

Т.П. Пирог^{1,2}, К.А. Покора¹, О.Ю. Машенко¹, Т.А. Шевчук²

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* К-8 НА ТЕХНИЧЕСКОМ ГЛИЦЕРИНЕ

Исследовали влияние компонентов технического глицерина (соли калия и натрия, этанол, метанол) – побочного продукта производства биодизеля на образование поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* К-8, а также возможность интенсификации синтеза ПАВ штаммом К-8 на техническом глицерине в присутствии предшественников биосинтеза (глюкоза, подсолнечное масло, органические кислоты).

Установлено, что внесение в среду с очищенным глицерином (1 %) хлорида калия (натрия) в концентрации 2,5 % и этанола (метанола) в концентрации 0,3 % сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ в 1,4–1,7 раза по сравнению с показателями на среде без добавления солей и спиртов. При культивировании штамма К-8 на среде с техническим глицерином условная концентрация ПАВ была в 3 раза выше, чем на аналогичной среде с очищенным субстратом. Внесение в стационарной фазе роста *N. vaccinii* К-8 в среду с техническим глицерином (2,2 %), глюкозы (0,05 %), подсолнечного масла (0,05 %), фумарата и цитрата (0,1 %) сопровождалось увеличением количества синтезированных ПАВ на 17–44 % по сравнению с культивированием бактерий на среде без предшественников.

К л ю ч е в ы е с л о в а: бактерии рода *Nocardia*, поверхностно-активные вещества, интенсификация биосинтеза, отходы производства биодизеля, технический глицерин.

Ранее [4] нами было установлено, что штамм *Nocardia vaccinii* К-8, изолированный из загрязненной нефтью почвы, синтезирует поверхностно-активные вещества при культивировании в среде с глицерином. С помощью однофакторных экспериментов и математических методов планирования оптимизирован состав питательной среды, обеспечивающий максимальные показатели синтеза ПАВ.

В предыдущих исследованиях в качестве субстрата для выращивания штамма К-8 использовали очищенный глицерин [4]. Однако отходами производства биодизеля является так называемая глицериновая фракция, или технический глицерин. Для получения биодизеля осуществляют переэтерификацию растительных масел (животных жиров) с метанолом или этанолом (на 1 т масла расходуется около 200 кг спирта) с использованием в качестве катализатора гидроксида натрия или калия [6]. В связи с этим технический глицерин содержит не более 60–80 % глицерина, а также соли калия (натрия), остатки жирных кислот, спиртов и воду [2, 6, 27]. Основной проблемой на сегодняшний день является получение микроорганизмов-продуцентов практически ценных метаболитов, устойчивых к потенциальным ингибиторам, содержащимся в глицериновой фракции (метанол, натриевые и калиевые соли) [6].

Ранее нами было установлено, что одновременное внесение в среду с очищенным глицерином 0,1–0,2 % фумарата (предшественник глюконеогенеза) и 0,1–0,2 % цитрата (регулятор синтеза липидов) в начале стационарной фазы роста штамма К-8 сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ на 40–45 % по сравнению с культивированием бактерий в среде без органических кислот [4]. Учитывая химический состав ПАВ *N. vaccinii* К-8 (комплекс нейтральных, глико- и аминоклипидов), предположили, что использование в качестве предшественников глюкозы и растительных масел также позволит интенсифицировать синтез поверхностно-активных веществ.

Цель данной работы – исследовать возможность использования технического глицерина для синтеза поверхностно-активных веществ *N. vaccinii* К-8, а также возможность интенсификации синтеза ПАВ на этом субстрате в присутствии предшественников углеводной и липидной природы.

© Т.П. Пирог, К.А. Покора, О.Ю. Машенко, Т.А. Шевчук, 2013

Материалы и методы. Культивирование *N. vaccinii* К-8 осуществляли в жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): NaNO_3 – 0,5; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; pH 6,8–7,0. [4].

В качестве источника углерода и энергии использовали **очищенный** (>99,5 %) глицерин в концентрации 1,0 % (по объему). Для модификации среднего состава технического глицерина (табл. 1) в минеральную среду с очищенным глицерином вносили NaCl или KCl в концентрации 2,5 %, а также метанол или этанол – 0,3 % (по объему). Такой субстрат далее в тексте называется «**модифицированный глицерин**». В качестве источника углерода использовали также **технический глицерин**, являющийся отходом производства биодизеля (Запорожский биотопливный завод). Концентрация технического глицерина в среде культивирования составляла 2–10 % (по объему). При использовании технического глицерина в качестве субстрата его содержание в среде пересчитывали на эквимольное по углероду концентрации очищенного глицерина, с учетом среднего содержания в глицериновой фракции (70 %). В одном из вариантов в среду с очищенным глицерином вносили NaCl и KCl в концентрации 1–10 %.

