

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ
Національний університет харчових технологій

Софілканич Анна Павлівна

УДК 759.873.088.5:661.185

**Розробка технології поверхнево-активних
речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1
з використанням промислових відходів**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Київ – 2013

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій Міністерства освіти і науки, молоді та спорту 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 **Левандовський Леонід Вікторович**, Національний університет харчових технологій, завідувач кафедри біохімії та екологічного контролю

кандидат технічних наук, доцент **Тодосійчук Тетяна Сергіївна**, Національний технічний університет України «КПІ», заступник завідувача кафедри промислової біотехнології, заступник декана факультету біотехнології і біотехніки.

Захист відбудеться «___»_____2013 р. о ___ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.058.03 Національного університету харчових технологій за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 68, аудиторія _____.

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

Автореферат розісланий «___»_____ 2012 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н.О. Бублієнко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. Унікальні властивості мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) зумовлюють їх використання у різноманітних галузях промисловості замість хімічно синтезованих аналогів [Müller, 2012]. ПАР мікробного походження знаходять застосування для вирішення ряду практичних завдань, що гостро постали перед людством: усунення екологічних проблем (забруднення ґрунтів і водойм токсичними ксенобіотиками, що загрожує екологічною катастрофою), пошук альтернативних антимікробних препаратів проти резистентних мікроорганізмів, а також фітопатогенних бактерій [Savary, 2011; Rivardo, 2011]. Але раціональне використання ПАР мікробного походження залежить в першу чергу від економічної ефективності їх виробництва. Одним із способів здешевлення технології мікробних ПАР є використання дешевих ростових субстратів, наприклад, відходів інших виробництв [Henkel, 2012].

Раніше на кафедрі біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій із забруднених нафтою зразків ґрунту було виділено штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [Пирог, 2004] і депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології за номером ІМВ Ас-5017. Встановлено здатність штаму ЕК-1 до синтезу ПАР на *n*-гексадекані та етанолі, оптимізовано склад поживного середовища та умови культивування продуцента [Пирог, 2004]. Визначено фізіологічні основи регуляції синтезу ПАР у процесі вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на гідрофільних і гідрофобних сполуках [Pirog, 2010] і масштабовано технологію на ферментаційному обладнанні [Pirog, 2011].

Заміна традиційних субстратів для біосинтезу ПАР, у тому числі й синтезованих *R. erythropolis* ЕК-1, відходами промислових виробництв (олієжирової промисловості, використаної соняшникової олії, гліцерину, меляси, рідких парафінів) дасть змогу здешевити собівартість технології у кілька разів, а також утилізувати непотрібні відходи, зняти з підприємств харчової промисловості, сільськогосподарського сектору та підприємств, що виробляють біодизель проблему зберігання або знешкодження значної маси відходів, на що витрачається велика кількість енергії та коштів. Крім того, літературні дані стосовно здатності представників роду *Rhodococcus* до синтезу ПАР на відходах є вкрай обмеженими.

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 темою «Розробка вискоелективних ресурсозберігаючих біотехнологій з метою їх впровадження у мікробіологічну, фармацевтичну та харчову промисловість» (2006–2010, 2011–2015 рр.), а також у рамках фундаментального дослідження за рахунок видатків загального фонду державного бюджету «Розробка наукових основ регуляції синтезу і фізико-

хімічних властивостей мікробних сурфактантів мультифункціонального призначення» (2010–2012 рр.), № державної реєстрації 0109U008586.

Мета і задачі дослідження. Мета роботи – розробити технологію поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 з використанням промислових відходів як субстратів та дослідити можливості їх практичного використання.

Для виконання роботи потрібно було вирішити такі завдання:

дослідити здатність до синтезу ПАР під час культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на деяких промислових відходах;

дослідити вплив екзогенних попередників на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на відходах виробництва;

дослідити вплив катіонів важких металів на ріст штаму ЕК-1 і синтез ПАР, а також захисні функції поверхнево-активних речовин;

дослідити ефективність деструкції нафтових забруднень у воді та ґрунті за присутності препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1;

визначити антимікробні та антиадгезивні властивості ПАР штаму ЕК-1;

розробити технологічну схему біосинтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на промислових відходах.

Об'єкт дослідження – *R. erythropolis* ЕК-1 та мікробні поверхнево-активні речовини.

Предмет дослідження – біосинтез поверхнево-активних речовин мікробного походження, очищення води і ґрунту від нафтових забруднень, антимікробна та антиадгезивна дія ПАР.

Методи дослідження. Під час виконання дисертаційної роботи використовували такі методи досліджень: мікробіологічні (визначення морфолого-культуральних ознак бактерій, антимікробних та антиадгезивних властивостей, захисних властивостей ПАР, кількості життєздатних мікробних клітин); біотехнологічні (культивування мікроорганізмів, дослідження ефективності біодеструкції нафти); фізико-хімічні (визначення поверхневого натягу, концентрації ПАР і біомаси, індексу емульгування, рН, концентрації нафти у воді, ґрунті та піску); біохімічні (визначення активності алкангідроксилази); математичні (статистична обробка результатів досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено можливість заміни високовартісних субстратів (*n*-гексадекан та етанол) для біосинтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на промислові відходи (оліє-жирової промисловості, пересмажену соняшникову олію, гліцерин, рідкі парафіни). Найвищі показники синтезу ПАР спостерігалися на олієвмісних субстратах і перевищували такі на *n*-гексадекані і етанолі у 1,3–3 рази. Показано, що найбільша кількість ПАР утворювалась на пересмаженій олії за використання інокуляту, вирощеного на мелясі.

Встановлено можливість інтенсифікації у 3–4 рази синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на пересмаженій соняшниковій олії внесенням у середовище екзогенних попередників поверхнево-активних гліколіпідів (глюкоза або меляса у концентрації 0,1 % за вуглеводами).

Показано стимуляцію синтезу ПАР штамом ЕК-1 за внесення у середовище з гідрофільними (етанол) та гідрофобними (*n*-гексадекани, рідкі парафіни, пересмажена соняшникова олія) субстратами катіонів міді (0,01–0,1 мМ) у середині експоненційної фази росту. Інтенсифікація синтезу ПАР на вуглеводнях за наявності Cu^{2+} зумовлена активацією алкангідроксилази *R. erythropolis* ЕК-1.

Встановлено, що інтенсифікація деструкції комплексних з важкими металами нафтових забруднень за присутності ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 зумовлена як активацією природної нафтоокиснювальної мікрофлори, так і захисними функціями ПАР щодо дії токсичних металів.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологію біосинтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на олієвмісних відходах, яка включає: 1) використання як джерела вуглецю пересмаженої соняшникової олії (2,0 %, об'ємна частка); 2) використання посівного матеріалу, вирощеного на мелясі; 3) внесення у середовище на початку культивування 0,1 % (масова частка) глюкози та 0,1 мМ Cu^{2+} у середині експоненційної фази росту. Реалізація даної технології дала змогу підвищити концентрацію позаклітинних ПАР у 4–4,5 рази порівняно із розробленими раніше на основі *n*-гексадекану та етанолу.

Встановлено антимікробну дію ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на деякі мікроорганізми, у тому числі й фітопатогенні бактерії. Показано, що за обробки поверхонь зубних протезів препаратами ПАР штаму ЕК-1 ступінь адгезії бактеріальних і дріжджових клітин знижувався на 45–65 % порівняно із необробленими матеріалами.

Показано можливість застосування низьких концентрацій препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 у вигляді постферментаційної культуральної рідини для ефективної деструкції (86–95 %) нафтових забруднень у воді (2,6 г/дм³) та ґрунті (20 см³/кг), у тому числі й за присутності катіонів важких металів. Встановлено, що препарати ПАР забезпечують на 30–35 % вищий ступінь деструкції нафти, ніж комерційний препарат «Деворойл». Прогнозований коефіцієнт ефективності капіталовкладень для очищення доквілля від нафти з використанням препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 перевищує нормативний коефіцієнт для природоохоронних заходів у 4 рази, що свідчить про високу ефективність запропонованої біотехнології.

Технологія синтезу ПАР на пересмаженій олії захищена патентом України на корисну модель (№ 63962, опубл. 25.10.2011, бюл. № 20), а також патентом України на винахід (№ 98571, опубл. 25.05.2012, бюл. № 10).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Дисертантом проведено експериментальні дослідження, проаналізовано наукову літературу з даної проблеми, узагальнено отримані експериментальні дані, проведено порівняльний аналіз з існуючими літературними даними.

Планування основних напрямів і результатів роботи, підготовка публікацій за результатами досліджень проходило за безпосередньої участі наукового керівника д-ра біол. наук, проф. Т.П. Пирог.

