

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

**ІГНАТЕНКО СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ**

**УДК 759.873.088.5:661.185**

**РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ПЕРІОДИЧНОГО  
КУЛЬТИВУВАННЯ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ЕК-1 –  
ПРОДУЦЕНТА ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

*03.00.20 – біотехнологія*

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

**Київ - 2014**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій Міністерства освіти і науки України

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор **Пирог Тетяна Павлівна**, Національний університет харчових технологій, завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

**Офіційні опоненти:** доктор технічних наук, професор **Горобець Світлана Василівна**, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», завідувач кафедри біоінформатики

доктор біологічних наук, професор **Курдиш Іван Кирилович**, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України, завідувач відділу мікробіологічних процесів на твердих поверхнях

Захист відбудеться «29» жовтня 2014 р. о 12 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 ознайомитись у бібліотеці Національного університету харчових технологій за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 68.

Автореферат розісланий «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Н.О. Бублієнко

### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) та емульгатори використовуються у багатьох галузях народного господарства, зокрема для підвищення нафтовидобутку, надання специфічних смакових і структурних властивостей продуктам харчування, створення нових високоефективних форм фармацевтичних препаратів, а також у процесах біоремедіації екосистем. Такого широкого застосування мікробні ПАР набули завдяки біодеградабельності, низькій токсичності, стабільності фізико-хімічних властивостей у широкому діапазоні рН та температур тощо.

Здатність до синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями виявлена у багатьох мікроорганізмів, проте рівень накопичення цих речовин коливається в широких межах як для різних продуцентів, так і для одного продуцента в різних умовах його культивування. Створення високоефективних технологій таких метаболітів вимагає розроблення підходів до регуляції процесу біосинтезу, що в свою чергу потребує глибоких знань фізіології продуцента, визначення складу синтезованих метаболітів та оптимальних умов для їх утворення. В Україні досі не існує промислового виробництва таких препаратів, а їх вивчення проводять окремі дослідницькі лабораторії. Переважно такі дослідження обмежуються селекцією перспективних продуцентів ПАР у лабораторних умовах без масштабування процесу біосинтезу – необхідного етапу для створення завершених промислових технологій.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота включає дослідження, виконані згідно плану науково-дослідних робіт кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій за темами “Розробка та удосконалення мікробіологічних та біохімічних процесів в біотехнології та охорона навколишнього середовища” (2001–2005 рр.) та “Розроблення новітніх біотехнологій у мікробіологічній, фармацевтичній, харчовій промисловості та охороні довкілля” (2006–2010 рр.), а також у рамках проекту Міністерства освіти і науки України «Розробка екологічно безпечного комплексного мікробного препарату для очищення довкілля від нафти і нафтопродуктів» (2006–2007 рр.), № державної реєстрації 0106U006888.

**Мета і задачі дослідження.** Мета роботи – розробка технології біосинтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями під час періодичного культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 у ферментері АК-210.

Для виконання роботи необхідно було виконати такі завдання:

дослідити динаміку синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на гідрофобних і гідрофільних субстратах;

встановити оптимальний для синтезу ПАР спосіб приготування посівного матеріалу;

дослідити вплив способу подачі субстрату, рН, температури, концентрації розчиненого кисню на синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 у лабораторному ферментері АК-210;

визначити хімічний склад ПАР, синтезованих у процесі періодичного культивування *R. erythropolis* ЕК-1 у ферментері АК-210, та дослідити їх біодеградабельність;

розробити технологічний регламент одержання ПАР;

дослідити ефективність використання ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 для очищення забрудненої нафтою води.

*Об'єкт дослідження* – штам *R. erythropolis* ЕК-1, депонований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ за номером ІМВ Ас-5017 та мікробні поверхнево-активні речовини.

*Предмет дослідження* – процес синтезу поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 у лабораторному ферментері АК-210, очищення води від нафти.

**Методи дослідження.** Під час виконання дисертаційної роботи використовували такі методи досліджень: мікробіологічні (визначення морфолого-культуральних ознак бактерій, біодеградабельності ПАР та кількості життєздатних мікробних клітин); біотехнологічні (культивування мікроорганізмів, дослідження ефективності біодеструкції); фізико-хімічні методи (визначення поверхневого натягу, концентрації ПАР і біомаси, індексу емульгування, рН, концентрації нафти у воді); хімічні (визначення хімічного складу ПАР методом тонкошарової хроматографії); математичні методи (статистична обробка результатів досліджень).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Розроблено фізіологічні основи регуляції синтезу метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями під час культивування *R. erythropolis* ЕК-1 у лабораторному ферментері АК-210.

Показано, що дробне внесення гексадекану у середовище культивування *R. erythropolis* ЕК-1 забезпечує підвищення показників синтезу ПАР у 6 разів порівняно з одноразовим внесенням субстрату. Встановлено оптимальну для синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 концентрацію гексадекану (1 %, об'ємна частка) у середовищі для одержання інокуляту. Показано, що культивування штаму ЕК-1 за високих значень концентрації розчиненого кисню ( $pO_2$  60–70 % від насичення повітрям) супроводжується підвищенням концентрації синтезованих ПАР майже у 5 разів порівняно з показниками синтезу у процесі вирощування цих бактерій за  $pO_2$  20–30 %. Встановлено можливість зміни спрямованості процесів конструктивного метаболізму у бік біосинтезу метаболітів з поверхнево-активними чи емульгувальними властивостями зміною рН середовища.

Визначено, що інтенсифікація деструкції нафти за присутності препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 у вигляді культуральної рідини зумовлена як участю у цьому процесі самого продуцента, так і активізацією природної нафтоокиснювальної мікробіоти під впливом екзогенних поверхнево-активних речовин.

**Практичне значення одержаних результатів.** Здійснено масштабування процесу біосинтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на гексадекані і визначено оптимальні параметри процесу культивування продуцента у лабораторному ферментері АК-210 (дробне внесення субстрату; рН 8,0; температура вирощування – 28 °С; концентрація розчиненого кисню 60–70 % від насичення повітрям). Порівняно з вихідною розроблена технологія дає змогу скоротити тривалість культивування у 3,5 рази (до 48 год), підвищити у 2 рази кількість синтезованих позаклітинних ПАР і їх вихід від субстрату. На основі розробленої технології складено тимчасовий технологічний регламент та апаратурну схему виробництва препарату ПАР *R. erythropolis* ЕК-1.

Розроблена технологія захищена патентом України на винахід № 84803 (2008 р.) та трьома патентами на корисну модель –№ 16721 (2006 р.), № 25948 (2007 р.), № 52821 (2010).

Розроблено ефективний спосіб очищення води від нафти з використанням низьких концентрацій (5 %) препарату ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини, використання якого забезпечує деструкцію 93 % нафти (за початкової концентрації 2,6 г/л) упродовж 20–25 діб.

Розроблена технологія очищення води від нафти була апробована на базі ПАТ «НВК «НАУКА» з використанням модельних водоймищ та за умов максимально наближених до реальних і довела свою високу ефективність порівняно з існуючими аналогами. Ефективність технології та достовірність отриманих результатів підтверджено Актом апробації способу очищення води від нафти.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною роботою автора. Експериментальна робота виконана особисто здобувачем. Дисертантом проаналізовано наукову літературу з даної проблеми, узагальнено отримані експериментальні дані, проведено порівняльний аналіз з існуючими літературними даними.