В начале процесса культивирования, в экспоненциальной и стационарной фазе роста штамма К-8 в среду с очищенным и техническим глицерином вносили глюкозу (0,01–0,5 %) или подсолнечное масло (0,01–0,5 % по объему). В одном из вариантов в начале стационарной фазы роста *N. vaccinii* К-8 в среду вносили 0,1 % фумарата и 0,1 % цитрата. Органические кислоты вносили в виде 10 %-ных растворов натриевых солей.

Таблица 1

Состав различных видов глицерина [2]

Вид глицерина	Содержание, мас. %				
	Глицерин	Метанол (этанол)	Ароматические соединения	Соли (NaCl, KCl R-COONa и др.)	Вода
Технический	60–80	10–25	0–10	3–30	0–15
Технический после предварительной очистки	>80	<0,5	0–5	0–5	10–15
Очищенный	>99,5	–	Сульфатная зола не более 0,01		–

В качестве посевного материала использовали культуру из экспоненциальной фазы роста, выращенную на среде указанного выше состава с 0,5 % глицерина (очищенного или технического). Количество инокулята – 10 % от объема засеваемой среды (10^4 – 10^5 клеток/мл).

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30 °С в течение 168–240 ч.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии с последующим пересчетом на сухую биомассу по калибровочному графику. Способность к синтезу ПАВ оценивали по таким показателям: поверхностное натяжение (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), а также количество синтезированных ПАВ (г/л), которые определяли, как описано нами ранее [19].

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Лакину [1]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. На первом этапе исследовали влияние примесей, содержащихся в техническом глицерине (калиевые и натриевые соли, метанол, этанол), на рост *N. vaccinii* К-8 и синтез поверхностно-активных веществ

В табл. 2 представлены данные по влиянию различных концентраций NaCl и KCl на синтез биомассы и ПАВ. Отметим, что даже в присутствии максимальной из исследованных концентраций NaCl (10 %) не наблюдали существенного ингибирования роста штамма К-8, а при концентрации 1–6 % этой соли и 1–10 % KCl отмечали повышение уровня биомассы (табл. 2). Внесение в среду с очищенным глицерином NaCl (1–4 %) и KCl (1–6 %) сопровождалось повышением синтеза ПАВ в 1,5–2 раза.

Таблица 2

**Рост и синтез ПАВ *N. vaccinii* К-8 в зависимости от содержания
в среде катионов натрия и калия**

Соли	Концентрация, г/л	ПАВ*	ПАВ*, % от контроля	Биомаса, г/л	Биомаса (г/л), % от контроля
Контроль	0	2,0±0,10	–	0,8±0,04	–
NaCl	1,0	3,9±0,20	195±10	1,4±0,07	175±9
	2,0	3,7±0,19	185±9	1,3±0,07	163±8
	3,0	3,2±0,16	160±8	1,4±0,07	175±9
	4,0	2,8±0,14	140±7	1,2±0,06	150±8
	5,0	2,3±0,12	115±6	1,1±0,06	138±7
	6,0	1,9±0,10	95±5	1,0±0,05	125±6
	7,0	1,5±0,08	75±4	0,8±0,04	95±5
	8,0	1,1±0,06	55±3	0,9±0,05	113±6
	9,0	0	0	0,7±0,04	88±4
	10,0	0	0	0,7±0,04	88±4
KCl	1,0	3,8±0,19	190±9	1,0±0,05	125±6
	2,0	4,1±0,21	205±10	1,1±0,06	138±7
	3,0	4,3±0,22	215±11	1,1±0,06	138±7
	4,0	3,7±0,19	185±9	1,2±0,06	150±8
	5,0	3,4±0,17	170±8	1,2±0,06	150±8
	6,0	3,0±0,15	150±7	1,1±0,06	138±7
	7,0	2,4±0,12	120±6	0,9±0,05	113±6
	8,0	2,3±0,12	115±6	1,0±0,05	125±8
	9,0	1,8±0,09	90±5	0,9±0,05	113±6
	10,0	1,4±0,07	70±4	0,9±0,05	113±6

Примечания. Табл. 2–4, 6–8 – длительность культивирования – 168 ч. Контроль (100%) – показатели на среде без NaCl и KCl.

Критическими для образования ПАВ оказались концентрации хлорида натрия и калия 7–8 и 10 % соответственно (табл. 2). В таких условиях наблюдали снижение условной концентрации ПАВ в 1,3–2 раза по сравнению с показателями на среде, не содержащей NaCl и KCl.