Визначення активності ферментів здійснювали спільно з інженером відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ Шевчук Т.А., а дослідження антимікробних властивостей ПАР – з асистентом кафедри біотехнології і мікробіології НУХТ Конон А.Д., які є співавторами публікацій.

Софілканич А.П. є лауреатом Третьої премії конкурсу на кращу наукову роботу на тему «Зробимо Україну енергоощадною», проведеного Інститутом стратегічних оцінок при Президентському фонді Леоніда Кучми (2010 р.).

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на Міжнародній науково-практичній конференції «Регионы в условиях неустойчивого развития» (м. Шарья, Російська Федерація, 2010), Міжнародній науковій конференції «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (м. Мінськ, Республіка Білорусь, 2010), I Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальные вопросы науки» (м. Москва, Російська Федерація, 2011), Міжнародній науково-технічній конференції «Инновационные технологии переработки продовольственного сырья» (м. Владивосток, Російська Федерація, 2011), Всеросійській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Биологический мониторинг природно-техногенных систем» (м. Кіров, Російська Федерація, 2011), Міжнародній науково-практичній конференції «Формування, охорона та захист здоров'я в сучасних умовах (м. Одеса, 2012), Міжнародній науково-практичній конференції «Rozwoj nauk humanistycznych» (м. Познань, Польща, 2012), I Міжнародній Інтернет-конференції «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы» (м. Казань, Російська Федерація, 2012), Міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Розвиток країн в умовах глобалізації: технологічні, економічні, соціальні та екологічні проблеми» (м. Тернопіль, 2012), II Міжнародній науковій конференції «Современная биология: вопросы и ответы» (м. Санкт-Петербург, Російська Федерація, 2012), VIII Міжнародній науково-практичній конференції «DNY VĚDY – 2012» (м. Прага, Чеська Республіка, 2012), Міжнародній науково-практичній конференції «Современные проблемы географии, экологии и природопользования» (м. Волгоград, Російська Федерація, 2012), VI Міжнародній конференції «Ecological and hydrometeorological problems of the large cities and industrial areas» (м. Санкт-Петербург, Російська Федерація, 2012), II Міжнародній заочній науково-практичній конференції «Современная научная мысль: проблемы и перспективы развития» (м. Чебоксари, Російська Федерація, 2012), II Міжнародній науково-технічній конференції «Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов мирового океана» (м. Владивосток, Російська Федерація, 2012), Міжнародній заочній науково-практичній конференції «Urgent problems of natural sciences» (м. Тамбов, Російська Федерація, 2012), Міжнародній науково-технічній конференції «Наука и образование – 2012» (м. Мурманськ, Російська Федерація, 2012).

Публікації. За результатами наукових досліджень опубліковано 65 наукових праць, із них 8 статей, з яких 6 – у фахових виданнях, 1 – у журналі

бази SCOPUS, та 57 тез доповідей, 1 патент України на винахід, 1 патент України на корисну модель.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 166 сторінках машинописного тексту і складається з таких структурних частин: «Вступ», «Огляд літератури» (1 розділ), «Результати досліджень» (5 розділів), «Обговорення», «Висновки», «Список використаних джерел», який містить 251 посилання (з них 213 іноземних авторів). Робота містить 35 таблиць та 5 рисунків.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Розділ 1. Біосинтез поверхнево-активних речовин на промислових відходах.

Наведено літературні дані про біосинтез поверхнево-активних речовин мікробного походження за використання як субстратів рослинних олій (у тому числі й пересмажених) та відходів після їх виробництва, відходів молочної, цукрової, нафтопереробної промисловості, а також гліцерину, лігноцелюлозних і крохмалевмісних відходів.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Розділ 2. Матеріали і методи досліджень

Об'єкти досліджень. Як основний об'єкт досліджень використовували виділений із забрудненого ґрунту бактеріальний штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [Пирог, 2004].

У роботі використовували чисті культури бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Echerichia coli* ІЕМ-1), дріжджів (*Candida scottii* М-8, *Candida tropicalis* ПБТ-5, *Candida albicans* Д-6, *Candida utilis* БВС-65, *Candida guilliermondii* МБ-4, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3), і мікроміцетів (*Aspergillus niger* Р-3, *Penicillium chryzogenum* Ф-7) з колекції живих культур мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

У дослідженнях також використовували фітопатогенні бактерії *Pseudomonas syringae* УКМ В-1027, *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049, *Pectobacterium carotovorum* УКМ В-1095 з Української колекції мікроорганізмів (УКМ) та фітопатогенні бактерії *Xantomonas vesicatoria* 7790, *Pseudomonas corrugate* 9070 з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Культивування *R. erythropolis* ЕК-1. Культивування бактерій здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/дм³): NaNO₃ – 1,3; NaCl – 1,0; Na₂HPO₄ – 0,6; KH₂PO₄ – 0,14; MgSO₄·7H₂O – 0,1; FeSO₄·7H₂O – 0,01; рН 6,8–7,0. Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол, *n*-гексадекан, гліцерин, рідкі парафіни (*n*-алкани C₁₀–C₁₆), соняшникову олію, пересмажену соняшникову олію, відходи олієжирового виробництва (олійний фуз) у концентрації 0,5–2 % (об'ємна частка), а також мелясу (0,1–1 % масова частка за вуглеводами). Як додаткове джерело вуглецю вносили глюкозу, мелясу (0,1–0,8 %, масова частка за вуглеводами)

або *n*-гексадекан (0,1–0,8 %, об'ємна частка) на початку культивування, в експоненційній та стаціонарній фазі росту продуцента.

Для дослідження впливу металів на ріст і синтез ПАР штамом ЕК-1 Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} (0,01–0,5 мМ, окремо і у різних комбінаціях) у вигляді 1М розчинів солей $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_4$ відповідно, вносили у середовище на початку процесу культивування, в експоненційній і стаціонарній фазі росту.

Як посівний матеріал використовували добову культуру, вирощену на глюкозо-картопляному агаризованому середовищі (ГКА), а також культуру з експоненційної фази росту, вирощену на рідкому середовищі наведеного вище складу з 1 % (об'ємна частка) основного джерела вуглецю. Посівний матеріал (10^4 – 10^5 клітин/см³) вносили у концентрації 1–10 % від загального об'єму середовища. Культивування *R. erythropolis* ЕК-1 здійснювали в колбах об'ємом 750 см³ із 100 см³ середовища на качалці (320 об/хв) при температурі 30 °С упродовж 48–168 год.

Мелясу попередньо розводили дистильованою водою у два рази й підкислювали сульфатною кислотою до рН 4. Стерилізацію проводили при 112 °С упродовж 30 хв.

Визначення параметрів росту і синтезу поверхнево-активних речовин. Біомасу визначали за оптичною густиною культуральної рідини з наступним перерахунком на абсолютно суху вагу за калібрувальним графіком (у разі гомогенної суспензії) або ваговим методом (у разі утворення конгломератів клітин). При визначенні біомаси ваговим методом здійснювали осадження клітин з культуральної рідини (5000 г, 30 хв). Перед осадженням клітин культуральну рідину піддавали дворазовому відмиванню гексаном від *n*-гексадекану і рідких парафінів або бензином від соняшникової олії. Вимірювання поверхневого натягу (σ_s) здійснювали на напівавтоматичному тензіометрі «LAUDA TD 1С» (Німеччина). Для експрес-оцінки вмісту ПАР у культуральній рідині використовували показник «умовна концентрація ПАР» (ПАР*, безрозмірні одиниці), який визначали як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини в точці різкого збільшення поверхневого натягу на кривій залежності σ_s від логарифму показника розведення. Концентрацію позаклітинних ПАР (г/дм³) визначали ваговим методом після трикратної екстракції поверхнево-активних ліпідів з супернатанту культуральної рідини сумішшю Фолча (хлороформ-метанол, 2:1) з наступним випарюванням у вакуумі при температурі 50 °С до постійної маси. Індекс емульгування визначали за методом, описаним у роботі [Cooper, 1987]. Як субстрат для емульгування використовували соняшкову олію.

Визначення антимікробних властивостей препаратів ПАР. Із супернатанту культуральної рідини (препарат 1), екстрагуванням сумішшю Фолча виділяли ПАР (препарат 2). Водна фаза, що залишилася після екстракції, умовно названа препарат 3. Концентрацію ПАР у препаратах 1 і 2 встановлювали ваговим методом після екстракції сумішшю Фолча.

У вихідних суспензіях досліджуваних тест-культур, вирощених на агаризованих середовищах при 30 °С, визначали кількість живих клітин за методом Коха (КУО/см³). Потім суспензію тест-культур вносили у пробірки (1,5 см³), додавали по 1,5 см³ препаратів ПАР, витримували упродовж 1 і 2 год при температурі, оптимальній для їх росту, після чого встановлювали кількість живих клітин за методом Коха. Вживання клітин визначали як відношення кількості живих клітин у оброблених препаратами ПАР зразках до кількості клітин у вихідній суспензії і виражали у відсотках.