Автором особисто визначено показники росту і синтезу поверхнево-активних речовин (концентрація біомаси, поверхневий натяг, умовна концентрація ПАР, емульгувальні властивості, кількість синтезованих ПАР) при культивуванні *R. erythropolis* ЕК-1 у колбах та лабораторному ферментері АК-210; досліджено хімічний склад ліпідів, синтезованих нафтоокиснювальними бактеріями за оптимальних параметрів біосинтезу ПАР; визначено ступінь деструкції нафти у модельних водоймах за внесення препаратів ПАР. Розроблено технологічний регламент і апаратурну схему одержання ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на гексадекані, запропоновано біоциди та підібрані їх концентрації, що дають змогу подовжити термін зберігання ПАР.

Планування основних напрямів роботи, обговорення результатів та підготовка публікацій за результатами досліджень проходило за безпосередньої участі наукового керівника д.б.н., проф. Т.П. Пирог.

Відпрацювання методу визначення хімічного складу ПАР здійснювали спільно з к.х.н. Карпенко О.В. (Львівське відділення фізико-хімії і технології горючих копалин Інституту фізичної хімії НАН України). Налагодження та запуск ферментаційного обладнання, відпрацювання деяких технологічних

режимів здійснювали спільно з Тарасенко Д.О. (аспірант кафедри біотехнології мікробного синтезу НУХТ), який є співавтором наукових публікацій.

Ігнатенко С.В. отримав відзнаку учасника четвертого конкурсу науково-технічних проектів “Інтелектуальний потенціал молодих вчених – місту Києву” за проект у напрямі “Новітні біотехнології” (2005). Нагороджений грамотою (I місце) за кращу усну доповідь на другій Міжнародній конференції “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, 2006). Отримав відзнаку учасника третього міського конкурсу науково-дослідницьких робіт серед студентів та молодих вчених вищих навчальних закладів м. Києва „Інтелект молодих – на службу столиці” (2008).

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертації були представлені на 70-й, 71-й, 74-й і 75-й науковій конференції молодих вчених, аспірантів і студентів Національного університету харчових технологій (Київ, 2004, 2005, 2008, 2009); VI Національному з'їзді фармацевтів України “Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України” (Харків, 2005); IX Міжнародній науково-технічній конференції “Нові технології та технічні рішення в харчовій та переробній промисловості: сьогодення та перспективи” (Київ, 2005); II, III та IV Міжнародних наукових конференціях студентів та аспірантів “Молодь та поступ в біології” (Львів, 2006–2008); III і IV Всеукраїнській науково-практичній конференції “Біотехнологія. Наука. Освіта” (Харків, 2006; Дніпропетровськ, 2008); IX та X Українському біохімічному з'їзді (Харків, 2006; Одеса, 2010); Міжнародній конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, 2009); Всеукраїнському конгресі „Сьогодення і майбутнє фармації” (Харків, 2008); Національній науково-технічній конференції „Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно активних сполук та фармацевтичних препаратів” (Львів, 2008), Міжнародній науковій конференції «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Мінськ, 2008).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 24 наукові праці, із них – 6 статей, з яких 4 – у фахових виданнях, 2 – журналах наукометричної бази SCOPUS, 1 патент України на винахід, 3 патенти України на корисну модель, 13 тез доповідей.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота викладена на 188 сторінках машинописного тексту і складається із таких структурних частин: «Вступ», «Огляд літератури» (2 розділи), «Результати досліджень» (4 розділи), «Обговорення», «Висновки», «Список використаних джерел», який містить 148 посилань (з них 123 в іноземних виданнях), «Додатки». Робота містить 20 таблиць, 21 рисунок та 2 додатки.

## ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### Розділ 1. Вплив умов культивування на синтез мікробних поверхнево-активних речовин

Літературні дані свідчать про те, що синтез ПАР мікроорганізмами різних фізіологічних і таксономічних груп залежить від складу поживного середовища та ряду фізико-хімічних факторів, але ці дані мають розрізнений,

несистематизований характер і переважно потребують експериментальних підтверджень. Зокрема, невизначеним залишається вплив аерації та масообміну, рН середовища, режиму внесення субстрату на синтез ПАР бактеріями роду *Rhodococcus*. У літературі практично відсутні дані щодо культивування продуцентів ПАР у ферментаційному обладнанні, що перешкоджає переходу від класичних лабораторних досліджень до створення повноцінних промислових технологій.

## **Розділ 2. Ключові проблеми промислового одержання мікробних поверхнево-активних речовин**

Наведено літературні дані щодо стану і перспектив розвитку промислового виробництва мікробних поверхнево-активних речовин у світі. Показано, що собівартість мікробних ПАР є вищою порівняно з хімічними аналогами за рахунок низького виходу цільового продукту та високих витрат на його виділення та очищення. Використання дешевих субстратів, оптимізація складу поживного середовища та умов культивування, впровадження на виробництві ступінчастої схеми виділення ПАР може суттєво змінити існуючу ситуацію. Зниження собівартості цільового продукту може бути досягнуто також за умови використання нових штамів-надсинтетиків ПАР. Дослідження, спрямовані на вирішення цих проблем, є ключовими і пріоритетними у біотехнології мікробних ПАР.

## **ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА**

### **Розділ 3. Матеріали і методи досліджень**

**Об'єкти досліджень.** Основним об'єктом досліджень був штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, ізолюваний із забруднених нафтою зразків ґрунту. Штам депоновано у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ за номером ІМВ Ас-5017.

**Культивування *R. erythropolis* ЕК-1 у колбах.** Бактерії вирощували на рідких мінеральних середовищах такого складу (г/дм<sup>3</sup>): **середовище 1** – NaNO<sub>3</sub> – 1,3; NaCl – 1,0; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,14; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,1; рН 6,8 – 7,0; **середовище 2** – мінеральне середовище наведеного вище складу, в яке вносили FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,001; рН 6,8 – 7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовували гексадекан та етанол в концентрації 2 % (об'ємна частка).

Культивування бактерій здійснювали в колбах на качалці (300 об/хв) за температури 28 °С.

Для визначення впливу різних режимів масообміну на синтез ПАР бактерії вирощували в таких умовах: 1) швидкість перемішування 150 об/хв, колби об'ємом 250 см<sup>3</sup> з 100 см<sup>3</sup> середовища; 2) швидкість перемішування 300 об/хв, колби об'ємом 750 см<sup>3</sup> з 100 см<sup>3</sup> середовища.

Як посівний матеріал використовували добову культуру *R. erythropolis* ЕК-1, вирощену на глюкозо-картопляному агарі (ГКА), а також культуру з ранньої експоненційної (24 год), середини експоненційної (48 год) і ранньої стаціонарної (72 год) фаз росту, вирощену на рідкому середовищі з гексадеканом (0,4; 0,7; 1,0 %). Кількість клітин в інокуляті стандартизували за показником оптичної густини клітинної суспензії з наступною перевіркою

шляхом висіву на ГКА за методом Коха. Встановлено, що за всіх досліджуваних концентрацій гексадекану при отриманні інокуляту на 24-ту год росту культура перебувала на початку експоненційної, на 48-му год – в середині експоненційної, а на 72-гу год – на початку стаціонарної фази росту. У разі використання інокуляту, вирощеного на мінеральному середовищі, в різних дослідах його концентрація становила 5, 10 і 15 % від об'єму середовища.

**Культивування *R. erythropolis* ЕК-1 у ферментаторі АК-210.** Вирощування бактерій здійснювали на рідкому мінеральному *середовищі 2*. Як джерело вуглецю та енергії використовували гексадекан, який вносили дробно до кінцевої концентрації 2,4 % (об'ємна частка). При визначенні оптимального для синтезу ПАР режиму внесення субстрату початкова концентрація гексадекану становила 0,1, 0,2, 0,3 та 0,4 % (об'ємна частка); інтервал внесення порцій субстрату – 4, 5, 6 та 7 год, концентрація внесеного дробно гексадекану – 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 % (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру *R. erythropolis* ЕК-1 з ранньої та середини експоненційної фази, вирощену в колбах на качалках на рідкому *середовищі 2* з 0,3 та 1,0 % (об'ємна частка) гексадекану відповідно. Кількість посівного матеріалу становила 10 % від об'єму середовища.