В последующих экспериментах исследовали возможность использования неочищенного глицерина в качестве субстрата для получения ПАВ *N. vaccinii* К-8. Для этого моделировали средний состав глицериновой фракции по количеству остаточных спиртов (метанол или этанол) и хлоридов натрия или калия (см. раздел «Материалы и методы»). Показатели синтеза ПАВ на модифицированном глицерине представлены в табл. 3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при наличии в среде с очищенным глицерином как спиртов, так и хлоридов не наблюдается ингибирования роста штамма К-8 и синтеза ПАВ. Более того, культивирование *N. vaccinii* К-8 на таком модифицированном глицерине сопровождалось повышением условной концентрации ПАВ на 44–68 % по сравнению с показателями на среде без спиртов и хлоридов (табл. 3).

В дальнейших экспериментах была установлена возможность роста и синтеза ПАВ *N. vaccinii* К-8 не только на модифицированной глицериновой фракции, но и на техническом глицерине, полученном непосредственно от завода-производителя (табл. 4). Как видно из представленных в табл. 4 данных, условная концентрация ПАВ при культивировании штамма К-8 на техническом глицерине была в 1,7 и 3 раза выше, чем на модифицированном и очищенном соответственно.

В табл. 5 представлены данные по синтезу ПАВ при выращивании *N. vaccinii* К-8 на среде с различными концентрациями технического глицерина. Максимальная концентрация ПАВ (4,24–4,78 г/л) наблюдалась при культивировании штамма К-8 на среде, содержащей 4 % субстрата, причем с увеличением длительности процесса количество синтезированных поверх-

ностно-активных веществ повышалось незначительно. Отметим, что даже при концентрации технического глицерина в среде 10 % не наблюдали ингибирования роста бактерий: уровень биомассы во всех вариантах составлял 0,7–0,8 г/л и не отличался от такового на среде с 1 % очищенного глицерина. В то же время повышение концентрации технического глицерина в среде сопровождалось снижением синтеза ПАВ (табл. 5).

Таблица 3

Синтез ПАВ *N. vaccinii* К-8 на модифицированном глицерине

Спирт, %	Хлориды, %	ПАВ*	ПАВ*, % от контроля
0	0	2,5±0,12	–
0	KCl, 2,5	3,9±0,19	156±8
	NaCl, 2,5	3,2±0,16	128±6
Метанол, 0,3	KCl, 2,5	3,7±0,18	148±7
	NaCl, 2,5	4,2±0,21	168±8
Этанол, 0,3	KCl, 2,5	4,0±0,20	160±8
	NaCl, 2,5	3,6±0,18	144±7

Примечание. Контроль (100 %) – показатели на среде без спиртов, NaCl и KCl.

Таблица 4

Синтез ПАВ при культивировании *N. vaccinii* К-8 на среде с различными видами глицерина

Глицерин	ПАВ *	ПАВ*, % от контроля
Очищенный (контроль)	2,5±0,13	–
Модифицированный	4,2±0,21	168±8
Технический (отход производства биодизеля)	7,6±0,38	304±15

Примечания: Контроль (100 %) – показатели синтеза на очищенном глицерине (1 %). Различные виды глицерина эквивалентны по углероду. Модифицированный глицерин: очищенный глицерин + 2,5 % NaCl + 0,3 % метанола.

Таблица 5

Влияние различных концентраций технического глицерина в среде культивирования *N. vaccinii* К-8 на синтез ПАВ

Концентрация глицерина, % по объему	Длительность культивирования, ч	ПАВ, г/л
2	168	3,40±0,17
	240	3,28±0,16
4	168	4,24±0,21
	240	4,78±0,23
6	168	2,96±0,14
	240	3,00±0,15
8	168	1,80±0,09
	240	1,64±0,08
10	168	1,52±0,07
	240	1,38±0,06

Примечание. Концентрация биомассы во всех вариантах составляла 0,7–0,8 г/л.

Следующий этап был посвящен исследованию синтеза ПАВ *N. vaccinii* К-8 на глицеринсодержащей среде в присутствии предшественников углеводной (глюкоза) и липидной (подсолнечное масло) природы (табл. 6 и 7). В данных экспериментах в качестве ростового субстрата использовали очищенный глицерин. Как видно из представленных в табл. 6 и 7 данных, максимальная интенсификация синтеза ПАВ наблюдалась при добавлении глюкозы и подсолнечного масла в концентрации 0,05 % в стационарной фазе роста штамма К-8. В таких условиях культивирования концентрация синтезированных ПАВ повышалась на 62–65 % по сравнению с показателями на среде без предшественников.