Визначення антиадгезивних властивостей препаратів ПАР. Матеріали зубних протезів очищали за допомогою мийного засобу «Gala», ополіскували у дистильованій воді і стерилізували при 112 °С упродовж 30 хв. Частину матеріалу обробляли препаратами 1, 2 або 3, а іншу – стерильною дистильованою водою (контроль), для чого поміщали пластинки на 24 год у препарат (або дистильовану воду) і витримували в термостаті при 30°С. Потім контрольні і попередньо оброблені препаратами пластинки ополіскували 10 см³ стерильної дистильованої води для видалення залишку препаратів. Для забезпечення прикріплення клітин на поверхню матеріалів у суспензію тест-культур поміщали попередньо оброблені препаратами і контрольні пластинки матеріалу і витримували 2 год при кімнатній температурі, потім ополіскували 10 см³ стерильної водопровідної води для видалення неадгезованих клітин. Пластинки поміщали у колбу із 20 см³ стерильної водопровідної води і кульками бісеру та струщували 5 хв, щоб змити адгезовані клітини. Кількість клітин у суспензії визначали за методом Коха. Рівень адгезії клітин визначали як відношення кількості прикріплених клітин на попередньо оброблених препаратами 1, 2 або 3 зразках до кількості клітин на контрольних зразках і виражали у відсотках [Nitschke, 2009].

Дослідження біодеструкції нафти. *Моделювання забрудненого нафтою і металами ґрунту.* У пластикову ємність вносили 1 кг ґрунту, 20 см³ нафти, препарати ПАР (100–300 см³) у вигляді постферментаційної культуральної рідини чи супернатанту і 0,01 % діамонійфосфату. У разі комплексного забруднення нафтою та металами у ґрунт додавали 0,01–0,05 мМ Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺. Зразки кожні три дні перемішували для покращення аерації і зволожували, тривалість експерименту – 30 діб.

Моделювання забруднених нафтою і металами водою. Дослідження процесу очищення води від нафти та катіонів міді за участю препаратів ПАР проводили у ємності, що містила 2 дм³ бюветної води, а також 0,01–0,05 мМ Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ окремо і у різних комбінаціях. На поверхню води наносили нафту (2,6 г/дм³), після чого додавали препарати ПАР (постферментаційна культуральна рідина у концентрації 5 % від об'єму води). Як джерело біогенних елементів використовували діамонійфосфат (0,01 %). Загальну кількість живих клітин у бюветній воді упродовж експерименту визначали за методом Коха на МПА.

Дослідження ефективності очищення води від нафти біопрепаратом «Деворойл». Використовували ємність з 2 дм³ води, на поверхню якої наносили

5,2 г нафти, 40 см³ препарату (згідно рекомендацій виробника) та спостерігали за змінами упродовж 21 доби. Загальну кількість живих клітин у зразках упродовж експерименту визначали за методом Коха на МПА. Час експозиції 21 доба.

Дослідження захисних властивостей поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1. *Захист клітин *R. erythropolis* ЕК-1 від токсичного впливу міді.* Культуральну рідину, отриману після культивування штаму ЕК-1 упродовж 48 год (середина експоненційної фази) та 72 год (початок стаціонарної фази) піддавали ультрацентрифугуванню (10000 g, 5 хв). Клітини суспендували у стерильній водопровідній воді і повторно центрифугували (10000 g, 5 хв), після чого ресуспендували у такому самому об'ємі стерильної водопровідної води (суспензія клітин, вільних від ПАР). У пробірки типу erpendorf поміщали по 1,5 см³ культуральної рідини (клітини + ПАР) і суспензію клітин, позбавлених ПАР; потім вносили Cu²⁺ у концентрації 0,01, 0,05 та 0,1 мМ, витримували у термостаті при 30 °С упродовж 1 год, після чого визначали кількість живих клітин за методом Коха на ГКА. Вживання клітин визначали як відношення кількості клітин у обробленій Cu²⁺ суспензії до кількості клітин у необробленій суспензії.

Дослідження здатності ПАР захищати природну нафтоокиснювальну мікрофлору води від Cu²⁺. Бактерії, ізольовані із забруднених нафтою зразків води, змивали із скошеного МПА стерильною водопровідною водою (контроль) або стерильним супернатантом культуральної рідини штаму ЕК-1. В одержані суспензії вносили Cu²⁺ (0,01–0,05 мМ). Усі зразки витримували у термостаті впродовж 30 хв при температурі 30 °С, потім визначали кількість живих клітин на МПА за методом Коха. Вживання клітин визначали як відношення кількості клітин у обробленій Cu²⁺ суспензії до кількості клітин у необробленій суспензії.

Визначення активності алкангідроксилази. Культуру, отриману після вирощування *R. erythropolis* ЕК-1 на рідкому поживному середовищі з *n*-гексадеканом, обробляли гексаном для видалення залишків *n*-гексадекану, після чого відділяли клітини бактерій фільтруванням під вакуумом на воронці Бюхнера. Послідовно промивали осад клітин на паперовому фільтрі (під вакуумом) гексаном і 0,05 М К⁺-фосфатним буфером, рН 7,0. Відмиті клітини суспендували в 0,05 М К⁺-фосфатному буфері, рН 7,0, і руйнували ультразвуком (22 кГц) 4 рази по 60 с при 4 °С на апараті УЗДН-1 (Росія). Дезінтеграт центрифугували (12000 g, 30 хв, 4 °С), осад відкидали, надосадову рідину використовували як безклітинний екстракт. Для отримання безклітинних екстрактів використовували клітини з експоненційної фази росту. Активність алкангідроксилази (КФ 1.14.15.3) визначали спектрофотометрично за окисненням НАДФН при 340 нм з використанням *n*-гексадекану як донора електронів. При вивченні впливу катіонів міді на активність алкангідроксилази в реакційну суміш вносили 0,01; 0,05 і 0,1 мМ Cu²⁺ у вигляді 5 % розчину CuSO₄·5H₂O.

Розділ 3. Альтернативні джерела вуглецю для синтезу поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1. Відомо, що відходи, утворені у результаті переробки сільськогосподарських культур (цукрового буряку, соєвих бобів, картоплі, тощо) або виробництва олій, можуть використовуватись як субстрати у біотехнології, у тому числі й для біосинтезу ПАР [Müller, 2010; Nitschke, 2010].

Наші експерименти показали, що використання пересмаженої олії (1–2 %) як джерела вуглецю для культивування штаму *R. erythropolis* ЕК-1 дало змогу підвищити умовну концентрацію ПАР майже у 3 рази порівняно з культивуванням на *n*-гексадекані (табл. 1). Індекс емульгування нативної культуральної рідини за використання олієвмісних субстратів становив 35–59 %, що у 1,4–2 рази нижче, ніж на *n*-гексадекані. Це може свідчити про те, що за культивування на відходах штам ЕК-1 синтезує переважно метаболіти з поверхнево-активними властивостями.

Таблиця 1 – Синтез поверхнево-активних речовин за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на олієвмісних субстратах

Субстрат	Концентрація субстрату, %	Показники синтезу ПАР	
		Е ₂₄ , %	ПАР*
Відходи оліє-жирових виробництв	1,0	35	5,3±0,3
	2,0	38	4,3±0,2
Пересмажена соняшникова олія	1,0	49	12,3±0,6
	2,0	37	14,3±0,7
<i>n</i> -Гексадекан (контроль)	2,0	70	4,8±0,2

Примітки:

1. Табл. 1 – 3: при визначенні індексу емульгування культуральної рідини похибка досліду не перевищувала 5 %.

Відомо, що ефективність біотехнологічних процесів залежить від багатьох факторів, серед яких не останню роль відіграє якість посівного матеріалу, зокрема, природа джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту. Показано, що найвища концентрація ПАР на олієвмісних субстратах спостерігалась за використання посівного матеріалу з експоненційної фази росту, вирощеного на мелясі та пересмаженій соняшниковій олії: 3,2 і 1,7 г/дм³ відповідно.

Враховуючи дані сучасної наукової літератури, а також хімічну природу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 (гліколіпіди) ми припустили, що внесення додаткового вуглеводного субстрату (наприклад, глюкози) у середовище із олією може супроводжуватись збільшенням показників синтезу цільового продукту за рахунок наявності майже готових блоків у середовищі культивування. Дійсно, у разі додавання глюкози (0,1 %) у середовище з 2 % пересмаженої олії на початку процесу культивування штаму ЕК-1 спостерігали підвищення концентрації синтезованих ПАР у 4 рази (до 6,8 г/дм³) порівняно із вирощуванням *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі без глюкози (табл. 2).

