

Т.П. Пирог^{1,2}, Н.В. Кудря¹, Т.А. Шевчук², К.А. Береговая¹, Г.А. Иутинская²

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

БИОКОНВЕРСИЯ СМЕСИ ТЕХНИЧЕСКОГО ГЛИЦЕРИНА И МЕЛАССЫ В ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

Установлена возможность замены глюкозы и очищенного глицерина в смешанных субстратах для биосинтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на более дешевые мелассу (отход свеклосахарного производства) и технический глицерин (побочный продукт производства биодизеля).

Показано, что повышение концентрации технического глицерина до 6,0 % в смеси с 1,0 % мелассы сопровождалось увеличением количества синтезированных штаммом IMB B-7405 ПАВ более, чем в два раза, а повышение содержания мелассы до 3,0 % в смеси с 1,0 % технического глицерина – некоторым снижением уровня ПАВ по сравнению с таковым на среде, содержащей по 1,0 % моноsubstrатов.

Установлено, что увеличение в два раза концентрации нитрата натрия в среде культивирования *N. vaccinii* IMB B-7405 позволяет повысить до 7,0 % содержание технического глицерина в смеси с 1,0 % мелассы. В таких условиях культивирования концентрация синтезированных внеклеточных ПАВ составляла 7,5 г/л, что в 1,3 раза выше, чем на базовой среде с более низким содержанием источника азота.

К л ю ч е в ы е с л о в а: поверхностно-активные вещества, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, биосинтез, промышленные отходы, смесь субстратов.

Темпы развития биотехнологии на современном этапе и повышенное внимание к сохранности окружающей среды предопределили большой интерес исследователей к биодеградируемым и нетоксичным микробным поверхностно-активным веществам (ПАВ), которые являются достойной альтернативой химическим аналогам [13]. ПАВ микробного происхождения применяются в природоохранных технологиях для очистки почвы и водоемов от токсичных ксенобиотиков, рассматривается возможность их использования в качестве альтернативных антимикробных и антиадгезивных препаратов [11–13]. Однако возможности практического использования микробных ПАВ определяются их себестоимостью, которая на сегодняшний день все еще остается достаточно высокой, в первую очередь из-за низкой ПАВ-синтезирующей способности известных продуцентов [20].

Одним из путей повышения эффективности технологий микробного синтеза практически ценных метаболитов является использование для их получения смеси ростовых субстратов [6]. Отметим, что к недавнему времени в литературе было относительно немного сведений об образовании микробных ПАВ на смешанных субстратах, однако в последнее время такой относительно простой путь интенсификации их синтеза привлекает все больше внимания [1, 3, 4, 6, 7, 10, 17, 21].

Наши исследования показали возможность использования смеси ростовых субстратов (гексадекан, глицерин, этанол, глюкоза) для интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-740 [1, 3, 4, 6, 7].

В работе [1] нами было установлено, что максимальные показатели синтеза ПАВ наблюдались при культивировании *N. vaccinii* IMB B-7405 на смеси глюкозы и этанола, а также глюкозы и глицерина.

С другой стороны, актуальной проблемой современности остается поиск экономически выгодных способов утилизации отходов. Использование промышленных отходов для получения микробных ПАВ позволит решить проблему как накопления вторичного сырья, так и снижения себестоимости целевого продукта. В последнее время микробные ПАВ, получаемые из возобновляемого сырья, постепенно выходят на мировой рынок, а возможностью переработки промышленных отходов в эти продукты микробного синтеза интересуются ученые всего мира [9, 16, 19–22].

Цель данной работы – исследовать возможность замены глюкозы и очищенного глицерина в смешанных субстратах для биосинтеза ПАВ *N. vaccinii* IMB В-7405 на меласу (отход свеклосахарного производства) и технический глицерин (отход производства биодизеля).

Материалы и методы. Объектом исследований являлся штамм *Nocardia vaccinii* IMB В-7405, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины.

Культивирование *N. vaccinii* IMB В-7405 осуществляли в жидкой минеральной среде следующего состава (г/л): NaNO_3 – 0,5; K_2HPO_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. В качестве источника углерода и энергии использовали смесь мелассы (0,5 и 1,0 % по углеводам) с очищенным глицерином и этанолом (0,5 и 1,0 % по объему), мелассы (1,0–3,0 % по углеводам) и технического глицерина (1,0–7,0 % по объему), мелассы (1,0–3,0 % по углеводам) и этанола (0,5–3,0 % по объему), а также моносубстраты (очищенный глицерин, этанол, меласса). Используемые моно- и смешанные субстраты были эквивалентны по углероду. В работе использовали технический глицерин, являющийся отходом производства биодизеля (Запорожский биотопливный завод). В одном из вариантов содержание источника азота в среде для культивирования *N. vaccinii* IMB В-7405 увеличивали в 2 раза.