Дальнейшие эксперименты показали, что и при выращивании *N. vaccinii* К-8 на техническом глицерине можно повысить синтез ПАВ добавлением глюкозы или подсолнечного масла в стационарной фазе роста бактерий (табл. 8). Отметим, что в этом случае увеличение синтеза ПАВ было не столь существенным, как на очищенном глицерине. Так, внесение глюкозы (0,05 %) и подсолнечного масла (0,05 %) в среду с техническим глицерином сопровождалось увеличением концентрации синтезированных ПАВ на 17–44 % по сравнению с показателями на среде без глюкозы и подсолнечного масла (табл. 8).

Таблица 6

Влияние концентрации и момента внесения глюкозы на синтез ПАВ при культивировании *N. vaccinii* К-8 на глицерине

Момент внесения глюкозы (фаза роста)	Концентрация глюкозы, %	ПАВ *	ПАВ*, % от контроля	ПАВ, г/л	ПАВ (г/л), % от контроля
контроль (без глюкозы)	0	2,2±0,11	–	1,72±0,09	–
Лаг-фаза	0,1	2,5±0,13	114±6	2,08±0,11	121±6
	0,3	2,2±0,11	95±5	1,80±0,09	105±5
	0,5	2,2±0,12	95±5	1,76±0,09	102±5
Экспоненциальная	0,1	1,6±0,08	73±3	0,98±0,05	57±3
	0,3	1,5±0,08	68±3	1,14±0,06	66±3
	0,5	1,8±0,09	82±4	1,02±0,05	59±3
Стационарная	0,01	2,4±0,12	109±5	2,10±0,11	122±6
	0,03	2,5±0,13	114±6	2,36±0,12	137±7
	0,05	2,8±0,14	127±6	2,84±0,14	165±8
	0,1	2,7±0,14	123±6	2,28±0,12	133±7
	0,3	2,6±0,13	118±6	2,24±0,11	130±6
	0,5	2,5±0,13	114±6	1,9±0,10	111±5

Примечание. Контроль (100 %) – показатели на среде без глюкозы.

Таблица 7

Зависимость синтеза ПАВ *N. vaccinii* К-8 от концентрации и момента внесения подсолнечного масла в среду с глицерином

Момент внесения масла (фаза роста)	Концентрация масла, %	ПАВ *	ПАВ*, % от контроля	ПАВ, г/л	ПАВ (г/л), % от контроля
контроль (без масла)	-	2,2±0,11	–	1,72±0,09	–
Лаг-фаза	0,1	2,3±0,12	105±5	1,72±0,09	95±5
	0,3	2,2±0,11	95±5	1,80±0,09	105±5
	0,5	2,4±0,12	109±5	1,84±0,09	107±5
Экспоненциальная	0,1	2,9±0,15	132±7	2,16±0,11	126±6
	0,3	3,0±0,15	136±7	2,12±0,11	123±6
	0,5	2,6±0,13	118±6	1,96±0,10	114±6
Стационарная	0,01	2,6±0,13	118±6	2,22±0,11	129±7
	0,03	3,0±0,15	136±7	2,34±0,12	136±7
	0,05	3,7±0,19	168±8	2,78±0,14	162±8
	0,1	3,7±0,19	168±8	2,56±0,13	149±7
	0,3	3,7±0,19	168±8	2,48±0,12	144±7
	0,5	3,5±0,18	159±8	2,16±0,11	126±6

Примечание. Контроль (100 %) – показатели на среде без подсолнечного масла.

Ранее [4] было показано, что внесение в среду культивирования *N. vaccinii* К-8 с очищенным глицерином органических кислот (фумарата и цитрата) сопровождалось повышением синтеза ПАВ на 40–45 %. Результаты данной работы показали, что при выращивании штамма К-8 на техническом глицерине в присутствии фумарата и цитрата также наблюдалось увели-

чение концентрации синтезированных ПАВ на 44 % по сравнению с показателями на аналогичной среде без органических кислот (табл. 8). Отметим, что количество ПАВ, синтезированных *N. vaccinii* К-8 на среде с техническим глицерином без предшественников, было в два раза выше, чем на очищенном субстрате (3,5 и 1,7 г/л соответственно). Внесение невысоких (0,05 %) концентраций предшественников (фумарат и цитрат, глюкоза, подсолнечное масло) в среду с техническим глицерином позволило повысить показатели синтеза еще на 17–44 %.