Теоретично глюкоза може бути замінена на дешеву альтернативу мелясу. Проте за внесення меляси (0,1 %, масова частка за вуглеводами) в експоненційній фазі росту штаму ЕК-1 на олії максимальна концентрація синтезованих ПАР становила 4 г/дм³, що менше, ніж за додавання глюкози.

Таблиця 2 – Залежність синтезу поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 від концентрації та моменту внесення глюкози

Момент внесення глюкози (фаза росту)	Концентрація глюкози, %	Показники синтезу ПАР	
		Е ₂₄ , %	Концентрація ПАР, г/дм ³
Лаг фаза	0,1	47	6,8±0,3
	0,2	45	3,6±0,2
	0,3	39	2,1±0,1
Експоненційна	0,1	42	2,5±0,1
	0,2	42	4,5±0,2
	0,3	40	3,1±0,2
Стационарна	0,1	38	2,8±0,1
	0,2	49	2,6±0,1
	0,3	51	2,9±0,2
Контроль	0	42	1,7±0,1

Розділ 4. Вплив катіонів металів на ріст і синтез поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1. З літератури відомо, що ПАР здатні захищати мікроорганізми від токсичного впливу важких металів, утворюючи стабільні комплекси з ними [Kavamura, 2010; Tyagi, 2011]. Відомо, що у відповідь на дію стрес-факторів багато які мікроорганізми синтезують протекторні сполуки, якими можуть бути й ПАР. У зв'язку з цим ми припустили, що за внесення у середовище катіонів металів можна очікувати підвищення синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1.

На першому етапі досліджували вплив катіонів міді на синтез ПАР за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на етанолі. Встановлено, що у разі додавання 0,01 мМ Cu²⁺ в експоненційній фазі росту штаму ЕК-1 синтез ПАР підвищувався на 25 % порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без катіонів міді. На наступному етапі Cu²⁺ вносили у середовище культивування *R. erythropolis* ЕК-1 з гідрофобними субстратами – *n*-гексадеканом, рідкими парафінами (табл. 3) та соняшниковою олією. За таких умов спостерігали зовсім інші закономірності, ніж при вирощуванні продуцента на етанолі. Так, клітини, вирощені на гідрофобних субстратах, виявилися стійкішими до катіонів міді, оскільки витримували вищі її концентрації (0,1 і 0,5 мМ); а інтенсифікація синтезу ПАР за наявності катіонів міді була більш суттєвою, ніж на етанолі і досягала 40–44 %.

За наявності у середовищі Cd²⁺ чи Pb²⁺ ріст штаму ЕК-1 і синтез ПАР пригнічувалися, проте після пересіву таких клітин на середовище без Pb²⁺ спостерігали збільшення на 10–20 % індексу емульгування культуральної

рідини порівняно з використанням інокуляту, вирощеного на середовищі без катіонів плумбуму.

Таблиця 3 – Синтез ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 залежно від концентрації і моменту внесення Cu^{2+} у середовище з рідкими парафінами

Момент внесення Cu^{2+} (фаза росту)	Концентрація Cu^{2+} , мМ	Біомаса, г/дм ³	ПАР*	E ₂₄ , %
–	0	0,9±0,045	5,0±0,22	58
Експоненційна	0,01	0,85±0,04	5,5±0,28	60
	0,05	0,8±0,03	6,4±0,32	65
	0,1	0,9±0,045	7,8±0,4	68
	0,5	0,7±0,04	3,9±0,2	58
Стаціонарна	0,01	0,8±0,03	5,3±0,26	65
	0,05	0,7±0,04	5,2±0,26	69
	0,1	0,75±0,04	5,5±0,28	60
	0,5	0,7±0,04	4,2±0,21	62

Наступні експерименти показали, що незалежно від природи джерела вуглецю у середовищі внесення Cu^{2+} (0,01–0,1 мМ) в експоненційній з наступним додаванням Cd^{2+} (0,01 мМ) у стаціонарній фазі росту штаму ЕК-1 супроводжувалось підвищенням синтезу ПАР до 20 % порівняно з показниками на середовищі без металів.

Відомо [Piróg, 2010], що окиснення *n*-гексадекану у штаму ЕК-1 здійснюється трьохкомпонентним алкангидроксилазним комплексом, до складу якого входить алкангидроксилаза, активаторами якої є катіони міді [van Beilen, 2007]. У зв'язку з цим ми припустили, що інтенсифікація синтезу ПАР на вуглеводнях за додавання катіонів купруму зумовлена їх позитивним впливом на активність цього ферменту. Дійсно, за присутності 0,05 і 0,1 мМ катіонів міді у реакційній суміші активність алкангидроксилази штаму ЕК-1 підвищувалась в 1,5 і 2 рази відповідно порівняно з активністю без Cu^{2+} .

З іншого боку, підвищення синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 за наявності Cu^{2+} у середовищі культивування може бути зумовлене захисними функціями даних метаболітів. Так, показано, що виживання клітин штаму ЕК-1 за дії 0,01–0,1 мМ катіонів міді було вищим (0,38–63,4 %) за присутності ПАР, ніж без них (0 %).

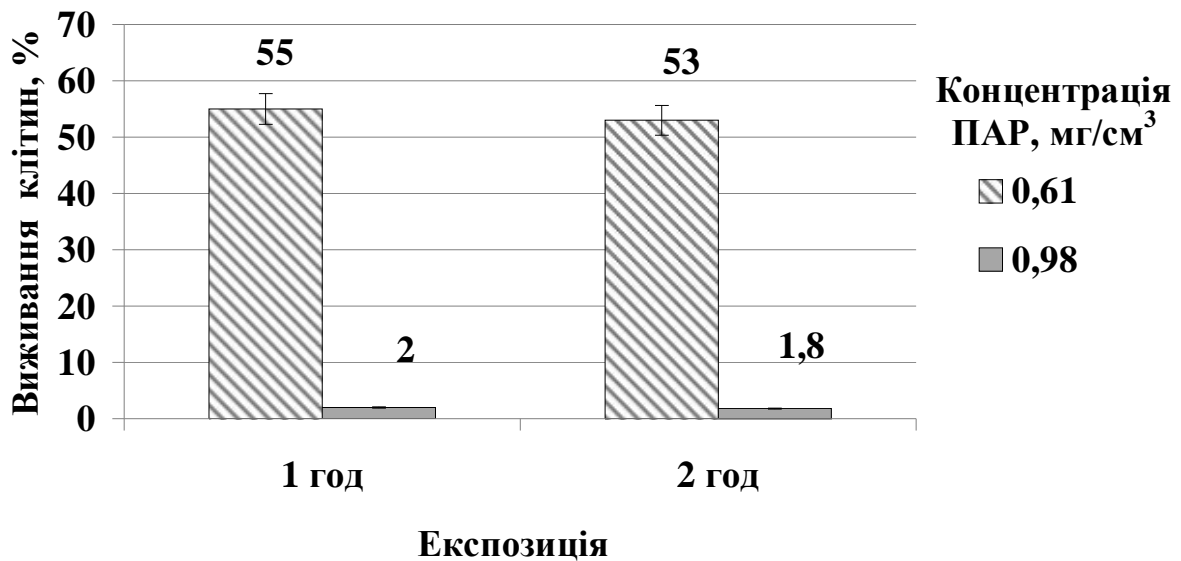
На основі одержаних експериментальних даних розроблено технологічну схему (Додаток А дисертаційної роботи) біосинтезу ПАР за умов росту *R. erythropolis* ЕК-1 на середовищі з пересмаженою соняшниковою олією.

Технологічний процес біосинтезу ПАР складається з допоміжних (приготування і стерилізація мінеральних компонентів середовища для одержання інокуляту і біосинтезу, а також розчину меляси, глюкози, сульфатів заліза і купруму) та основних (підтримання колекційної культури, одержання робочої культури з колекційної; вирощування посівного матеріалу на агаризованому і рідкому середовищі, виробничий біосинтез ПАР із внесенням

глюкози на початку культивування та катіонів міді у середині експоненційної фази росту продуцента) робіт. На технологічній схемі наведено основні параметри кожного з етапів процесу, а також точки мікробіологічного та технологічного контролю.

Розділ 5. Поверхнево-активні речовини *R. erythropolis* ЕК-1 як антимікробні та антиадгезивні агенти. Необхідність розробки сучасних препаратів з антимікробними властивостями зумовлена збільшенням кількості патогенних мікроорганізмів, резистентних до відомих біоцидів. Увага до потенційного застосування ПАР мікробного походження у медицині значно зросла за останні десятиріччя. Бактерицидна, фунгіцидна та противірусна активність, а також антиадгезивні властивості роблять доцільним використання цих речовин у терапевтичних цілях [Moellering, 2011; Kalyani, 2011].