Культивування бактерій здійснювали у ферментаторі АК-210 об'ємом 10 дм<sup>3</sup> (робочий об'єм 7 дм<sup>3</sup>). На початку процесу культивування швидкість перемішування становила 250 об/хв, витрати повітря 0,2 дм<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup> хв. У процесі культивування швидкість перемішування підвищували до 380 – 400 об/хв, а витрати повітря до 2 дм<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup> хв для підтримання концентрації розчиненого кисню (рО<sub>2</sub>) на рівні 20 – 80 % (від насичення повітрям).

Масообмінні характеристики ферментатора за різних режимів аерації та перемішування оцінювали за сульфїтним методом [Процессы и аппараты пищевых производств, 1986].

Під час вивчення впливу температури на синтез ПАР культивування *R. erythropolis* ЕК-1 здійснювали за температури 20, 25, 28 та 30° С.

Для визначення оптимального рН для синтезу ПАР бактерії вирощували за таких значень рН: 7,0; 7,5; 8,0; 8,5. У процесі культивування рН підтримували на заданому рівні підлужненням 1 н NaOH або підкисленням 1 н HCl.

**Визначення параметрів росту і синтезу поверхнево-активних речовин.** Кількість біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії (540 нм) з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу (АСБ) за калібрувальним графіком (у разі гомогенної суспензії) або ваговим методом (у разі утворення конгломератів клітин). Швидкість експоненційного росту ( $\mu$ ) визначали за формулою  $\mu = 2,3(\lg x_t - \lg x_0) / (t - t_0)$ , виходячи з початкової та кінцевої біомаси  $x_0$  та  $x_t$  у моменти часу  $t_0$  та  $t$  і виражали у год<sup>-1</sup>.

Кількість синтезованих позаклітинних поверхнево-активних речовин у супернатанті культуральної рідини визначали ваговим методом після екстракції модифікованою сумішшю Фолча (хлороформ:метанол:соляна кислота – 4:2:3), з наступним упарюванням органічного екстракту під вакуумом (0,5 атм) при 45–50° С. Для відокремлення клітин бактерій культуральну рідину центрифугували при 9000 об/хв упродовж 50 хв. Поверхневий натяг ( $\sigma_s$ ) визначали за методом

Вільгельмі [Абрамзон, 1988]. Для експрес-оцінки кількісного вмісту ПАР у супернатанті культуральній рідині використовували показник, названий “умовна концентрація ПАР” (ПАР\*) [Guerra-Santos, 1984], який визначали як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини у точці різкого зниження поверхневого натягу на графіку залежності  $\sigma_s$  від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає значенню показника умовної концентрації ПАР, який виражається у безрозмірних одиницях. Емульгувальні властивості (індекс емульгування,  $E_{24}$ ) культуральної рідини або її супернатанту визначали за методом, описаним у роботі [Cooper, 1987]. Як субстрати для емульгування використовували вазелінову та соняшникову олію. Вихід ПАР від заданого субстрату визначали як відношення кількості синтезованих ПАР ( $\text{г/дм}^3$ ) до заданої концентрації гексадекану ( $\text{г/дм}^3$ ) та виражали у відсотках.

**Визначення хімічного складу ліпідів.** Ліпіди екстрагували з супернатанту культуральної рідини модифікованою сумішню Фолча (хлороформ:метанол:соляна кислота – 4:2:3), з наступним упарюванням органічного екстракту під вакуумом (0,5 атм) при 45–50° С.

Якісний аналіз ліпідів проводили методом тонкошарової хроматографії на силуфолових пластинках DC-Alufolien Kieselgel 60 (“Merck”, Німеччина) в системах розчинників: полярна система–хлороформ–метанол–вода (65:15:2); неполярна система–гексан–діетиловий ефір (2:1). Для ідентифікації ліпідних фракцій використовували специфічні реагенти: пластинки фарбували спиртовим розчином фосфорномолібденової кислоти та парами йоду (загальні ліпіди), розчином нінгідрину (пептидоліпіди, або аміноліпіди), анісовим альдегідом і антроновим реактивом (гліколіпіди).

**Визначення біодеградабельності поверхнево-активних речовин.** Під час визначення біодеструкції метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями як препарат використовували стерильний супернатант культуральної рідини *R. erythropolis* ЕК-1.

При вивченні здатності мікроорганізмів різних таксономічних груп асимілювати ПАР як єдине джерело вуглецю та енергії використовували чисті культури бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Brevibacterium* sp БАР-4., *Streptomyces aureofaciens* Т-7), дріжджів (*Pichia pinus* ПБТ-5, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3, *Candida scottii* М-8), мікроміцетів (*Aspergillus niger* Р-3, *Penicillium nigricans* А-7) з колекції живих культур мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій. Мікроорганізми вирощували на супернатанті культуральної рідини *R. erythropolis* ЕК-1. Як посівний матеріал використовували дводобові культури вказаних мікроорганізмів, вирощені на ГКА (дріжджі, мікроміцети) або МПА (бактерії).

Здатність бактерій, грибів і дріжджів асимілювати ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 як єдине джерело вуглецю і енергії оцінювали за такими показниками: чисельність мікроорганізмів ( $\text{КУО/см}^3$ ), яку визначали за методом Коха на МПА та ГКА та умовна концентрація ПАР.

Для вивчення здатності досліджуваних бактерій, грибів і дріжджів синтезувати ПАР їх вирощували на мінеральному *середовищі 2* з 1 % (масова частка) глюкози як єдиним джерелом вуглецю і енергії. Оцінку синтезу ПАР здійснювали за показником умовної концентрації ПАР у супернатанті культуральної рідини.

**Підбір біоцидів для попередження біодеструкції поверхнево-активних речовин.** Як біоциди використовували формалін (38 % розчин) та еуксил (Euxyl-K400). При вивченні біодеструкції ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 мікрофлорою повітря, використовували супернатант культуральної рідини, що зберігався упродовж чотирьох місяців за різних умов: при додаванні біоцидів у різних концентраціях (0,1–0,5 %, об'ємна частка); без біоцидів за різних температурних режимів (при 5 та 25°C). Як контроль використовували стерильний супернатант культуральної рідини, що зберігався в асептичних умовах.

Ступінь біодеструкції ПАР оцінювали за зміною таких показників: умовна концентрація ПАР упродовж зберігання, індекс емульгування супернатанту культуральної рідини, загальна чисельність мікробіоти у зразках, яку визначали за методом Коха на МПА та ГКА. Проби для визначення вказаних показників відбирали кожного тижня упродовж перших двох місяців, далі кожні 15 днів упродовж двох останніх місяців.

#### **Використання препаратів поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 для очищення води від нафти**

Як препарати ПАР використовували нативну та простерилізовану культуральну рідину *R. erythropolis* ЕК-1 (112 °С, 30 хв), а також супернатант культуральної рідини.

Для одержання супернатанту культуральну рідину центрифугували упродовж 50 хв (9000 об/хв), надосадову рідину зливали і піддавали автоклавуванню за наведених вище умов. Таку термообробку здійснювали для знищення клітин продуцента.

Дослідження процесу очищення води від нафти за участю препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 проводили на модельній водоймі, якою слугувала ємність з 2 дм<sup>3</sup> бюветної води. На поверхню води наносили 2,6 г/ дм<sup>3</sup> нафти, а потім – препарати ПАР у концентрації 5 і 15 % від об'єму води. Як джерело біогенних елементів, необхідних для життєдіяльності нафтоокиснювальних бактерій, використовували діамонійфосфат у концентрації 0,01 % від об'єму води. В одному з експериментів через п'ять днів експозиції здійснювали повторну обробку води препаратами ПАР у концентрації 5 %.