Обсуждение. Глицериновая фракция, образующаяся в качестве отхода производства биодизеля, не может быть использована во многих традиционных отраслях применения глицерина (фармацевтическая и косметическая промышленность, военно-промышленный комплекс) без проведения дорогостоящих стадий очистки [6, 9]. В то же время хранение и утилизация неочищенного технического глицерина представляют серьезную экологическую проблему из-за повышенной его щелочности и содержания метанола. В течение года в мире накапливается около 6 млрд т технического глицерина, а потребляется всего лишь 3 млн т, поэтому поиск альтернативных путей его переработки является актуальной проблемой. Рассматриваются такие возможные пути утилизации глицериновой фракции как сжигание, компостирование, а также термохимическая конверсия и биологическое превращение в более ценные продукты [25]. Однако, в связи с наличием ингибиторов в составе технического глицерина, он является значительно менее подходящим субстратом (по сравнению с очищенным) для выращивания микроорганизмов. Поэтому в большинстве процессов микробного синтеза используется очищенный глицерин, а некоторые биотехнологии на основе технического глицерина оказались нерентабельными. Так, экономические расчеты показали, что наиболее приемлемая технологическая схема микробного получения поли-3-гидроксibuтирата из глицерина требует его очистки до 98 % [21].

Таблица 8

Синтез ПАВ при культивировании *N. vaccinii* К-8 на техническом глицерине в присутствии предшественников

Предшественник, %	ПАВ*	ПАВ*, % от контроля	ПАВ, г/л	ПАВ (г/л), % от контроля
Цитрат, 0,1 + фумарат, 0,1	8,5±0,42	112±6	5,08±0,25	144±7
Глюкоза, 0,05	7,8±0,39	103±5	4,10±0,21	117±6
Подсолнечное масло, 0,05	8,3±0,41	109±6	4,36±0,22	124±6
Контроль (без предшественников)	7,6±0,38	–	3,52±0,18	–

Примечание. Контроль (100 %) – показатели на среде без предшественников. Предшественники вносили в стационарной фазе роста. Концентрация технического глицерина в среде 2,2 %.

В то же время галофильные бактерии *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *senegalensis* и *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum* способны ассимилировать технический глицерин и расти при достаточно высоких концентрациях солей, образуя при этом ценные продукты: водород, 1,3-пропандиол, ацетат [11]. Установлено, что оптимальными условиями для максимального накопления водорода является концентрация глицерина 2,5 г/л и хлорида натрия 150 г/л, а также поддержание pH на уровне 7,4 для *H. saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum* и 7,0 для *H. saccharolyticum* subsp. *senegalensis* (образуется 6,2 и 6,3 мМ водорода соответственно) [11].

Rhodopseudomonas palustris CGA009 синтезирует водород из технического глицерина, причем оптимальными являются концентрации глицерина 30 мМ, глутамата 4,5 мМ, а также интенсивность освещения 175 Вт/м² [10]. В таких условиях культивирования образуется 7 моль H₂/моль глицерина. [10].

Известно, что *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 синтезирует практически одинаковые количества экзополисахарида как на очищенном, так и на техническом глицерине (12,18 и 11,82 г/л соответственно) [9].

Изолирован штамм бактерий, идентифицированный как *Kluverera cryocrescens* S26, который способен трансформировать технический глицерин в этанол (27 г/л) с высокой продуктивностью (0,61 г/л/ч) [6].

Установлено, что *Klebsiella pneumoniae* SU6 синтезирует 1,3-пропандиол (1,3-ПД) и 2,3-бутандиол (2,3-БД), используя технический глицерин в качестве единственного источника углерода [16]. Для повышения синтеза этих соединений использовали методы математического моделирования состава питательной среды. Максимальные концентрации 1,3-ПД (24,14 г/л) и 2,3-БД (9,16 г/л) были достигнуты на среде, содержащей 200 г/л технического глицерина, 1,96 г/л дрожжевого экстракта, 2,87 г/л фосфата аммония и 2,16 г/л фумарата натрия. Однако количество 2,3-БД, синтезированное на этой среде, было все-таки существенно ниже, чем на смеси глюкозы и ксилозы (23,2 г/л) [29].

Дрожжи *Yarrowia lipolytica*-101-1.22 на среде с техническим глицерином синтезируют 112 г/л лимонной кислоты [23]. В то же время штамм *Y. lipolytica* Wratislavia K1 способен синтезировать такое количество кислоты только при использовании в качестве субстрата очищенного глицерина, а на техническом концентрация конечного продукта снижается до 86 г/л [7].

Перспективным вариантом использования технического глицерина может быть его био-конверсия в метан анаэробным активным илом [12]. Производство метана имеет существенные преимущества перед другими способами утилизации глицерина: экономичность, простота эксплуатации, использование глицериновой фракции без сложной предварительной обработки. Однако при этом все-таки следует учитывать возможное ингибирование метаногенов высокими концентрациями солей, содержащимися в техническом глицерине, а также необходимость внесения в среду дополнительных азотсодержащих компонентов [12].