Проведені експерименти показали, що препаратам ПАР (0,61–0,98 г/дм³) штаму ЕК-1 у вигляді супернатанту культуральної рідини були притаманні антимікробні властивості щодо *B. subtilis* БТ-2, *C. tropicalis* ПБТ-5 та *C. albicans* Д-6. Так, за обробки ПАР (0,98 мг/см³) *B. subtilis* БТ-2 спостерігали загибель майже 98 % клітин через годину експозиції (рис. 1). За нижчої концентрації ПАР (0,61 мг/см³) виживання клітин становило 53–55 % незалежно від тривалості обробки.



Початкова концентрація клітин *B. subtilis* БТ-2 (добова культура) у суспензії – $4 \cdot 10^6$ КУО/см³.

Рисунок 1 – Вплив концентрації ПАР на виживання *B. subtilis* БТ-2.

Аналіз літературних даних [Luna, 2011; Gudina, 2010] показав, що у складі біоплівки на матеріалах зубних протезів було ідентифіковано широкий спектр мікроорганізмів, серед яких зустрічаються бактерії *E. coli* та дріжджі роду *Candida*. Враховуючи вищесказане, досліджували антиадгезивні властивості позаклітинних метаболітів *R. erythropolis* ЕК-1 щодо бактеріальних і дріжджових культур мікроорганізмів на матеріалах зубних протезів.

Встановлено, що розчин очищених ПАР (препарат 2) у концентрації 0,0625–0,25 г/дм³ знижував адгезію клітин *E. coli* IEM-1 і *S. albicans* Д-6 на силіконовому базисі та полімерах зубів на 45–65 % порівняно з адгезією на необроблених ПАР поверхнях. Подальші експерименти показали, що антиадгезивні властивості притаманні й препаратам ПАР у вигляді супернатанту.

Оскільки актуальною проблемою сучасності є боротьба з бактеріозами сільськогосподарських культур [Гвоздяк, 2011], на наступному етапі досліджували антимікробну дію ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 щодо деяких фітопатогенних бактерій. Експериментально показано, що найбільша інгібувальна дія була притаманна препарату 2 – розчину ПАР. При цьому ступінь виживання фітопатогенних бактерій родів *Pseudomonas* і *Xanthomonas* становив 10–70 % через 2 год експозиції. Одержані результати є перспективними для створення екологічно безпечних біопрепаратів для контролю чисельності фітопатогенних бактерій.

Розділ 6. Використання клітин *R. erythropolis* ЕК-1 та їх метаболітів для деструкції нафтових забруднень. В останнє десятиліття у літературі з'являється дедалі більше інформації стосовно застосування мікробних ПАР у природоохоронних технологіях для видалення як важких токсичних металів, так і комплексних забруднень, що містять різноманітні вуглеводні та метали [Jayabarath, 2009].

Наші дослідження показали, що найвищий ступінь деструкції (86,4 %) нафти у ґрунті (20 см³/кг) спостерігався за присутності 300 см³ препарату ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини (табл. 4).

Відомо, що забруднення навколишнього середовища часто носять змішаний характер. Так, забруднені нафтопродуктами ґрунт і вода можуть також містити важкі метали [Туагі, 2011]. Наші експерименти показали високу (до 99 %) ефективність використання невеликих (5 %, об'ємна частка) концентрацій препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 у вигляді постферментаційної культуральної рідини для деструкції нафти у воді, що містила катіони міді (0,01–0,1 мМ). Ми припускаємо, що поверхнево-активні речовини, потрапляючи у забруднену воду, утворюють комплекси з міддю, а також емульгують нафту, у результаті чого відбувається детоксикація Cu^{2+} і підвищується біодоступність нафти як для *R. erythropolis* ЕК-1, так і для природної нафтоокиснювальної мікрофлори, чисельність якої у воді після обробки ПАР збільшувалась (дані не наведено). Виживання клітин нафтоокиснювальної мікрофлори води за присутності ПАР та катіонів міді (0,01–0,05 мМ) у суспензії становило 76–95 %, тоді як без ПАР – 0,1–0,4 %, що вказує на захисні властивості цих метаболітів щодо токсичної дії металу.

Зазначимо, що за присутності Cu^{2+} (0,1 мМ) ступінь деструкції нафти збільшувався не лише у воді, а й у ґрунті (20 см³/кг), у тому числі й за наявності катіонів інших токсичних металів. Враховуючи, що концентрація катіонів міді була невисокою (0,01–0,1 мМ), ми припускаємо, що одним з механізмів, що зумовлюють підвищення деструкції нафти за наявності Cu^{2+} може бути також

активація алкангідроксилаз як штаму ЕК-1, так і природної нафтоокиснювальної мікрофлори.

Таблиця 4 – Ступінь деструкції нафти у ґрунті препаратами ПАР *R. erythropolis* ЕК-1

Препарати ПАР	Концентрація препарату ПАР, см ³ /кг ґрунту	Концентрація залишкової нафти, г/кг ґрунту	Ступінь деструкції нафти, %
Культуральна рідина	100	7,0±0,012	67
	200	5,7±0,023	73
	300	2,9±0,019	86
Супернатант	100	11,6±0,026	45
	200	10,4±0,015	51
	300	9,3±0,021	56
Контроль	0	21,4±0,015	0

Примітки:

1. Табл. 4–5: при визначенні ступеню деструкції нафти похибка досліду не перевищувала 5 %.

За останні 10 років в країнах СНД створено понад два десятки біопрепаратів на основі вуглеводеньокиснювальних мікроорганізмів для деструкції нафтових забруднень. На заключному етапі роботи (табл. 5) проводили порівняння препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 у вигляді постферментаційної культуральної рідини із комерційним препаратом «Деворойл» (виробник ТОВ «Мікробні технології», м. Москва).

Таблиця 5 – Дослідження біодеструкції нафти у воді за використання препарату «Деворойл» та ПАР штаму ЕК-1

Препарат	Доба	Залишкова кількість нафти, г/дм ³	Ступінь деструкції нафти, %	Мікрофлора води, КУО/см ³
«Деворойл»	7	2,28±0,11	12	(2,2±0,11) · 10 ⁴
	14	1,76±0,09	32	(7,2±0,36) · 10 ⁴
	21	0,98±0,05	62	(2,0±0,1) · 10 ⁵
ПАР штаму ЕК-1	21	0,13±0,01	95	(3,9±0,19) · 10 ⁵

Примітки:

1. Початкова концентрація мікроорганізмів у бюветній воді – 3,2·10³ КУО/см³.

2. Як препарати ПАР використовували пост ферментаційну культуральну рідину.

Наші експерименти показали, що ступінь деструкції нафти (2,6 г/дм³) у воді за обробки препаратами ПАР штаму ЕК-1 становив 95 %, тоді як у разі використання «Деворойлу» – 62 %.

Одержані дані свідчать про високий потенціал практичного застосування препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 для ефективної біоремедіації екосистем, забруднених нафтопродуктами, а також їхню конкурентну спроможність. У Додатку Б дисертаційної роботи наведено оцінку прогнозованої економічної ефективності очищення забрудненої нафтою ділянки ґрунту препаратами ПАР штаму ЕК-1. Результати порівняння витрат на біоремедіацію забрудненого ґрунту із величиною попередженого збитку навколишньому середовищу свідчать про економічну доцільність впровадження запропонованої біотехнології.

ВИСНОВКИ

На основі отриманих експериментальних даних розроблена нова економічно вигідна технологія біосинтезу ПАР, що дасть змогу утилізувати промислові відходи використанням їх як ростових субстратів, а також підвищити рентабельність біотехнологічних виробництв за рахунок економії витрат на сировину. Використання препаратів ПАР у природоохоронних технологіях у вигляді постферментаційної культуральної рідини забезпечує підвищення економічної ефективності виробництва через відсутність стадій виділення та очищення продукту.

1. Встановлено можливість використання відходів промисловості (оліє-жирового виробництва, пересмаженої соняшникової олії, меляси, рідких парафінів) для синтезу ПАР *R. erythropolis* ЕК-1.

2. Внесення глюкози (0,1 %) у середовище на початку культивування *R. erythropolis* ЕК-1 з пересмаженою олією (2,0 %) супроводжувалось підвищенням кількості синтезованих ПАР у 4 рази (до 6,8 г/дм³) порівняно з показниками синтезу за відсутності глюкози. Найвищі показники синтезу ПАР на пересмаженій олії спостерігалися за використанням інокуляту, вирощеного на мелясі. У цьому разі кількість синтезованих ПАР була удвічі вищою, ніж за використання посівного матеріалу, вирощеного на пересмаженій олії.