В качестве посевного материала использовали культуру из экспоненциальной фазы роста, выращенную на среде указанного выше состава, содержащей в качестве источника углерода и энергии моносубстраты (0,5 %) или смесь субстратов (по 0,25 % каждого). Количество инокулята – 10 % от объема засеваемой среды (10^4 – 10^5 кл/мл).

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 30 °С в течение 120 ч.

Количество синтезированных внеклеточных ПАВ (г/л) определяли весовым методом после экстракции из супернатанта культуральной жидкости модифицированной нами смесью Фолча [2]. Для получения супернатанта культуральную жидкость центрифугировали при 5000 г в течение 20 мин. Выделение внеклеточных ПАВ осуществляли, как описано ниже.

В цилиндрическую делительную воронку объемом 500 мл помещали 100 мл супернатанта, добавляли 20 мл 1 М раствора HCl, воронку закрывали шлифованной пробкой и встряхивали 3 мин, затем добавляли еще 15 мл 1 М раствора HCl и 65 мл смеси хлороформа и метанола (2:1) и встряхивали (экстрагирование липидов) в течение 5 мин. Полученную после экстракции смесь оставляли в делительной воронке для разделения фаз, после чего нижнюю фракцию сливали (органический экстракт 1), а водную фазу подвергали повторной экстракции. При повторной экстракции к водной фазе добавляли 35 мл 1 М раствора HCl и 65 мл смеси хлороформа и метанола (2:1) и экстрагировали липиды в течение 5 мин. После разделения фаз сливали нижнюю фракцию, получая органический экстракт 2. На третьем этапе к водной фазе добавляли 100 мл смеси хлороформа и метанола (2:1) и осуществляли экстракцию, как описано выше, получая органический экстракт 3. Экстракты 1–3 объединяли и упаривали на ротационном испарителе ИР-1М2 (Россия) при 50 °С и абсолютном давлении 0,4 атм до постоянной массы.

Индекс эмульгирования (E_{24} , %) культуральной жидкости определяли, как описано ранее [1]. В качестве гидрофобного субстрата для эмульгирования использовали подсолнечное масло.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных

данных проводили, как описано ранее [1, 3, 4, 7]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В работах последних лет, посвященных синтезу микробных ПАВ на смеси ростовых субстратов, особое внимание уделяется использованию промышленных отходов в качестве источников углерода и энергии (мелассы, молочной сыворотки, отработанных растительных масел, технического глицерина и др.) [6, 9, 10, 18, 19, 21, 22].

В работе [17] исследовали синтез манозилэритритоллипидов *Pseudozyma hubeiensis* Y10BS025 на смеси нескольких субстратов. При культивировании штамма Y10BS025 на среде с глюкозой и техническим глицерином в соотношении 75:25 с внесением соевого масла (8 % по объему) концентрация ПАВ на 8 сут составляла 115 г/л и была выше, чем при добавлении оливкового масла (65 г/л).

Способность к синтезу ПАВ на гидролизованном техническом глицерине установлена для *Starmerella bombicola* ATCC 22214 [21]. При выращивании штамма ATCC 22214 на смеси такого технического глицерина (15 %) и подсолнечного масла (10 %) количество синтезированных софоролипидов составляло 6,36 г/л. Замена гидролизованного технического глицерина на очищенный сопровождалась незначительным повышением концентрации ПАВ (6,6 г/л). Увеличения количества синтезированных ПАВ до 39 г/л удалось достичь при культивировании *S. bombicola* ATCC 22214 на среде, содержащей смесь мелассы (5 %) и соевого масла (5 %) [21].

Штамм *Brevibacterium aureum* MSA13 синтезирует новый поверхностно-активный липопептид – бревифактин [18]. Внесение 1 % оливкового масла при культивировании *B. aureum* на мелассе сопровождалось увеличением показателей синтеза бревифактина на 33–47 % по сравнению с культивированием штамма на среде с мелассой без масла.

На первом этапе наших исследований мы попытались заменить глюкозу в смешанном субстрате с этанолом и очищенным глицерином для биосинтеза ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 на мелассу (табл. 1).