Известен процесс анаэробной конверсии технического глицерина (показатель биохимического потребления кислорода 1010 г/кг) с использованием гранулированного и негранулированного ила [25]. Из-за высокой концентрации остаточного КОН в глицериновой фракции в нее добавляли фосфорную кислоту с получением «подкисленного» глицерина, предполагая использовать образуемый калий фосфат в качестве удобрения. При использовании гранулированного ила и «подкисленного» технического глицерина выход метана составлял 0,306 м³/кг субстрата. Эффективность метанообразования при этом составляла 75–76 %, в то время как при использовании очищенного глицерина – 93 % [25].

В других исследованиях установлена возможность использования технического глицерина для получения липидов и каротиноидов дрожжами *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159 [24]. Показано, что внесение в среду сульфата аммония, Tween-20, технического глицерина в концентрации 9,5 %, поддержание соотношения C/N на уровне 85 сопровождалось максимальными показателями синтеза липидов (6,10 г/л при содержании в биомассе 60,7 %) и каротиноидов (135,25 мг/л). Важно, что свойства полученных липидов оказались подходящими для использования их в качестве сырья при производстве биодизеля вместо растительных масел или животных жиров [24]. Таким образом, использование глицерина для синтеза жирных кислот, применяемых в качестве сырья для получения биодизеля, обеспечивает дополнительный бонус технологии в виде компенсации затрат на производство.

Из литературы известно применение технического глицерина для синтеза поверхностно-активных веществ *Bacillus subtilis* LSFM-05 [8], *Ustilago maydis* [14] *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 [28]. Отметим, что только в одной из этих работ [28] приводятся сравнительные показатели синтеза ПАВ на очищенном и техническом глицерине: 1269 и 325 мг/л соответственно. Таким образом, примеси, содержащиеся в глицериновой фракции, ингибируют синтез ПАВ. В большинстве работ, посвященных синтезу ПАВ на глицерине, для культивирования продуцентов использовали очищенный субстрат [17, 18, 22, 26].

Наши исследования показали, что при наличии в среде культивирования *N. vaccinii* K-8 высоких (6–8 %) концентраций хлоридов калия и натрия не только не происходит ингибирования роста и образования ПАВ, но и наблюдается интенсификация биосинтеза (см. табл. 2). Одной из причин этого может быть стимулирующее влияние катионов калия и натрия на активность ферментов катаболизма глицерина, анаэробных реакций и биосинтеза ПАВ. Так, ранее нами было показано, что при культивировании продуцента ПАВ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 на этаноле Na⁺ является активатором фосфоенолпируваткарбоксилазы: в присутствии в реакционной смеси 100 мМ Na⁺ активность фермента повышалась в 1,2–1,3 раза [3]. Замена в среде культивирования *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 нитрата калия на эквивалентную по азоту концентрацию нитрата натрия сопровождалась ин-

тенсификацией метаболических процессов, о чем свидетельствовало повышение активности алкангидроксилазы в 3–4 раза и ферментов центрального метаболизма (для некоторых ферментов в 2–4 раза). В таких условиях культивирования увеличивался и синтез ПАВ штаммом IMB Ac-5017 в 1,5–2 раза [20]. Для *N. vaccinii* K-8 также было показано целесообразность использования именно нитрата натрия в качестве источника азота [4].

Увеличение синтеза ПАВ при наличии в среде с глицерином и солями метанола (этанола) может быть объяснено широкой субстратной специфичностью алкогольдегидрогеназы *N. vaccinii* K-8, как это было установлено нами ранее для нитрозо-N,N-диметиланилин(НДМА)-зависимых ферментов *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *A. calcoaceticus* IMB B-7241 [5]. Так, независимо от источника углерода в среде культивирования штаммов IMB Ac-5017 и IMB B-7241 (глицерин, этанол, *n*-гексадекан) НДМА-зависимые алкогольдегидрогеназы способны окислять все эти субстраты [5]. В работе [15] мы сообщали о функционировании у штамма *N. vaccinii* K-8, растущего на глицерине, НДМА-зависимой алкогольдегидрогеназы и пирролохинолинхинон-зависимой глицериндегидрогеназы. Выяснению субстратной специфичности этих ферментов будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Несмотря на то, что при культивировании штамма K-8 на техническом глицерине количество синтезированных ПАВ было в два раза выше, чем на очищенном субстрате, наши исследования показали возможность дальнейшего повышения показателей синтеза на отходах производства биодизеля добавлением невысоких (0,05–0,1 %) концентраций предшественников (глюкоза, подсолнечное масло, органические кислоты). Отметим, что эффект от внесения этих соединений был существеннее при использовании очищенного глицерина. Мы предполагаем, что это явление может быть обусловлено нарушением транспорта экзогенных предшественников в клетки штамма K-8 в присутствии каких-то компонентов технического глицерина.