Кількість мікроорганізмів (КУО/см<sup>3</sup>) у бюветній воді до забруднення нафтою, а також кожні 6 днів упродовж місяця у всіх зразках визначали за методом Коха на середовищі МПА.

Вміст нафти у воді визначали ваговим методом після трикратної екстракції гексаном (співвідношення 1:1). Органічний екстракт випарювали до постійної маси на роторному випарникові за температури 55 °С.

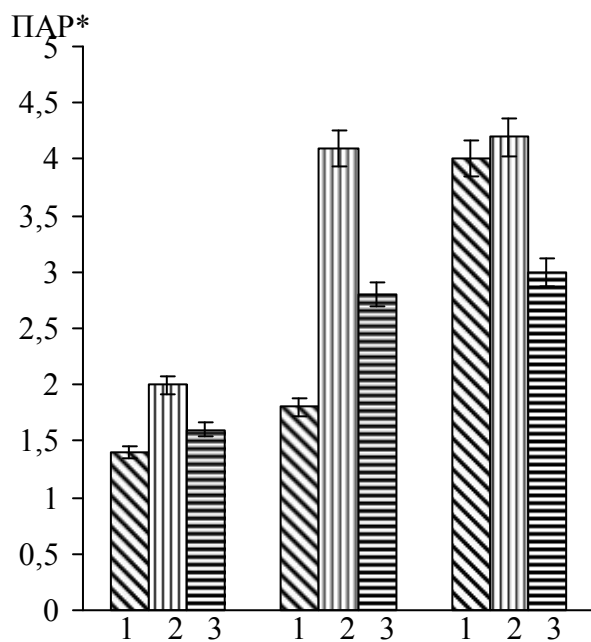
#### Розділ 4. Закономірності синтезу поверхнево-активних речовин за умов періодичного культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 у колбах

Для розробки технології синтезу ПАР за умов періодичного культивування бактерій у ферментаторі необхідно було дослідити динаміку утворення цих метаболітів під час культивування продуцента у колбах.

Зважаючи на те, що першою реакцією катаболізму вуглеводнів є їх окиснення до відповідних спиртів за участю кисню під дією ферментів монооксигеназ, рівень аерації (масообмін) є важливим фактором, що впливає на синтез ПАР за умов росту продуцента на гідрофобних субстратах. Показано, що за високих масообмінних характеристик системи ( $K_s 0,14 \text{ гО}_2/\text{дм}^3 \cdot \text{год}$ ) показник ПАР\* за умов росту штаму ЕК-1 на гексадекані підвищувався у 1,5 раза порівняно з культивуванням на етанолі.

Зважаючи на те, що показники синтезу ПАР на гексадекані були вищими, ніж на етанолі, метою подальших досліджень було вивчення закономірностей синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на цьому гідрофобному субстраті.

**Вплив способу підготовки посівного матеріалу та субстрату на синтез поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1.** Використання посівного матеріалу з середини експоненційної фази росту дало змогу істотно активізувати синтез поверхнево-активних речовин, що підтверджувалося високими показниками ПАР\* (4,1) вже на 168 год культивування (рис. 1).



Концентрація гексадекану у середовищі при отриманні інокуляту – 0,3 %. Тривалість культивування, год: А – 96, Б – 168, В – 240. Фаза росту інокуляту: 1 – початок експоненційної, 2 – середина експоненційної, 3 – початок стаціонарної.

**Рисунок 1 – Залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 від фізіологічного стану інокуляту**

Аналогічні показники у разі використання інокуляту з ранньої експоненційної або стаціонарної фази росту спостерігалися лише на 240 год культивування *R. erythropolis* ЕК-1.

Встановлено, що оптимальна концентрація гексадекану для вирощування інокуляту становить 1 %. За такої концентрації субстрату одержували посівний матеріал у вигляді гомогенної клітинної суспензії, що значно спрощує технологію біосинтезу ПАР у лабораторному ферментері. Крім того, такий спосіб приготування посівного матеріалу дав змогу інтенсифікувати синтез ПАР.

Під час дослідження впливу концентрації посівного матеріалу на синтез ПАР встановлено, що найвищі показники ПАР\* спостерігались за внесення у середовище 10 % інокуляту.

## Розділ 5. Синтез поверхнево-активних речовин за періодичного культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 у ферментаторі АК-210

Під час масштабування процесу (культивування у ферментаторі АК-210) встановлено, що висока початкова концентрація гексадекану (2 %) інгібує синтез біомаси і ПАР. За такого режиму внесення субстрату асиміляція гексадекану *R. erythropolis* ЕК-1 відбувалася дуже повільно, концентрація біомаси не перевищувала 0,7 г/дм<sup>3</sup> на 110 год культивування, а показник умовної концентрації ПАР становив всього 0,6.

Встановлено, що дробне внесення гексадекану дало змогу підвищити ефективність біосинтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1. Так, внесення субстрату порціями по 0,1 % через 7–8 год культивування супроводжувалось підвищенням у два рази показника умовної концентрації ПАР, проте тривалість лаг-фази становила 20–25 год. Збільшення початкової концентрації субстрату в середовищі до 0,2–0,3 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,2 % через 7–8 год, дало змогу інтенсифікувати синтез ПАР та скоротити тривалість лаг-фази до 8–10 год (табл. 1).

**Таблиця 1 – Залежність синтезу поверхнево-активних речовин та емульгатора *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 від початкової концентрації гексадекану**

Початкова концентрація гексадекану, %	Індекс емульгування нативної культуральної рідини, %	ПАР*
0,1	58±2,9	3,2±0,16
0,2	55±2,7	4,2±0,21
0,3	50±2,5	4,2±0,21
0,4	27±1,4	2,4±0,12

Примітки:

1. рО<sub>2</sub> – 20 – 30 %; рН не регулювали; температура культивування 28 °С.
2. У процесі культивування субстрат вносили порціями по 0,2 % кожні 7–8 год до кінцевої концентрації 2,4 %;
3. Тривалість культивування у всіх варіантах становила 80–85 год;
4. Як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

Встановлено, що зменшення інтервалу подачі субстрату в середовище до 5–6 год дає можливість активізувати процеси синтезу поверхнево-активних речовин і скоротити тривалість процесу біосинтезу до 65 год. При цьому внесення гексадекану через кожні 3–4 год призводило до швидкого накопичення невикористаного субстрату в середовищі, і як наслідок, супроводжувалося зниженням швидкості росту бактерій (починаючи з 10–12 год) і синтезу ПАР.

Подальші експерименти показали, що при дробному внесенні гексадекану порціями по 0,3–0,4 % ПАР\* досягає максимального значення вже на 60 год культивування (табл. 2).

**Таблиця 2 – Вплив концентрації внесеного дробно гексадекану на синтез поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1**

Концентрація внесеного дробно гексадекану, %	Тривалість культивування, год	ПАР*
0,2	65	5,0±0,25
0,3	60	6,0±0,30
0,4	60	6,0±0,30
0,5	90	4,2±0,21

Примітки:

1. рО<sub>2</sub> 20–30 %; рН не регулювали.
2. Температура культивування 28 °С.
3. Початкова концентрація гексадекану у середовищі – 0,2 %. Інтервал внесення порцій гексадекану – 5–6 год. Кінцева концентрація субстрату 2,4 %.

