технології.

## СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дослідження росту та синтезу цільового продукту штамом *Pseudomonas species PS-17* – продуцентом позаклітинних біосурфактантів / В.А. Єрохін, Т.Я. Покинсьброда, О.В. Карпенко, В.П. Новіков // Вісник Національного університету „Львівська політехніка”. – 2006. – № 553. – С. 124-127.

*Особистий внесок дисертанта: досліджено динаміку росту та синтезу ПАР Pseudomonas sp. PS-17 на середовищі з гліцерином, олією та їх сумішшю.*

2. Єрохін В.А. Поверхнево-активні препарати на основі продуктів біосинтезу штаму *Pseudomonas sp. PS-17* / В.А. Єрохін, Т.Я. Покинсьброда, О.В. Карпенко // Наукові праці Донецького національного технічного університету. – 2008. – №134 (10). – С. 111-117.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження ефективних методів одержання різних продуктів біоПАР Pseudomonas sp. PS-17 різного ступеня чистоти, а також розроблення методу виділення окремих рамноліпідних фракцій шляхом адсорбційної хроматографії.*

3. Застосування методів математичного моделювання для визначення оптимальних умов мікробного синтезу поверхнево-активних речовин / В.А. Єрохін, О.В. Карпенко, Т.Я.Покинсьброда, В.І. Лубенець // Вісник Національного університету „Львівська політехніка”. – 2008. – № 609. – С. 135-140.

*Особистий внесок дисертанта: проведення математичних розрахунків для визначення оптимальних концентрацій компонентів поживного середовища, що забезпечують максимальні показники нагромадження біомаси та синтезу рамноліпідів Pseudomonas sp. PS-17.*

4. Єрохін В. Дослідження впливу аерації на процес культивування штаму *Pseudomonas sp. PS-17* – продуцента поверхнево-активних речовин / Володимир Єрохін, Олена Карпенко // Наукові праці Донецького національного технічного університету. – 2012. – № 18 (198). – С. 123-133.

*Особистий внесок дисертанта: проведення математичних розрахунків для визначення критеріїв масштабування процесу ферментації, визначення оптимальних параметрів аерації при культивування Pseudomonas sp. PS-17 у ферментері з інжекційно-вихровою системою аерації.*

5. Застосування вихрового ферментера для одержання продуктів мікробного синтезу / О.В. Карпенко, В.А. Єрохін, М.В. Пристай, О.М. Шульга // Вопросы химии и химической технологии. – 2012.– № 2. – С.34-39.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження нагромадження біомаси та синтезу рамноліпідів Pseudomonas sp. PS-17 в біореакторі з вихровою системою аерації.*

6. Yerokhin V. Optimization of parameters of biosynthesis of surface-active rhamnolipids by the strain *Pseudomonas sp. PS-17* in the bioreactor with injection-vortex aeration system / V. Yerokhin, O. Karpenko, E. Karpenko // Journal of microbiology research. – 2014. – Vol.4. – № 1. – P. 1–5. (Видавництво Scientific & Academic Publishing, USA).

*Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу концентрації розчиненого кисню, посівного матеріалу, температури та рН середовища на синтез рамноліпідів Pseudomonas sp. PS-17.*

7. Методи отримання поверхнево-активних ліпідів для нових фармпрепаратів / В.А. Єрохін, О.В. Карпенко, Н.С.Щеглова, Т.Я. Покинсьброда, Р.І. Вільданова-Марцишин, В.І. Лубенець, В.П. Новіков, М. Солтис // „Біотехнологія. Освіта. Наука”: II Всеукраїнська науково-практ. конф., 6 – 8 жовтня 2004 р.: тези допов. – Львів, 2004 р.– С. 83.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження ефективності екстракції рамноліпідів з культуральної рідини різними розчинниками.*

8. Mathematical modeling and optimization of methabolic process in biotechnology / E. Karpenko, H. Hafiychuk, T. Pokynbroda, V. Erohin // Annual conference in Ukraine. Statistical physics 2005: modern problems and new applications. 28 - 30 august 2005.: Book of abstracts. – Lviv, Ukraine, 2005. – P. 140.