3. Внесення 0,01–0,05 мМ Cu^{2+} в експоненційній фазі росту *R. erythropolis* ЕК-1 на гідрофільних (етанол) і гідрофобних (соняшникова олія, *n*-гексадекан, рідкі парафіни) субстратах супроводжувалось підвищенням умовної концентрації ПАР на 25–44 % порівняно з вирощуванням на середовищі без Cu^{2+} . Інтенсифікація синтезу ПАР на вуглеводнях зумовлена активуючим впливом катіонів міді на активність алкангідроксилази штаму ЕК-1.

4. Встановлено, що препарати ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 (0,61–2,1 мг/см³) у вигляді супернатанту культуральної рідини проявляли антимікробну дію щодо ряду мікроорганізмів (*B. subtilis* БТ-2, *S. tropicalis* ПБТ-5, *S. albicans* Д-6). Виживання мікробних клітин за присутності ПАР залежало від концентрації препарату, експозиції, а також фізіологічного стану тест-культур і становило 3–26 % від початкової кількості клітин у суспензії.

5. Показано, що за обробки упродовж 2 год препаратами ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 виживання клітин фітопатогенних бактерій родів

Pseudomonas та *Xanthomonas* становило 10–70 %. Отримані результати свідчать про перспективність використання мікробних ПАР для розробки екологічно безпечних препаратів для контролю чисельності фітопатогенних бактерій.

6. Показано, що ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 знижували адгезію *E. coli* ІЕМ-1 та *C. albicans* Д-6 на стоматологічних матеріалах. За обробки поверхонь зубних протезів препаратами ПАР як у вигляді супернатанту, так і розчину очищених ПАР адгезія клітин бактерій і дріжджів знижувалась на 45–65 % порівняно із необробленими матеріалами.

7. Встановлено, що за використання невисоких концентрацій (5 %) препаратів ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини *R. erythropolis* ЕК-1 ступінь деструкції нафти у воді (2,6 г/дм³) за присутності Cu^{2+} (0,01–0,05 мМ) становив 75–95 %, у той час як за обробки забрудненої води препаратом «Деворойл» – 62 %. Механізм біоремедіації комплексних забруднень у воді полягає у солюбілізації нафти ПАР, активації катіонами міді алкангідроксилаз як штаму ЕК-1, так і природної нафтоокиснювальної мікрофлори, а також захисних функцій ПАР.

8. Ступінь розкладання комплексних з важкими металами нафтових забруднень у ґрунті був найвищим за наявності препаратів ПАР (200–300 см³/кг ґрунту) та катіонів міді (0,1 мМ) і становив 92–99 %.

9. У результаті теоретичного розрахунку показано, що коефіцієнт ефективності капіталовкладень ($E_p=0,633$) для очищення забрудненої нафтою ділянки ґрунту препаратами ПАР штаму ЕК-1 у 4 рази перевищує нормативний показник ($E_n=0,15$). Це свідчить про те, що величина попередженого економічного збитку від забруднення нафтою є вищою, ніж витрати на біотехнологічний спосіб очищення ґрунту препаратами ПАР.

СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Морозова А.П. Дослідження здатності поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 до активації деструкції нафти у воді / А.П. Морозова* // Харчова промисловість. – 2008. – № 7. – С. 36–39.

Особистий внесок дисертанта: дослідження здатності ПАР R. erythropolis ЕК-1 до активації деструкції нафти у воді (моделювання забруднення, визначення ступеню деструкції нафти, кількості мікрофлори у зразках).

2. Роль поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 і *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 в процесах очищення ґрунту від нафтових забруднень / А.П. Морозова*, А.І. Сорокіна, Т.П. Пирог, С.І. Антонюк // Наукові праці НУХТ. – 2009. – № 29. – С. 17–20.

Особистий внесок дисертанта: дослідження процесів біодеструкції нафти у ґрунті препаратами ПАР R. erythropolis ЕК-1 (моделювання забруднення, визначення ступеню деструкції нафти).

3. Конон А.Д. Дослідження антимікробних властивостей поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 / А.Д. Конон, А.П. Морозова*, Т.П. Пирог // Наукові праці НУХТ. – 2010. – № 32. – С. 57–59.

Особистий внесок дисертанта: дослідження антимікробної дії супернатанту R. erythropolis ЕК-1 на тест-культури бактерій.

4. Пирог Т.П. Использование промышленных отходов с целью получения поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 / Т.П. Пирог, А.П. Морозова*, М.Д. Кундеев // Наукові праці ОНАХТ. – 2010. – Вип. 38, Т. 2. – С. 163–166.

Особистий внесок дисертанта: дослідження здатності штаму ЕК-1 до синтезу ПАР за використання олієвмісних відходів та пересмаженої олії (визначення показників синтезу ПАР, підбір способу підготовки посівного матеріалу)

5. Морозова А.П. Альтернативні джерела вуглецю для синтезу поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 / А.П. Морозова*, М.Д. Кундеев, Т.П. Пирог // Наукові праці НУХТ. – 2011. – № 37–38. – С. 77–81.

Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу ПАР R. erythropolis ЕК-1 на олієвмісних субстратах, можливості інтенсифікації біосинтезу за внесення додаткового джерела вуглецю.

6. Софілканич А.П. Синтез поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 за присутності важких металів / А.П. Софілканич, І.В. Квятківська, Т.П. Пирог // Харчова промисловість. – 2011. – № 10–11. – С. 121–126.

Особистий внесок дисертанта: дослідження здатності штаму ЕК-1 до утворення ПАР за додавання катіонів металів у поживне середовище (визначення параметрів росту та синтезу ПАР).

7. Пат. 63962 Україна, МПК С 12 N 1/20 (2006.01). Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Софілканич А.П., Кундеев М.Д. ; заявник і патентовласник Національний університет харчових технологій. – № u 201103813 ; заявл. 29.03.2011 ; опубл. 25.10.2011, Бюл. № 20.

Особистий внесок дисертанта: дослідження росту R. erythropolis ЕК-1 та синтезу ПАР за умов культивування продуценту на промислових відходах

8. Пат. 98571 Україна, МПК С 12 N 1/20, С 12 P 1/04. Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Софілканич А.П., Кундеев М.Д. ; заявник і патентовласник Національний університет харчових технологій. – № а 201103809 ; заявл. 29.03.2011 ; опубл. 25.05.2012, Бюл. № 10.

Особистий внесок дисертанта: дослідження можливості використання відходів оліє-жирової промисловості, пересмаженої олії, гліцерину, м'яса та рідких парафінів як субстратів для синтезу ПАР R. erythropolis ЕК-1.

9. Дія поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на деякі мікроорганізми / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, А.П. Софілканич, А.Б. Скочко // Мікробіологічний журнал. – 2011. – Т.73, № 3. – С. 14–20.

Особистий внесок дисертанта: дослідження антимікробних властивостей ПАР R. erythropolis ЕК-1 щодо деяких бактерій.

10. Біотехнологічний потенціал бактерій роду *Rhodococcus* та їх метаболітів / Т.П. Пирог, М.О. Шулякова, Т.А. Шевчук, А.П. Софілканич // Біотехнологія. – 2012. – Т.5, № 2, – С. 51–68.

Особистий внесок дисертанта: дослідження можливості використання препаратів ПАР R. erythropolis ЕК-1 у природоохоронних технологіях, а також визначення можливості біосинтезу ПАР на промислових відходах.

11. Морозова А.П. Биосурфактанты *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1: синтез на промышленных отходах и использование в природоохранных технологиях / А.П. Морозова*, М.Д. Кундеев, Т.П. Пирог // Регионы в условиях неустойчивого развития : междунар. науч.-практ. конф., 28-30 апреля 2010 г. : тезисы докл. – Шарья, 2010. – С.622–627.

Особистий внесок дисертанта: дослідження здатності штаму ЕК-1 до синтезу ПАР за використання олієвмісних відходів та пересмаженої олії, а також можливості застосування препаратів ПАР для очищення ґрунту та води від нафтових забруднень

12. Морозова А.П. Влияние поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 и *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на эффективность микробной деструкции нефтяных загрязнений / А.П. Морозова*, Т.П. Пирог, С.И. Антонюк // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии : междунар. науч. конф., 31 мая-4 июня 2010 г. : тезисы докл. – Минск, 2010. – С. 372–374.

Особистий внесок дисертанта: дослідження ефективності деструкції нафти у забрудненій воді та ґрунті препаратами ПАР R. erythropolis ЕК-1 (моделювання забруднення, визначення ступеню деструкції нафти, кількості мікрофлори у зразках)

13. Industrial wastes as substrates for microbial surfactants synthesis / А.Р. Morozova*, Т.Р. Pirog, N.A. Manzhula, M.D. Kundeev // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии : междунар. науч. конф., 31 мая-4 июня 2010 г. : тезисы докл. – Минск, 2010. – С. 374–376.