Таким образом, в результате проведенной работы установлена возможность использования технического глицерина – побочного продукта производства биодизеля в качестве субстрата для образования ПАВ *N. vaccinii* K-8. Биоконверсия глицерина в микробные поверхностно-активные вещества позволит решить одновременно две актуальные проблемы: во-первых, удешевить технологию получения ПАВ в результате использования в качестве субстрата дешевого сырья; во-вторых, повысить рентабельность производства биодизеля за счет утилизации его побочного продукта глицерина.

Т.П. Пирог^{1,2}, Х.А. Покора¹, О.Ю. Мащенко¹, Т.А. Шевчук²

¹Національний університет харчових технологій, Київ

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* K-8 НА ТЕХНІЧНОМУ ГЛІЦЕРИНІ

Резюме

Досліджували вплив компонентів технічного глицерину (соли калію і натрію, етанол, метанол) – побічного продукту виробництва біодизеля на утворення поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* K-8, а також можливість інтенсифікації синтезу ПАР штамом K-8 на технічному глицерині за присутності попередників біосинтезу (глюкоза, соняшникова олія, органічні кислоти). Встановлено, що внесення у середовище з очищеним глицерином (1 %) хлориду калію (натрію) в концентрації 2,5 % і етанолу (метанолу) в концентрації 0,3 % супроводжувалося підвищенням умовної концентрації ПАР у 1,4–1,7 рази порівняно з показниками на середовищі без добавлення солей і спиртів. За умов росту штаму K-8 на середовищі з технічним глицерином умовна концентрація ПАР була у 3 рази вищою, ніж на аналогічному середовищі з очищеним субстратом. Внесення у стаціонарній фазі росту *N. vaccinii* K-8 у середовище з технічним глицерином (2,2 %) глюкози (0,05 %), соняшникової олії (0,05 %), фумарату і цитрату (0,1 %) супроводжувалося збільшенням кількості синтезованих ПАР на 17–44 % порівняно з культивуванням бактерій на середовищі без попередників.

Ключові слова: бактерії роду *Nocardia*, поверхнево-активні речовини, інтенсифікація біосинтезу, відходи виробництва біодизеля, технічний глицерин.

T.P. Pirog ^{1,2}, Kh. A. Pokora ¹, O. Yu. Mashchenko ¹, T.A. Shevchuk ²

¹ National University of Food Technologies, Kyiv

² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

INTENSIFICATION OF SYNTHESIS BIOSURFACTANTS BY *NOCARDIA VACCINII* K-8 ON CRUDE GLYCEROL

Summary

The authors studied the effect of components of crude glycerol (potassium and sodium salts, ethanol, methanol) – the by-products of biodiesel production on formation of surfactants (surface-active substances, SAS) by *Nocardia vaccinii* K-8, as well as possibility to intensify the SAS synthesis by the strain K-8 on crude glycerol in the presence of biosynthesis precursors (glucose, sun-flower oil, organic substances).

It has been established that the introduction of potassium (sodium) chloride in concentration 2.5 % and ethanol (methanol) in concentration 0.3 % into the medium with refined glycerol (1 %) was accompanied by the 1.4-1.7-fold increase of conditional SAS concentration as compared with indices on the medium without adding salts and alcohols. Under cultivation conditions of strain K-8 on the medium with crude glycerol the conditional SAS concentration was 3-fold higher than on the medium with refined substrate. Introduction of glucose (0.05 %), sun-flower oil (0.05 %), fumarate and citrate (0.1 %) during the stationary growth phase of *N. vaccinii* K-8 into the medium with crude glycerol (2.2 %) was accompanied by the increase in the amount of synthesized SAS by 17-44 % compared with cultivation of bacteria on the medium without precursors.

The paper is presented in Russian.

Key words: bacteria of *Nocardia* genus, biosurfactants, intensification of biosynthesis, biodiesel production waste, crude glycerol.

The authors' address: Pirog T.P., National University of Food Technologies; 68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine.