*Особистий внесок дисертанта: проведення математичних розрахунків для визначення оптимальних концентрацій компонентів поживного середовища Pseudomonas sp. PS-17.*

9. Єрохін В.А. Застосування методів математичного моделювання для визначення оптимальних умов для мікробного синтезу поверхнево активних речовин / В.А. Єрохін, Т.Я. Покинсьброда, О.В. Карпенко // “Молодь і поступ біології”: II міжн. наук. конф. студ. і асп., 21 – 24 березня 2006 р.: тези допов. – Львів, 2006. – С. 291.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу біомаси та рамноліпідів Pseudomonas sp. PS-17 на середовищах отриманих внаслідок математичного моделювання.*

10. Розробка методу виділення біоПАР з культуральної рідини *Pseudomonas sp. PS-17* / В.А. Єрохін, Т.Я. Покинсьброда, О.В. Карпенко, В.П. Новіков // “Біотехнологія. Наука. Практика”: III Всеукр. научно-практ. конф. с межд. участ., 18 – 20 октября 2006 г.: тезисы докл. – Харьков, 2006. – С. 111.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження оптимальних умов осадження полісахарид-ліпідного комплексу Pseudomonas sp. PS-17 з подальшим виділенням рамноліпідів.*

11. Єрохін В. Отримання поверхнево-активних продуктів мікробіологічного синтезу на основі гліколіпідів / Володимир Єрохін, Олена Карпенко // “Молодь і поступ біології”: III міжн. наук. конф. студ. і асп., 23 – 27 квітня 2007 р.: тези допов. – Львів, 2007. – С.346-347.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження виділення різних форм цільового продукту біоПАР Pseudomonas sp. PS-17 в залежності від галузі їх застосування.*

12. Зміна проникності клітинних мембран під впливом біогенних поверхнево-активних речовин / Т.Я. Покинсьброда, М.В. Пристай, В.А. Єрохін, О.В. Карпенко // “Молодь і поступ біології”: V міжн. наук. конф. студ. і асп., 12 – 15 травня 2009 р.: тези допов. – Львів, 2009. – С.197 – 198.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу рамноліпідів на проникність клітинних мембран тестових культур мікроорганізмів.*

13. Єрохін В. Особливості біосинтезу мікробних поверхнево-активних речовин в умовах біореактора гліколіпідів / Володимир Єрохін, Олена Карпенко // “Молодь і поступ біології”: V міжн. наук. конф. студ. і асп., 12 – 15 травня 2009 р.: тези допов. – Львів, 2009. – С.112 – 113.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу рамноліпідів та контролю за піноутворенням Pseudomonas sp. PS-17 в умовах біореактора з барботажною системою аерації.*

14. Єрохін В. Дослідження ефективності застосування біореакторів різних моделей для культивування продуцентів поверхнево-активних речовин / Володимир Єрохін, Олена Карпенко // “Молодь і поступ біології”: VI міжн. наук. конф. студ. і асп., 21 – 24 березня 2010 р.: тези допов. – Львів, 2010. – С.83 – 84.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження нагромадження біомаси та рамноліпідів Pseudomonas sp. PS-17 в біореакторах з різними системами аерації та перемішування.*

15. Єрохін В. Оптимізація параметрів культивування штаму Pseudomonas sp. PS-17 в умовах біореактора / Володимир Єрохін, Олена Карпенко // “Перспективи та напрямки сучасної біотехнології”: науково-практ. сем., 14 – 15 жовтня 2011 р.: тези допов. – Київ, 2011. – С.35 – 36.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу аерації, температури та рН середовища на синтез рамноліпідів Pseudomonas sp. PS-17 в інжекційно-вихровому ферментері.*

16. Застосування вихрового ферментера для одержання продуктів мікробного синтезу / М.В. Пристай, В.А. Єрохін, О.М. Шульга, О.В. Карпенко // “Перспективи та напрямки сучасної біотехнології”: науково-практ. сем., 14-15 жовтня 2011 р.: тези допов. – Київ, 2011. – С.120 – 121.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу системи вихрової аерації на синтез рамноліпідів Pseudomonas sp. PS-17 у ферментері.*

## АНОТАЦІЯ

**Єрохін В.А. Біотехнологія поверхнево-активних рамноліпідів штаму Pseudomonas sp. PS-17 у ферментері. – На правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний університет харчових технологій, МОН України, Київ, 2014.