Особистий внесок дисертанта: дослідження здатності штаму ЕК-1 до синтезу ПАР за умов культивування на промислових відходах

14. Промышленные отходы как субстраты для получения микробных поверхностно-активных веществ / А.П. Софилканич, А.Д. Конон, Н.А. Гриценко, И.В. Квятковская, Т.П. Пирог // Актуальные вопросы науки : I междунар. науч.-практ. конф., 30 апреля 2011 г. : тезисы докл. – Москва, 2011. – С. 89–94.

Особистий внесок дисертанта: дослідження можливості використання відходів оліє-жирової промисловості, пересмаженої олії, гліцерину, м'яса та рідких парафінів як субстратів для синтезу ПАР R. erythropolis ЕК-1.

15. Софилканич А.П. Утилизация пережаренного масла бактериями *Rhodococcus erythropolis* Ас-5017 / А.П. Софилканич, И.В. Квятковская, Т.П. Пирог // Инновационные технологии переработки продовольственного

сырья: междунар. науч.-техн. конф., 16-18 ноября 2011 г. : тезисы докл. – Владивосток, 2011. – С. 458–460.

Особистий внесок дисертанта: дослідження закономірностей утворення ПАР R. erythropolis EK-1 за використання пересмаженої соняшникової олії як джерела вуглецю та енергії.

16. Биоремедиация загрязненной нефтью и тяжелыми металлами воды препаратами микробных поверхностно-активных веществ / А.П. Софилканич, А.Д. Конон, И.В. Квятковская, С.А. Парфенюк, Т.П. Пирог // Биологический мониторинг природно-техногенных систем : всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, 29-30 ноября 2011 г. : тезисы докл. – Киров, 2011. – С. 116–119.

Особистий внесок дисертанта: дослідження процесу біоремедіації комплексних з важкими металами нафтових забруднень води та ґрунту препаратами ПАР штаму EK-1.

17. Антимікробні та антиадгезивні властивості поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 і *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 / А.Д. Конон, А.П. Софилканич, Х.А. Покора, Т.П. Пирог // Формування, охорона та захист здоров'я в сучасних умовах : міжнар. наук.-практ. конф., 24-25 лютого 2012 р. : тези допов. – Одеса, 2012. – С. 6–9.

Особистий внесок дисертанта: дослідження дії препаратів ПАР R. erythropolis EK-1 на адгезію бактерій та дріжджів.

18. Antimicrobial activity of exocellular metabolites of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Nocardia vaccinii* K-8 against phytopathogenic bacteria / С.А. Pokora, К.В. Chebotareva, А.Д. Конон, А.Р. Sofilkanich, Т.Р. Pirog // Развитие гуманитарных наук : междунар. науч.-практ. конф., 27-29 февраля 2012 г. : тезисы докл. – Познань, 2012. – С. 30–33.

Особистий внесок дисертанта: дослідження антимікробних властивостей препаратів позаклітинних метаболітів штаму EK-1 щодо фітопатогенних бактерій.

19. Sofilkanich A.P. Water remediation by biosurfactant preparation *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 in presence of Cu^{2+} / А.Р. Sofilkanich, I.V. Filyuk, Т.Р. Pirog // Развитие гуманитарных наук : междунар. науч.-практ. конф., 27-29 февраля 2012 г. : тезисы докл. – Познань, 2012. – С. 41–44.

Особистий внесок дисертанта: дослідження деструкції нафти у воді за наявності катіонів міді та обробки препаратами ПАР R. erythropolis EK-1.

20. Antimicrobial and antiadhesive properties of surfactants synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 / А.Д. Конон, А.Р. Sofilkanich, Kh.A. Pokora, К.В. Chebotarova, Т.Р. Pirog // Медицина в XXI веке: традиции и перспективы : I междунар. интернет-конф., 12-15 марта 2012 г. : тезисы докл. – Казань, 2012. – С. 308–311.

Особистий внесок дисертанта: дослідження антимікробних та антиадгезивних властивостей ПАР R. erythropolis EK-1 щодо бактеріальних та дріжджових культур.

21. Пирог Т. Влияние катионов меди на синтез поверхностно-активных веществ и эффективность очистки экосистем от нефти / Т. Пирог, А. Софилканич, И. Филюк // Развитие країн в умовах глобалізації: технологічні, економічні, соціальні та екологічні проблеми : міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., 15-16 березня 2012 р. : тези допов. – Тернопіль, 2012. – С. 135–137.

Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу ПАР R. erythropolis EK-1 на різних субстратах за додавання катіонів міді, вивчення процесу біоремедіації комплексних з важкими металами нафтових забруднень препаратами ПАР

22. Внеклеточные метаболиты *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* K-8 как препараты для биоконтроля над фитопатогенными бактериями / А.Д. Конон, А.П. Софилканич, К.А. Покора, К.В. Чеботарева, Т.П. Пирог, Г.А. Иутинская // Современная биология: вопросы и ответы : II междунар. науч. конф., 29-30 марта 2012 г. : тезисы докл. – Санкт-Петербург, 2012. – С. 44–49.

Особистий внесок дисертанта: дослідження виживання фітопатогенних бактерій за обробки препаратами ПАР штаму EK-1 різного ступеню очищення.

23. Utilization of industrial wastes with production of microbial surfactants of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 with multifunctional application / A.D. Konon, A.P. Sofilkanych, Ya.V. Andruschenko, I.L. Labovka, T.P. Pirog // DNY VĚDY – 2012 : VIII Mezinarodni vědecko – prakticka konference, 27 březen – 05 dubna 2012 roku : abstracts. – Praha, 2012. – P. 29–33.

Особистий внесок дисертанта: дослідження росту R. erythropolis EK-1 та синтезу ПАР за умов культивування продуценту на промислових відходах.

24. Использование микробных поверхностно-активных веществ в природоохранных технологиях / А.Д. Конон, А.П. Софилканич, И.В. Филюк, С.А. Парфенюк, Т.А. Шевчук, Т.П. Пирог // Современные проблемы географии, экологии и природопользования : междунар. науч.-практ. конф., 25-26 апреля 2012 г. : тезисы докл. – Волгоград, 2012. – С. 342–346.

Особистий внесок дисертанта: дослідження ефективності деструкції нафти у забрудненій воді та ґрунті препаратами ПАР R. erythropolis EK-1 (моделювання забруднення, визначення ступеню деструкції нафти, кількості мікрофлори у зразках).

25. Bioutilization of industrial wastes with production of Microbial surfactants with multifunctional application / A.D. Konon, A.P. Sofilkanych, Kh.A. Pokora, S.A. Parfenyuk, T.P. Pirog // Ecological and hydrometeorological problems of the large cities and industrial areas : VI International conference, 2-4 July 2012 : abstracts. – Saint-Petersburg, 2012 – P. 255–257.

Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу ПАР штаму EK-1 на промислових відходах, а також перспективи їх практичного застосування для очищення довкілля від нафти та для створення біопрепаратів з антимікробними властивостями.

26. Утилизация отходов пищевой промышленности с получением практически ценных микробных метаболитов – поверхностно-активных веществ / А.Д. Конон, А.П. Софилканич, Я.В. Андрущенко, И.Л. Лабовка, Т.П. Пирог // Современная научная мысль: проблемы и перспективы развития : II междунар. заочная науч.-практ. конф., 4 июня 2012 г. : тезисы докл. – Чебоксары, 2012. – С. 150–152.

Особистий внесок дисертанта: дослідження росту R. erythropolis EK-1 та синтезу ПАР за умов культивування продуценту на промислових відходах.

27. Использование микробных поверхностно-активных веществ для очистки загрязненной нефтью воды в присутствии тяжелых металлов / А.Д. Конон, А.П. Софилканич, И.В. Филюк, С.А. Парфенюк, Т.А. Шевчук, Т.П. Пирог // Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов мирового океана : II междунар. науч.-техн. конф., 22-24 мая 2012 г. : тезисы докл. – Владивосток, 2012. – С. 205–208.

Особистий внесок дисертанта: дослідження можливості застосування клітин та ПАР R. erythropolis EK-1 для деструкції комплексних з важкими металами нафтових забруднень води та ґрунту.

28. Use of biosurfactant preparations of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 for water remediation / A.P. Sofilkanich, A.D. Konon, I.V. Filyuk, K.V. Panasyuk, T.P. Pirog // Urgent problems of natural sciences : int. correspond. scientific-pract. conf., March 19, 2012 : abstracts. – Tambov, 2012. – P. 54–59.

Особистий внесок дисертанта: дослідження процесу очищення води, забрудненої нафтою та катіонами металів, препаратами ПАР R. erythropolis EK-1

29. Use of biosurfactant preparations of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 for oil polluted water remediation in presence of Cu^{2+} / A.P. Sofilkanich, I.V. Filyuk, T.A. Shevchuk, T.P. Pirog // Наука и образование – 2012 : междунар. науч.-техн. конф., 2-6 апреля 2012 г. : тезисы докл. – Мурманск, 2012. – С. 360–362.