Культивування бактерій за високої концентрації розчиненого кисню у середовищі (60–70 % від насичення повітрям) та використання посівного матеріалу з середини експоненційної фази росту дало змогу суттєво підвищити показники синтезу ПАР. За таких умов культивування спостерігався інтенсивний ріст бактерій, синтез ПАР починався з перших годин росту продуцента, умовна концентрація ПАР становила 6,5 на 40 год.

Встановлено, що оптимальною температурою для синтезу позаклітинних ПАР є 28 °С. Вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 за нижчих температур супроводжувалось інгібуванням процесу синтезу поверхнево-активних речовин (табл. 3).

**Таблиця 3 – Показники синтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 за різних температурних режимів**

Температура	ПАР, г/дм <sup>3</sup>	ПАР-синтезувальна здатність, г ПАР/г АСБ	Вихід ПАР від субстрату, %
20	2,4±0,12	1,15±0,06	16,1±0,80
25	5,6±0,28	2,67±0,13	38,9±1,94
28	6,6±0,33	3,14±0,16	44,0±2,30
30	5,9±0,30	2,86±0,14	41,7±2,08

Примітки:

1. Початкова концентрація субстрату 0,2 % з наступним дробним внесенням порціями по 0,3–0,4 % кожні 5–6 год до кінцевої концентрації 2,4 %.
2. рО<sub>2</sub> 60 – 70 %; рН не регулювали.
3. Тривалість культивування 48 год.

Встановлено, що підтримання рН середовища на рівні 8,0 дає змогу інтенсифікувати синтез метаболітів з поверхнево-активними властивостями. За такого режиму культивування концентрація позаклітинних ПАР становила 7,2 г/дм<sup>3</sup>, а вихід ПАР від заданого субстрату досягав 50 %. Водночас найвищий

індекс емульгування культуральної рідини (100 %) було зафіксовано за умови росту *R. erythropolis* ЕК-1 при рН 7,0.

Встановлено залежність якісного складу полярних та неполярних ліпідів, синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1, від рН середовища. Найбільший спектр ліпідів синтезувався бактеріями за рН 8,0. Так, у складі позаклітинних ліпідів було виявлено гліколіпіди (трегалозо-6-ацилати, трегало-6-міколати, трегалозодіацилати, трегалозо-6-6'-диміколати), нейтральні ліпіди (міколові та жирні кислоти, триацилгліцероли, цетиловий спирт; метиловий ефір-*n*-пентадеканової кислоти) та фосфоліпіди.

Проведено попередній аналіз економічної ефективності розробленої технології, що передбачав порівняння показників синтезу ПАР штамом ЕК-1 та інших представників роду *Rhodococcus* при культивуванні в біореакторах на середовищі з *n*-алканами.

**Таблиця 4 – Порівняння показників синтезу ПАР при культивуванні *R. erythropolis* ЕК-1 та інших представників роду *Rhodococcus* в біореакторах**

Штам	Джерело вуглецю; концентрація, г/л	Біомаса, г/л	ПАР			Тривалість процесу, год
			г/л	вихід, % (від субстрату)	г/г біомаси	
DSM 43215	C <sub>12</sub> -C <sub>18</sub> - <i>n</i> -алкани; 20,0	19,0	2,0	10	0,11	38
DSM 43215	<i>n</i> -декан; 100,0	8,0	32,0	32	4,0	160
ЕК-1	<i>n</i> -гексадекан	1,7	7,2	50	4,2	48

Як видно з даних, наведених у табл. 4, *R. erythropolis* ЕК-1 не поступається, а за деякими показниками перевищує найбільш відомий штам *R. erythropolis* DSM 43215. Крім того, вартість середовища для культивування *R. erythropolis* ЕК-1 є у 11 разів нижчою, ніж для вирощування штаму DSM 43215 (4,78 і 53,81 грн/дм<sup>3</sup> відповідно). Умовна вартість 1 кг синтезованих ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 становить 663,89, а для *R. erythropolis* DSM 43215 – 1 681,56 грн/кг.

Наведені дані засвідчують переваги розробленої біотехнології поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 порівняно з відомими у світі.

#### **Розділ 6. Вплив поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 на ефективність мікробної деструкції нафти у воді**

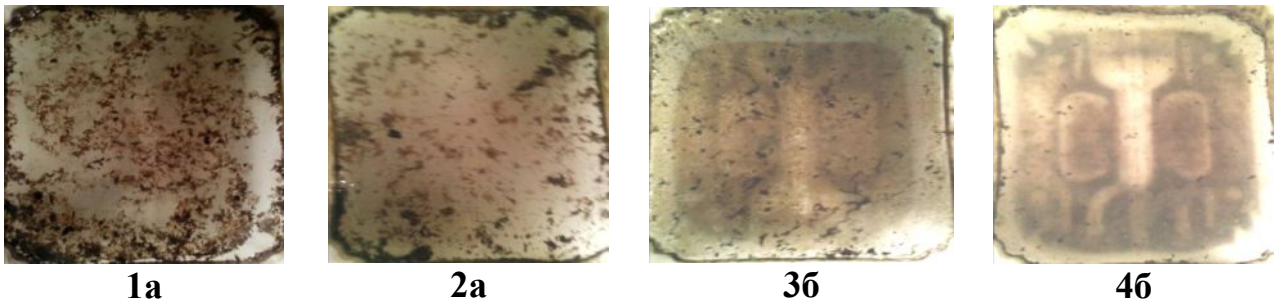
У ході проведеної роботи, встановлено можливість біодеструкції поверхнево-активних речовин синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1 чистими культурами мікроорганізмів та мікрофлорою повітря.

Для попередження біодеградації ПАР було здійснено підбір біоцидів здатних попередити їх руйнування упродовж тривалого процесу зберігання препаратів. Запропоновано використовувати формалін або еуксил в концентрації 0,1 % – 0,3 %. Обидва досліджених біоциди виявляють високу

активність до контамінуючої мікрофлори, що сприяє подовженню терміну зберігання культуральної рідини без втрати її властивостей та запобіганню можливості появи резистентних форм до одного з них.

Встановлено, що максимальний рівень деградації нафти (93,1 %) у модельних водоймищах спостерігався за внесення нативної культуральної рідини *R. erythropolis* ЕК-1 у концентрації 5 %. Активна деструкція нафти спостерігалася вже через сім діб, а на 12 добу експерименту близько 70 % поверхні води були повністю вільними від нафти. За обробки води стерильною культуральною рідиною або супернатантом культуральної рідини швидкість деструкції була нижчою.

Встановлено, що додаткове внесення 5 % нативної культуральної рідини (5 доба) дало змогу скоротити тривалість процесу очищення порівняно з однократним обробленням (рис. 2). У той же час повторна обробка водойм стерильною культуральною рідиною та супернатантом культуральної рідини практично не впливали на ступінь деструкції нафти.



1, 3 – одноразова обробка, 2, 4 – дворазова обробка. Тривалість експозиції: а – 12 діб, б – 30 діб. Використовували препарати ПАР у вигляді нативної культуральної рідини. Концентрація – 5%.

**Рисунок 2 – Залежність ступеню деструкції нафти від режиму обробки зразків препаратами *R. erythropolis* ЕК-1**

Подальші експерименти показали, що деструкція нафти у стерильній артезіанській воді після обробки культуральною рідиною була невисокою (на рівні 42 %). Одержані результати можуть свідчити про те, що одним з основних механізмів, які зумовлюють активну деструкцію нафти за присутності ПАР, є активація природної нафтоокиснювальної мікробіоти води.

**Додаток А.** Технологія препарату *R. erythropolis* ЕК-1 була розроблена на базі кафедри біотехнології мікробного синтезу Національного університету харчових технологій. Технологічний процес складається із допоміжних стадій (санітарна підготовка виробництва, підготовка стерильного технологічного повітря та поживного середовища, приготування посівного матеріалу), стадій основного технологічного процесу (виробничий біосинтез) та операцій пакування і маркування цільового продукту.