Дисертаційна робота присвячена розробленню технології синтезу поверхнево-активних речовин штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 у ферментері.

Розроблено оптимальний склад поживних середовищ шляхом математичного моделювання з використанням адитивно-решітчастих рівнянь для синтезу біомаси та рамноліпідів штамом *Pseudomonas* sp. PS-17.

Визначено кінетичні параметри ферментації, складено матеріальний баланс процесу і на його основі розраховано показники для масштабування процесу в умовах біореактора.

Проаналізовано динаміку росту штаму і синтезу продукту в різних системах ферментації. Вперше показано ефективність культивування *Pseudomonas* sp. PS-17 у системі інжекційно-вихрового біореактора. Дана система дозволяє ефективно контролювати процес піноутворення, що є важливою проблемою виробництва позаклітинних ПАР. Визначено оптимальні умови культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, що забезпечило підвищення виходу ПАР у 3,4 раза та зменшення часу культивування на 40 %.

Встановлено, що керована подача кисню в процесі ферментації дозволяє збільшити максимальну продуктивність культури на 30 %, а також зменшити енергозатрати на аерацію середовища на 30 %.

Розроблено технологію одержання поверхнево-активних продуктів штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 із використанням ферментера інжекційно-вихрової системи. Запропоновано принципову технологічну та апаратурно-технологічну схеми їх виробництва. Дана технологія може бути рекомендована для виробництва позаклітинних поверхнево-активних продуктів мікробного синтезу.

**Ключові слова:** *Pseudomonas*, поверхнево-активні речовини, ферментер, системи аерації, біотехнологія.

## АННОТАЦІЯ

**Ерохин В.А. Биотехнология поверхностно-активных рамнолипидов штамма *Pseudomonas* sp. PS-17 в ферментере. – На правах рукописи.**

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный университет пищевых технологий МОН, Киев, 2014.

Диссертационная работа посвящена разработке технологии синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) штаммом *Pseudomonas* sp. PS-17 в ферментере.

Разработан оптимальный состав питательных сред путем математического моделирования с использованием аддитивно-решётчатых уравнений для синтеза биомассы и рамнолипидов штаммом *Pseudomonas* sp. PS-17. Это позволило увеличить количество биомассы бактерий на 24 %, количество рамнолипидов на 54 %, причем ПАВ-синтетическая способность культуры увеличилась на 21 % по сравнению с культивированием бактерий на неоптимизированной питательной среде.

Показана возможность использования интегрального стехиометрического уравнения ферментации для составления материального баланса и расчета

критериев масштабирования процесса биосинтеза рамнолипидов *Pseudomonas* sp. PS-17. На основе полученных результатов рассчитана теоретическая потребность культуры в кислороде, которая составила 1 кг  $O_2/(m^3 \cdot \text{час})$  и определен необходимый для ее обеспечения объемный коэффициент массопереноса  $K_{La} = 125 \text{ ч}^{-1}$ .

Определены оптимальные параметры выращивания штамма *Pseudomonas* sp. PS-17 в колбах: коэффициент заполнения - 0,2, скорость оборотов лабораторной качалки -  $220 \text{ мин}^{-1}$ , амплитуда - 20 мм, продолжительность культивирования - 120 ч., максимальное накопление продукта -  $5,5 \text{ г/дм}^3$  рамнолипидов.

Установлено, что наличие в среде рамнолипидов в количестве  $1,0 \text{ г/дм}^3$  и более увеличивало коэффициент массопереноса по кислороду на 30 %. Показано, что рамнолипиды можно использовать в качестве агентов для переноса кислорода в культуральную жидкость в процессах, требующих интенсивной аэрации.