Особистий внесок дисертанта: дослідження можливості застосування ПАР R. erythropolis EK-1 для очищення води, що містить комплексні з важкими металами нафтові забруднення.

* – прізвище Морозова змінено на Софілканич.

АНОТАЦІЯ

Софілканич А.П. Розробка технології поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* EK-1 з використанням промислових відходів. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний університет харчових технологій МОНМС України, Київ, 2012.

Дисертаційна робота присвячена розробці технологій поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* EK-1 з використанням пересмаженої

соняшникової олії та дослідженню практичного використання ПАР у природоохоронних технологіях.

Розроблена технологія дає змогу отримати до 10 г/дм³ ПАР за умов культивування *R. erythropolis* ЕК-1 на пересмаженій олії (2 %), використання інокуляту, вирощеного на мелясі, внесення у середовище 0,1 % глюкози на початку культивування та 0,1 мМ Cu²⁺ у експоненційній фазі росту.

Показано, що за дії препаратів ПАР штаму ЕК-1 виживання мікроорганізмів, у тому числі й фітопатогенних бактерій, становило 10–70 % порівняно із зразками без ПАР. За обробки препаратами ПАР стоматологічних матеріалів спостерігали зниження адгезії клітин бактерій та дріжджів на 45–65 % порівняно із необробленими поверхнями.

За використання препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 у вигляді постферментаційної культуральної рідини максимальний ступінь деструкції комплексних з металами нафтових забруднень у воді (2,6 г/дм³) і ґрунті (20 см³/кг) становив 75–99 %.

Ключові слова: *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, поверхнево-активні речовини, пересмажена соняшникова олія, інтенсифікація біосинтезу

АННОТАЦІЯ

Софилканич А.П. Разработка технологии поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 с использованием промышленных отходов. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности – 03.00.20. Национальный университет пищевых технологий МОНМС, Киев, 2012.

Диссертационная работа посвящена разработке технологии поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 с использованием пережаренного подсолнечного масла, а также и исследованию практического использования ПАВ в природоохранных технологиях.

Разработанная технология позволяет получить до 10 г/дм³ ПАВ при культивировании *R. erythropolis* ЕК-1 на пережаренном масле (2 %), использовании инокулята, выращенного на мелассе, внесении в среду 0,1 % глюкозы в начале культивирования и 0,1 мМ Cu²⁺ в экспоненциальной фазе роста.

Показано, что при действии препаратов ПАВ штамма ЕК-1 выживание микроорганизмов, в том числе и фитопатогенных бактерий, составляло 10–70 % по сравнению с образцами без ПАВ. При обработке препаратами ПАВ стоматологических материалов наблюдали снижение адгезии клеток бактерий и дрожжей на 45–65 % по сравнению с необработанными поверхностями.

При использовании препаратов ПАВ *R. erythropolis* ЕК-1 в виде постферментационной культуральной жидкости максимальная степень деструкции комплексных с металлами нефтяных загрязнений в воде (2,6 г/дм³) и почве (20 см³/кг) составляла 75–99 %.

Ключевые слова: *Rhodococcus erythropolis* EK-1, поверхностно-активные вещества, пережаренное подсолнечное масло, интенсификация биосинтеза.

SUMMARY

Sofilkanych A.P. Development of technology of surface-active substances of *Rhodococcus erythropolis* EK-1 with the use of industrial wastes. – Manuscript.

Dissertation for the degree of candidate of technical sciences in specialty 03.00.20. National University of Food Technologies MESYS of Ukraine, Kyiv, 2012.

The dissertation thesis is devoted to a development of technology of surface-active substances (surfactants) synthesized by *Rhodococcus erythropolis* EK-1 using fried sunflower oil, and to investigation of practical use of surfactants in environmental technologies.

Surfactants synthesized by microorganisms are used in various fields of industry, but their rational use depends primarily on economic efficiency. One of the ways to reduce the cost of surfactant technology is the use of cheap growth substrates, such as waste from other industries.

The strain of oil oxidizing bacteria, identified as *R. erythropolis* EK-1, was isolated from oil-contaminated water and soil samples at the Department of Biotechnology and Microbiology of National University of Food Technologies in previous studies. The ability of strain EK-1 to synthesize surfactants on *n*-hexadecane and ethanol was established and the composition of nutrient medium and conditions of producer's cultivation were optimized. The physiological fundamentals of surfactant synthesis regulation were defined during the growth of *R. erythropolis* EK-1 on hydrophilic and hydrophobic compounds and technology was scaled to fermentation equipment

The possibility of replacing of high-cost substrates (*n*-hexadecane and ethanol) for the surfactant biosynthesis by *R. erythropolis* EK-1 with industrial waste (oil and fat industry, fried sunflower oil, glycerol, liquid paraffin) was established. The highest rates of surfactants synthesis were observed on oil containing substrates and exceeded those on *n*-hexadecane and ethanol by 1,3–3 folds.

The technology of surfactant biosynthesis by *R. erythropolis* EK-1 was worked out and include: 1) the use of fried sunflower oil as carbon and energy source (2 %); 2) use of inoculum grown on molasses 3) addition of glucose (0.1 %) at the beginning of cultivation and 0.1 mM Cu²⁺ in the middle of the exponential growth phase into the medium with oil. Implementation of this technology makes possible increasing the concentration of extracellular surfactant by 4–4,5 folds compared to previous technologies with *n*-hexadecane and ethanol.

A technological scheme of surfactants' biosynthesis by *R. erythropolis* EK-1 on medium with fried sunflower oil was designed. It consists of auxiliary work (preparing and sterilization of nutrient medium for inoculum obtaining and biosynthesis process) and major works (growing of inoculum and biosynthesis).

The stimulation of surfactants synthesis by strain EK-1 by introducing of copper cations (0,01–0,1 mM) into a medium with hydrophilic (ethanol) and

hydrophobic (*n*-hexadecane, liquid paraffin, fried sunflower oil) substrates in the middle of the exponential growth phase was shown. Intensification of surfactants synthesis on hydrocarbons in the presence of Cu^{2+} was caused by activation of alkane hydroxylase of *R. erythropolis* EK-1. Activity of alkane hydroxylase of strain EK-1 increased by 1.5 and 2 folds in the presence of 0.05 and 0.1 mM copper cations in the reaction mixture respectively compared with activity without Cu^{2+} .

It was established that surface-active substances inherent protective functions from Cu^{2+} influence. Thus, the survival of cells of strain EK-1 in presence of surfactants and 0.01–0.1 mM of copper cations was significantly higher (0,38–63,4 %) than without surfactants (0%).

It was found that surfactants' preparations of *R. erythropolis* EK-1 (0,61–2,1 mg/cm³) as supernatant of cultural liquid showed antimicrobial effect on a number of microorganisms (*Bacillus subtilis* BT-2, *Candida tropicalis* PBT-5, *Candida albicans* D-6). Survival of microbial cells in the presence of surfactants depended on their concentration, duration of exposition, and the physiological state of the test cultures and was 3–26 % of the initial number of cells in suspension.

We have shown that cell survival of pathogenic bacteria of genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas* was 10–70 % after the treatment with surfactants' preparations of *R. erythropolis* EK-1 for 2 h. These results suggest a promising use of microbial surfactants for the development of environmentally friendly products to control the number of pathogenic bacteria.

The ability of surfactants' preparations of *R. erythropolis* EK-1 to reduced adhesion of *E. coli* IEM-1, *B. subtilis* B-2 and *C. albicans* D-6 on dental materials was shown. An adhesion of bacteria and yeast cells decreased by 45–65 % after the treatment of dental prostheses with surfactants' preparations as supernatant and purified surfactant solution, compared to untreated materials.

It was found that the use of low concentrations (5 %) of as post-fermentative cultural liquid of *R. erythropolis* EK-1 led to the 75–95 % degradation of oil in water (2.6 g/dm³) in the presence of Cu^{2+} (0.01–0.05 mM), while in the case of treatment with preparation «Devoroyl» 65 % of oil degraded. The mechanism of bioremediation of complex pollution in water consists in oil solubilization with surfactants, activation of alkane hydroxylases in strain EK-1 and in indigenous oil-oxidizing microflora with copper cations and in protective functions of surfactants.

The highest degree of degradation (92–99 %) of the complex pollutions with heavy metals and oil in the soil was in the presence of surfactant preparations (200–300 cm³/kg of soil) and copper cations (0.1 mM).

Keywords: *Rhodococcus erythropolis* EK-1, surface-active substances, fried sunflower oil, biosynthesis intensification.