До складу розробленого тимчасового регламенту входять наступні розділи: характеристика кінцевого продукту виробництва, характеристика сировини і матеріалів, опис технологічного процесу, матеріальний баланс виробництва,

технологічна і апаратурна схеми процесу та карта постадійного контролю виробничого процесу.

## ВИСНОВКИ

На основі експериментальних даних масштабовано технологію біосинтезу поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 з колб на ферментаційне обладнання, що дало змогу підвищити концентрацію ПАР і скоротити тривалість процесу культивування.

1. Під час культивування *R. erythropolis* ЕК-1 у колбах і лабораторному ферментаторі АК-210 найвищі показники синтезу ПАР досягалися за використання 10 % інокуляту, вирощеного до середини експоненційної фази росту на середовищі з 1 % гексадекану.
2. Зниження початкової концентрації гексадекану у середовищі до 0,2–0,3 % з наступним дробним внесенням через 5–6 год порціями по 0,3–0,4 % до кінцевої концентрації 2,4 %, дало змогу у шість разів підвищити синтез ПАР та у два рази скоротити тривалість культивування *R. erythropolis* ЕК-1 у ферментаторі АК-210 порівняно з одноразовим внесенням субстрату.
3. Максимальний синтез поверхнево-активних речовин досягався у процесі культивування *R. erythropolis* ЕК-1 при рН 8,0. Зниження рН до 7,0 супроводжувалося інтенсифікацією синтезу метаболітів з емульгувальними властивостями.
4. Розроблено нову високоефективну технологію ПАР при періодичному культивуванні *R. erythropolis* ЕК-1 у ферментаторі АК-210 (концентрація позаклітинних ПАР – 7,15 г/дм<sup>3</sup>, їх вихід від субстрату – 50 %, індекс емульгування культуральної рідини – 50 %), ключовими параметрами якої є: дробне внесення субстрату; рН 8,0; температура вирощування 28 °С; концентрація розчиненого кисню 60–80 % від насичення повітрям.
5. Масштабування процесу біосинтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 з колб на ферментаційне обладнання дало можливість підвищити майже у два рази кількість синтезованих ПАР і скоротити у 3,5 рази тривалість культивування продуцента порівняно з вирощуванням в колбах на качалці.
6. Встановлено здатність мікроорганізмів різних таксономічних груп асимілювати ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 як єдине джерело вуглецю та енергії. Використання як біоциду формаліну або еуксилу у концентрації 0,1–0,3 % дало змогу подовжити до 3,5 місяців термін зберігання ПАР без втрати їх поверхнево-активних та емульгувальних властивостей.
7. Встановлено, що через 25 діб ступінь деградації нафти (2,6 г/дм<sup>3</sup>) за присутності 5 % препарату ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 у вигляді постферментаційної культуральної рідини становив 93 %. Інтенсифікація деструкції нафти зумовлена активацією природної нафтоокиснювальної мікрофлори під впливом поверхнево-активних речовин.
8. Теоретично розрахована умовна вартість 1 кг поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1, одержаних згідно розробленої технології, є у 11 разів нижчою, ніж вартість ПАР, синтезованих відомим у світі штамом *R. erythropolis* DSM 43215 на *n*-алканах.

9. Технологія синтезу поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 захищена патентом України на винахід (№ 84803) і двома патентами України на корисну модель (№16721, №25948, №52821), на її основі розроблено тимчасовий технологічний регламент виробництва препарату ПАР *R. erythropolis* ЕК-1.

### СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Ігнатенко С.В. Синтез поверхнево-активних речовин у процесі вирощування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гідрофобному та гідрофільному субстратах / С.В. Ігнатенко, С.І.Антонюк, Т.П.Пирог // Наукові праці НУХТ. – 2006. – № 18. – С. 10 – 13.

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин (концентрація біомаси, поверхневий натяг, умовна концентрація ПАР, емульгувальні властивості, кількість синтезованих ПАР) при культивуванні R. erythropolis ЕК-1 у колбах.*

2. Ігнатенко С.В. Біодеструкція поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 та підбір біоцидів для попередження цього процесу / С.В. Ігнатенко, І.М.Волошина, Т.П.Пирог // Харчова промисловість. – 2007. – № 5. – С. 30 – 33.

*Особистий внесок дисертанта: визначення поверхневого натягу, умовної концентрації ПАР, емульгувальних властивостей у зразках нативної культуральної рідини та її супернатанті за різних умов зберігання.*

3. Ігнатенко С. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин під час періодичного культивування штаму *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 у лабораторному ферментаторі АК-210 / Сергій Ігнатенко, Тетяна Пирог // Наукові праці НУХТ. – 2007. – № 20. – С. 38 – 41.

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин (концентрація біомаси, поверхневий натяг, умовна концентрація ПАР, емульгувальні властивості, кількість синтезованих ПАР) при культивуванні R. erythropolis ЕК-1 у лабораторному ферментаторі АК-210; дослідження хімічного складу ліпідів синтезованих нафтоокиснювальними бактеріями за оптимальних параметрів біосинтезу ПАР; опис експериментальної частини в статті.*

4. Пирог Т.П. Ключові проблеми промислового одержання мікробних поверхнево-активних речовин / Т.П. Пирог, С.В. Ігнатенко, Д.О.Тарасенко, // Харчова промисловість. – 2008. – № 7. – С. 32–35.

*Особистий внесок дисертанта: проаналізовано наукову літературу з даної проблеми, узагальнено отримані дані, проведено порівняльний аналіз за літературними даними.*

5. Пирог Т.П. Вплив якості посівного матеріалу на синтез поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1/ Т.П.Пирог, С.В. Ігнатенко, Д.О.Тарасенко // Мікробіологічний журнал. – 2008. – Т.70, № 4. – С. 9 – 17 (наукометрична база SCOPUS).

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин (концентрація біомаси, поверхневий натяг, умовна концентрація ПАР, емульгувальні властивості) при культивуванні R. erythropolis ЕК-1 у колбах; опис експериментальної частини в статті.*

6. Пирог Т. Масштабирование процесса биосинтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане/ Татьяна Пирог, Сергей Игнатенко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 4. – С.436–442 (наукометрична база SCOPUS, Російська Федерація).

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин (концентрація біомаси, поверхневий натяг, умовна концентрація ПАР, емульгувальні властивості, кількість синтезованих ПАР) при культивуванні R. erythropolis ЕК-1 у лабораторному ферментаторі АК-210; підбір оптимальної схеми внесення гексадекану у середовище культивування R. erythropolis ЕК-1.*

7. Пирог Т. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва / Тетяна Пирог, Сергій Ігнатенко // Біотехнологія. – 2008. – Т.1, № 4. – С. 29 – 38.

*Особистий внесок дисертанта: проведення аналізу існуючої ситуації за літературними даними.*

8. Деклараційний пат. 16721 Україна, МПК С 12 N 1/02, С 12 R 1/00. Спосіб одержання поверхнево-активних речовин. / Пирог Т.П., Ігнатенко С.В.; заявник і власник Національний університет харчових технологій – № u 2006 02568; заявл. 09.03.06; опубл. 15.08.2006, Бюл. №8.

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту R. erythropolis ЕК-1 і синтезу поверхнево-активних речовин при визначенні оптимальних умов підготовки посівного матеріалу.*

9. Пат. 25948 Україна (корисна модель), МПК С 12 N 1/02, С 12 R 1/38. Спосіб одержання поверхнево-активних речовин. / Пирог Т.П., Ігнатенко С.В.; заявник і власник Національний університет харчових технологій. – № u 2007 04739; заявл. 27.04.07; опубл. 27.08.2007, Бюл. №13.