Проанализирована динамика роста штамма и синтеза поверхностно-активного продукта в различных системах ферментации. Определены основные преимущества и недостатки использования каждого вида ферментера.

Исследована эффективность использования различных систем пеногашения в процессе биосинтеза рамнолипидов штаммом *Pseudomonas* sp. PS-17. Показано, что механические системы пеногашения являются недостаточно эффективными и не обеспечивают необходимый контроль уровня пенообразования в процессе ферментации. Проанализировано также влияние ряда химических пеногасителей на процесс культивирования штамма *Pseudomonas* sp. PS-17. Показано, что все исследованные пеногасители проявляют ингибирующее действие на рост культуры и вызывают существенное снижение накопления рамнолипидов.

Впервые показана эффективность культивирования *Pseudomonas* sp. PS-17 в ферментере с вихревой системой аэрации. Данная система позволяет эффективно контролировать процесс пенообразования, что является важной проблемой производства внеклеточных ПАВ, а также повысить эффективность использования объема ферментера к коэффициенту заполнения - 0,85.

Основным условием функционирования вихревой системы аэрации является достижение мешалкой определенной критической скорости перемешивания, при которой вихрь достигает дна реактора, что создает условия для образования зоны отрицательного давления в середине вихря. Благодаря этому происходит всасывание воздуха из атмосферы в культуральную среду и резко возрастает коэффициент массопереноса.

Определены оптимальные условия культивирования штамма *Pseudomonas* sp. PS-17 при использовании ферментера инжекционно-вихревой системы, что обеспечило повышение выхода ПАВ в 3,4 раза и уменьшение времени культивирования на 40 %.

Установлено, что управляемая подача кислорода в процессе ферментации позволяет увеличить максимальную производительность культуры на 30 %, а также уменьшить энергозатраты на аэрацию среды на 30 %.

Установлено, что оптимальный температурный режим для роста культуры и синтеза рамнолипидов отличаются и составляют соответственно 34 и 30 °С.

Разработана технология получения поверхностно-активных продуктов штамма *Pseudomonas* sp. PS-17 с использованием ферментера инъекционно-вихревой системы. Предложена принципиальная технологическая и аппаратурно-технологическая схемы их производства. Показана возможность получения нескольких форм поверхностно-активного продукта на основе культивирования штамма *Pseudomonas* sp. PS-17, а именно: термически обработанных культуральной жидкости и супернатанта культуральной жидкости, липидного экстракта и отдельных рамнолипидных фракций в зависимости от области применения. Предложена методика получения отдельных рамнолипидных фракций путем адсорбционной хроматографии на колонке с силикагелем. Данная технология апробирована в опытно-промышленных условиях на ЧАО «Компания Энзим» и может быть рекомендована для производства внеклеточных поверхностно-активных продуктов микробного синтеза.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas*, поверхностно-активные вещества, ферментер, системы аэрации, биотехнология.

## SUMMARY

**Yerokhin V.A. Biotechnology of the surface-active substances by strain *Pseudomonas* sp. PS-17 in fermenter. – Manuscript.**

Dissertation for the degree of Candidate of Technical Sciences in speciality 03.00.20 – Biotechnology. – National University of Food Technologies, MES of Ukraine, Kyiv, 2014.

The dissertation thesis is devoted to development of technologies of synthesis of the surface-active substances by strain *Pseudomonas* sp. PS-17 in the fermenter.

For the first time the effectiveness of cultivation of *Pseudomonas* sp. PS-17 in the injection-vortex bioreactor system was shown. This system can effectively control the foaming process during the fermentation, which is the serious problem of production of extracellular biosurfactants.

The optimum conditions for cultivation the strain *Pseudomonas* sp. PS-17 has been determined. These factors increase the yield of surfactant at 3,4 times and reducing the time of cultivation by 40 %.

The technology of surface-active products by strain *Pseudomonas* sp. PS-17 in fermenter with injection-vortex system has been developed. This technology can be recommended for the production of extracellular surface-active products of microbial synthesis.

**Keywords:** *Pseudomonas*, biosurfactants, fermenter, aeration system, biotechnology.