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Лоцицкий Д.Н., Соколов Б.А. Альтернативное котельное топливо: энергетическое использование биологического топлива в промышленных котельных установках // Энергослужба предприятия. – 2008. – 32, № 2 – С. 38–41.
3. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Долотенко С.Ю. Роль фосфоенолпируваткарбоксилазы у синтезі поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 // Мікробіол. журн. – 2011. – 73, № 4. – С. 9–15.
4. Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д., Антонюк С.И. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* K-8 на отходах производства биодизеля // Микробиол. журн. – 2011. – 73, № 4. – С. 15–23.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 в среде с глицерином // Микробиол. журн. – 2012. – 74, № 1. – С. 20–27.
6. Choi W. J., Hartono M.R., Chan W.H., Yeo S.S. Ethanol production from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Kluyvera cryocrescens* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – 89, N 4. – P. 1255–1264.
7. Dobson R., Gray V., Rumbold K. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – 39, N 2. – P. 217–226.
8. de Faria A.F., Stéfani D., Vaz B.G., Silva Í.S., Garcia J.S., Eberlin M.N., Grossman M.J., Alves O.L., Durrant L.R. Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* LSFM-05 grown on raw glycerol // Ibid. – 2011. – 38, N 7. – P. 863–871.
9. Freitas F., Alves V. D., Pais J., Carvalho M., Costa N., Oliveira R., Reis M. A.M. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol // Process Biochemistry. – 2010. – 45, N 3. – P. 297–305.
10. Ghosh D., Sobro I. F., Hallenbeck P. C. Stoichiometric conversion of biodiesel derived crude glycerol to hydrogen: Response surface methodology study of the effects of light intensity and crude glycerol and glutamate concentration // Bioresour. Technol. – 2012. – 106. – P. 154–160.
11. Kivistö A., Santala V., Karp M. Hydrogen production from glycerol using ghalophilic fermentative bacteria // Bioresour. Technol. – 2010. – 101, N 22. – P. 8671– 8677.
12. Kolesarova N., Hutnan M., Bodik I., Spalkova V. Utilization of biodiesel by-products for biogas production // J. Biomed. Biotechnol. – 2011. – 8, N 1. – P. 250–266.

13. Lee S.J., Kim S.B., Kang S.W., Han S.O., Park C., Kim S.W. Effect of crude glycerol-derived inhibitors on ethanol production by *Enterobacter aerogenes* // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* – 2012. – **35**, N 1–2. – P. 85–92.
14. Liu Y., Koh C.M., Ji L. Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis* // *Bioresour. Technol.* – 2011. – **102**, N 4. – P. 3927–3933.
15. Maschenko O.Y., Shulyakova M.O., Pirog T.P., Shevchuk T.A. Glycerol metabolism in producers of surface-active substances *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 // *Materiały Międzynarodowej Naukowi-Praktycznej Konferencji “Rozwoj nauk humanistycznych” (27–29 lutego 2012, Poznan)*. – P. 18–21.
16. Moon C., Ahn J.H., Kim S.W., Sang B.I., Um Y. Effect of biodiesel-derived raw glycerol on 1,3-propanediol production by different microorganisms // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2010. – **161**, N 1–8. – P. 502–510.
17. Morita T., Konishi M., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Microbial conversion of glycerol into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a basidiomycete yeast, *Pseudozyma antarctica* JCM 10317^T // *J. Biosci. Bioeng.* – 2007. – **104**, N 1. – P. 78–81.
18. Pal M.P., Vaidya B.K., Desai K.M., Joshi R.M., Nene S.N., Kulkarni B.D. Media optimization for biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* MTCC 2794: artificial intelligence versus a statistical approach // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – **36**, N 5. – P. 747–756.
19. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2009. – **45**, N 3. – P. 272–278.
20. Pirog T.P., Shevchuk T.A., Klimenko Yu. A. Intensification of surfactant synthesis in *Rhodococcus erythropolis* EK-1 cultivated on hexadecane // *Ibid.* – 2010. – **46**, N 6. – P. 599–606.
21. Posada J.A., Naranjo J.M., Lopez J.A., Higuera J.C., Cardona C.A. Design and analysis of poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol // *Process Biochemistry.* – 2011. – **46**, N 1. – P. 310–317.
22. Rooney A.P., Price N.P.J., Ray K.J., Kuo T.M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strain from a biodiesel facility // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2009. – **295**, N 1. – P. 82–87.
23. Rymowicz W., Fatykhova A.R., Kamzolova S.V., Rywinska A., Morgunov I.G. Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – **87**, N 3. – P. 971–979.
24. Saenge C., Cheirsilp B., Suksaroge T. T., Bourtoom T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids // *Process Biochemistry.* – 2011. – **46**, N 1. – P. 210–218.
25. Siles J.A., Martin M.L., Chica A.F., Martin A. Anaerobic co-digestion of glycerol and wastewater derived from biodiesel manufacturing // *Bioresour. Technol.* – 2010. – **101**, N 16. – P. 6315–6321.
26. Silva S.N.R.L., Farias C.B.B., Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* – 2010. – **79**, N 1. – P. 174–183.
27. da Silva G., Mack M., Contiero J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology // *Biotechnol. Adv.* – 2009. – **27**, N 1. – P. 30–39.
28. de Sousa J. R., da Costa Correia J. A., de Almeida J. G. L., Rodrigues S., Pessoa O. D. L., Melo V. M. M., Goncalves L. R.B. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 // *Process Biochemistry.* – 2011. – **46**, N 9. – P. 1831–1839.
29. Yazdani S., Gonzalez R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2007. – **18**, N 3. – P. 213–219.

Отримано 23.11.2012