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин при культивуванні R. erythropolis ЕК-1 у колбах та лабораторному ферментаторі АК-210.*

10. Пат. 84803 Україна (винахід), МПК С 12 N 1/20, С 12 R 1/38. Спосіб одержання поверхнево-активних речовин. / Пирог Т.П., Ігнатенко С.В.; заявник і власник Національний університет харчових технологій. – № a 2007 04726; заявл. 27.04.07; опубл. 25.11.2008, Бюл. №22.

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин при культивуванні R. erythropolis ЕК-1 у лабораторному ферментаторі АК-210.*

11. Пат. 52821 Україна (корисна модель), МПК С 12 N 1/02. Спосіб одержання поверхнево-активних речовин. / Пирог Т.П., Ігнатенко С.В., Конон А.Д.; заявник і власник Національний університет харчових технологій. – № u 2010 02789; заявл. 11.03.2010; опубл. 10.09.10, Бюл. №17.

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин при культивуванні R. erythropolis EK-1 у лабораторному ферментаторі АК-210; підготовка зразків нативної культуральної рідини.*

12. Ігнатенко С.В. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин у процесі періодичного культивування штаму *Rhodococcus erythropolis* EK-1 на гідрофобному субстраті / С.В. Ігнатенко, Д.О.Тарасенко, Т.П.Пирог // Нові технології та технічні рішення в харчовій та переробній промисловості: сьогодення і перспективи: IX міжнар. наук.-техн. конф., 17-19 жовтня 2005 р. : матеріали конф. – Київ, 2005. – С. 43-44.

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин при культивуванні R. erythropolis EK-1 у колбах; підготовка тез до друку.*

13. Ігнатенко С.В. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин у процесі періодичного культивування штаму *Rhodococcus erythropolis* EK-1 на гідрофобному субстраті / С.В. Ігнатенко, Д.О.Тарасенко, Т.П.Пирог // Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України: VI Національний з'їзд фармацевтів України, 28-30 вересня 2005 р. : матеріали з'їзду. – Харків, 2005. – С.343–345.

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин при культивуванні R. erythropolis EK-1 у колбах; підготовка тез до друку.*

14. Пирог Т.П. Шляхи інтенсифікації мікробного синтезу практично важливих вторинних метаболітів / Т.П.Пирог, Т.А.Шевчук, С.В. Ігнатенко // IX Український біохімічний з'їзд, 24-27 жовтня 2006 р.: матеріали з'їзду.– Харків, 2006. – С. 155.

*Особистий внесок дисертанта: проаналізовано наукову літературу з даної проблеми; підготовка тез до друку.*

15. Ігнатенко С.В. Синтез поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus erythropolis* EK-1 та визначення можливих шляхів його інтенсифікації / С.В. Ігнатенко, Т.П. Пирог, Д.О. Тарасенко // Биотехнология. Образование. Наука. Практика: III Всеукр. науч.-практ. конф., 18-20 окт. 2006 г. : сборник тезисов. – Харків, 2006. – С. 117.

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин при культивуванні R. erythropolis EK-1 у колбах.*

16. Ігнатенко С.В. Вплив способу підготовки посівного матеріалу на синтез поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus erythropolis* EK-1 / С.В. Ігнатенко, Т.П. Пирог, Д.О. Тарасенко // Молодь та поступ в біології: III Міжнар. наук. конф. студ. і аспірантів, 23-27 квітня 2007 р. : збірник тез. – Львів, 2007. – С. 348-349.

*Особистий внесок дисертанта: планування експерименту; підготовка тез до друку.*

17. Ігнатенко С. Вплив умов культивування на синтез поверхнево-аткивних речовин *Rhodococcus erythropolis* EK-1 / Сергій Ігнатенко, Тетяна Пирог //

Молодь та поступ біології: IV міжнар. наук. конф. студ та аспірантів, 7-10 квітня 2008 р.: збірник тез. – Львів, 2008. – С. 315-316.

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин при культивуванні R. erythropolis ЕК-1 у лабораторному ферментаторі АК-210.*

18. Ігнатенко С. Поверхнево-активні речовини *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 як потенційні компоненти нових лікарських засобів / Сергій Ігнатенко, Тетяна Пирог // Сьогоднішня та майбутнє фармації: всеукраїнський конгрес, 16-19 квітня 2008 р.: тези доповідей. – Харків, 2008. – С. 264.

*Особистий внесок дисертанта: проаналізовано наукову літературу з даної проблеми, проведено порівняльний аналіз за літературними даними; підготовка тез до друку.*

19. Ігнатенко С. Влияние внешних факторов на синтез поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 в ферментере АК-210 / Сергей Игнатенко, Татьяна Пирог // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: VI междунар. науч. конф., 2-6 июня. 2008 г: материалы. – Минск, 2008. – С.164 – 166.

*Особистий внесок дисертанта: визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин (концентрація біомаси, поверхневий натяг, умовна концентрація ПАР, емульгувальні властивості, кількість синтезованих ПАР) при культивуванні R. erythropolis ЕК-1 у лабораторному ферментаторі АК-210; дослідження хімічного складу ліпідів синтезованих бактеріями; опис експериментальної частини в статті.*

20. Ігнатенко С. Високоєфективна технологія синтезу поверхнево-активних речовин / Сергій Ігнатенко, Тетяна Пирог // Актуальні проблеми синтезу і створення нових біологічно активних сполук та фармацевтичних препаратів: Національна наук.-техніч.конф., 15-18 жовтня 2008 р.: тези доповідей. – Львів, 2008. – С. 67

*Особистий внесок дисертанта: планування експерименту; визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин при культивуванні R. erythropolis ЕК-1 у лабораторному ферментаторі АК-210.*

21. Ігнатенко С. Визначення основних технологічних параметрів біосинтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 у лабораторному ферментаторі АК-210 / Сергій Ігнатенко, Тетяна Пирог // Біотехнологія. Наука. Освіта. Практика: IV міжнар. наук.-практ. конф., 11-13 листопада 2008 р.: тези доповідей. – Дніпропетровськ, 2008. – С.23.

*Особистий внесок дисертанта: планування експерименту; визначення показників росту і синтезу поверхнево-активних речовин при культивуванні R. erythropolis ЕК-1 у лабораторному ферментаторі АК-210; підготовка тез до друку.*

22. Ігнатенко С. Вивчення хімічного складу поверхнево-активних речовин, синтезованих *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 / Сергій Ігнатенко, Тетяна Пирог // Молодь і поступ біології: V міжнар. наук. конф. студ. та аспір., 12-15 травня 2009 р.: збірник тез. – Львів, 2009. – С.115-116.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження хімічного складу ліпідів синтезованих бактеріями; підготовка тез до друку.*

23. Ігнатенко С.В. Вплив поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на ефективність мікробної деструкції нафтових забруднень / С.В. Ігнатенко, Т.П. Пирог, А.П. Морозова // Біологія: від молекули до біосфери: IV міжнар. конф. мол. науковців., 17-21 листопада 2009 р.: матеріали. – Харків, 2009. – С.316-317.

*Особистий внесок дисертанта: визначення вмісту залишкової нафти у зразках води; проведення мікробіологічних досліджень у зразках води.*

24. Пирог Т.П. Регуляція синтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на неуглеводних субстратах / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, Д.О. Тарасенко, С.В. Ігнатенко// X Український біохімічний з'їзд, 13-17 вересня 2010 р.: матеріали. – Одеса, 2010. – С.296.

## АНОТАЦІЯ

**Ігнатенко С.В. Розробка технології періодичного культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 – продуцента поверхнево-активних речовин. – 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 розробці технології метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями у процесі періодичного культивування *R. erythropolis* ЕК-1 у лабораторному ферментері АК-210.

Встановлено, що максимальні показники синтезу поверхнево-активних речовин (концентрація позаклітинних ПАР 7,2 г/дм<sup>3</sup>, індекс емульгування культуральної рідини 50%, вихід ПАР від субстрату 50%) в умовах культивування штаму ЕК-1 у ферментері АК-210 на середовищі з *n*-гексадеканом спостерігаються за концентрації розчиненого кисню 60 – 70 %, рН 8,0 та дробного внесення субстрату по 0,3 – 0,4 % кожні 5 – 6 год до кінцевої концентрації 2,4 %.

Встановлено, що використання метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1 дає змогу інтенсифікувати процеси очищення води від нафти. Максимальний ступінь деструкції нафти (93 %) у модельних водоймах було досягнуто за умови двократного внесення препаратів ПАР в концентрації 5 % у вигляді нативної культуральної рідини.

**Ключові слова:** нафтоокиснювальні бактерії, *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, ферментер, поверхнево активні речовини, деградація нафти.

## АННОТАЦИЯ

**Игнатенко С.В. Разработка технологии периодического культивирования *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 – продуцента поверхностно-активных веществ. – На правах рукописи.**

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

Диссертационная работа посвящена разработке технологии метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами в процессе периодического культивирования *R. erythropolis* ЕК-1 в лабораторном ферментере АК-210.

Установлено, что максимальные показатели синтеза поверхностно-активных веществ (концентрация внеклеточных ПАВ 7,2 г/дм<sup>3</sup>, индекс эмульгирования культуральной жидкости 50 %, выход ПАВ от субстрата 50 %) в условиях культивирования штамма ЕК-1 в ферментере АК-210 на среде с *n*-гексадеканом были зафиксированы при концентрации растворенного кислорода 60 – 70 %, рН 8,0 и дробном внесении субстрата по 0,3 – 0,4 % каждые 5-6 часов до конечной концентрации 2,4 %.

Установлено, что использование метаболитов с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами синтезированных *R. erythropolis* ЕК-1 дает возможность интенсифицировать процессы очистки воды от нефти. Максимальная степень деструкции нефти (93 %) в модельных водоемах была достигнута при условии двукратного внесения препаратов ПАВ в концентрации 5 % в виде нативной культуральной жидкости.

**Ключевые слова:** нефтеокисляющие бактерии, *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, ферментер, поверхностно-активные вещества, деградация нефти.

## SUMMARY

**S.V. Ignatenko. Technology Development of periodic cultivation *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 - the producer of surfactants. - On the rights of the manuscript.**

Dissertation for the degree of Ph.D., specialty 03.00.20 - biotechnology. - National University of Food Technologies Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2014.

Dissertation is devoted to developing technology metabolites of surfactants and emulsifying properties of the periodic cultivation of *R. erythropolis* ЕК-1 in a laboratory fermenter АК-210.

Microbial surfactants and emulsifiers are used in many sectors of the economy, in particular to increase oil production, giving specific taste and structural properties of the food, the creation of new highly efficient forms of pharmaceuticals, as well as in bioremediation processes of ecosystems.

The main object of study was a strain of *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, isolated from oil-contaminated soil samples. Strain deposited with the Depository microorganisms Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences at number IMV Ac-5017.

It was previously shown that the highest rates of synthesis of surfactant was observed by culturing *R. erythropolis* EK-1-hexadecane hydrophobic substrate and hydrophilic - ethanol. To develop technologies surfactant synthesis under conditions of periodic culturing bacteria in fermenters was necessary to examine the dynamics of formation of these metabolites during cultivation in flasks producer.

It is shown that the use of hexadecane at high mass transfer characteristics of the system ( $K_s = 0.14 \text{ hO}_2/\text{dm}^3 \text{ h}$ ) allows 1.5-fold increase in the rate of surface active agents compared to cultivation on ethanol producer. Using seed from mid-exponential growth phase at a concentration of 10% helped significantly enhance the synthesis of surfactants, which was confirmed by high levels of conventional surfactant concentration (5,0) is at 168 h of cultivation.

It should be noted that in the cultivation of the producer at each hexadecane increase your surface active agents was accompanied by a sharp decrease in emulsifying properties of culture broth. It can be assumed that the synthesized emulsifiers act as a sort of "catalyst" process of assimilation of n-alkanes, and changing the components of the emulsifying and surface-active properties in the surfactants correlated with the physiological needs of the bacteria at different stages of cultivation

When cultured *R. erythropolis* EK-1 fermenter found that high initial concentration of hexadecane (2%) inhibits the synthesis of biomass and surfactants. Determined that the introduction of hexadecane fractional portions of 0.3 - 0.4% every 5 - 6 hours, the initial substrate concentration in the medium 0.2 - 0.3%, makes it possible to activate the synthesis of surfactants (surface-active substances \* 6.0) and shorten the process of biosynthesis to 60 mph.

Growing bacteria at high concentration of dissolved oxygen in the medium (60 - 70% of air saturation) and use seed from mid-exponential growth phase made it possible to significantly increase the rates of synthesis of surfactants. Under these conditions, there was an intense growth of bacteria, the synthesis of surfactants began the first hours of growth the producer, conditional concentration of surfactants was 6.5 for 40 h.

Found that the optimum temperature for the synthesis of extracellular surfactants is 28° C. Growing *R. erythropolis* EK-1 at lower temperatures accompanied by inhibition of the synthesis of surfactants.

Determined that maintaining the pH at 8.0 makes it possible to intensify the synthesis of metabolites with surface-active properties (concentration of extracellular surfactants -  $7.2 \text{ g}/\text{dm}^3$ , access surfactants from a given substrate - 50%). However, the highest degree of emulsification culture fluid (100%) was recorded for growth conditions of *R. erythropolis* EK-1 at pH 7.0.

The dependence of the quality of polar and nonpolar lipids synthesized by *R. erythropolis* EK-1 on pH. The largest range of lipid was synthesized bacteria at pH 8.0. Thus, in the extracellular lipids found glycolipids (trehalose-6-atsylaty, trehalo-6-mikolaty, trehalozodiatsylaty, trehalose-6, 6'-dymikolaty), neutral lipids (mycolic and fatty acids, triacylglycerols, cetyl alcohol, methyl ester- n pentadekanovoyi acid) and phospholipids. By lowering the pH to 7.0 in the polar lipids were absent trehalose-6, 6'-dymikolaty, and in the non-polar lipids were detected only cetyl alcohol and

methyl ether-n-pentadecanov acid. By maintaining the pH at 7.5 in the extracellular lipids are not only identified trehalose-6, 6'-dymikolaty.

Found that the maximum level of degradation of oil (93%) was observed in model waters subject to native culture broth *R. erythropolis* EK-1 at a concentration of 10%. When making up the reservoir of sterile culture fluid supernatant culture fluid or the degree of degradation of oil does not exceed (81 - 85%). Increased concentrations of drugs and 15% did not lead to intensification of contaminated water.

Shown that the addition of 5% of the native culture fluid (5 days) helped reduce the purification process, compared with a single treatment.

In the course of this work, found an opportunity biodegradation of surfactants synthesized by *R. erythropolis* EK-1 pure cultures of microorganisms and microbial air.

To prevent biodegradation of surfactants were made selection of biocides can prevent their destruction during the long process of storing drugs. Proposed to use formalin or euksyl at a concentration of 0.1% - 0.3%.

**Keywords:** oil oxidizing bacteria, *Rhodococcus erythropolis* EK-1, fermenter, surface active substances, the degradation of oil.