Таблица 1

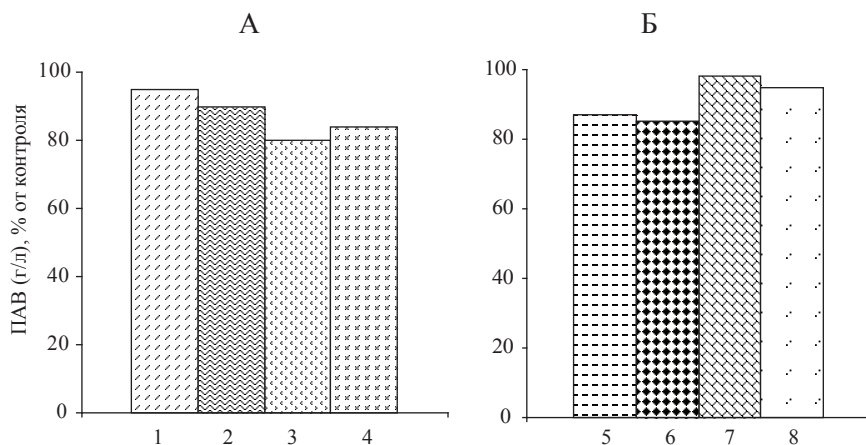
Синтез ПАВ при культивировании *N. vaccinii* IMB B-7405 на смеси мелассы с этанолом и очищенным глицерином, а также на соответствующих моносубстратах

Концентрация источника углерода в среде, %	Показатели синтеза ПАВ	
	ПАВ, г/л	E_{24} , %
Этанол, 0,5 + Меласса, 0,5	$3,5 \pm 0,18$	54
Этанол, 0,98	$1,5 \pm 0,08$	50
Меласса, 1,22	$1,7 \pm 0,09$	58
Этанол, 1,0 + Меласса, 1,0	$3,8 \pm 0,19$	56
Этанол, 1,96	$1,8 \pm 0,09$	54
Меласса, 2,44	$1,4 \pm 0,07$	53
Глицерин, 0,5 + Меласса, 0,5	$3,8 \pm 0,19$	55
Глицерин, 0,92	$2,3 \pm 0,12$	51
Меласса, 1,10	$1,9 \pm 0,09$	52
Глицерин, 1,0 + Меласса, 1,0	$3,9 \pm 0,19$	56
Глицерин, 1,84	$1,7 \pm 0,09$	51
Меласса, 2,20	$2,0 \pm 0,10$	52

П р и м е ч а н и я. Концентрации моно- и смешанных субстратов эквивалентны по углероду. Концентрация этанола и глицерина дана в % (по объему), а мелассы – в % по углеводам. При определении индекса эмульгирования погрешность не превышала 5 %.

Эксперименты показали, что как и при культивировании штамма ИМВ В-7405 на смеси глюкозы с этанолом и глицерином [1], так и при выращивании бактерий на среде с мелассой и этанолом, а также мелассой и глицерином концентрация внеклеточных ПАВ была в 1,3–2,7 раз выше, чем на соответствующих моноsubstrатах. Отметим, что индекс эмульгирования культуральной жидкости, полученной после культивирования *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на моно- и смешанных субстратах, практически не отличался (табл. 1). Повышение концентрации моноsubstrатов в смеси с 0,5 до 1,0 % не сопровождалось существенным увеличением показателей синтеза ПАВ.

Известно, что эффективность трансформации углерода смешанного субстрата в целевой продукт зависит от соотношения концентраций моноsubstrатов в смеси [3, 4, 6, 7]. В связи с этим на следующем этапе исследовали влияние концентрации глицерина, этанола и мелассы в смешанном субстрате на синтез ПАВ *N. vaccinii* ИМВ В-7405 (рисунок).



Синтез ПАВ при культивировании *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на смеси этанола и мелассы (А) и глицерина и мелассы (Б)

Концентрация этанола или глицерина (% по объему): 1, 5 – 1,0; 2, 6 – 1,5; 3, 4, 7, 8 – 0,5. Концентрация мелассы (% по углеводам): 1, 2, 5, 6 – 0,5; 3, 7 – 1,0; 4, 8 – 1,5. Контроль (100 %) – концентрация ПАВ на среде, содержащей смесь 0,5 % (по углеводам) мелассы с 0,5 % (по объему) этанола или глицерина.

Данные, представленные на рисунке, свидетельствуют, что повышение концентрации этанола и глицерина до 1,0–1,5 % в смеси с 1,0 % мелассы, а также увеличение содержания мелассы до 1,0–1,5 % в смеси с 0,5 % этанола или глицерина не сопровождалось увеличением количества синтезированных ПАВ.

Актуальной проблемой современности является утилизация технического глицерина – побочного продукта, образующегося в большом количестве при получении биодизеля, объем производства которого к 2017 г. по прогнозам экспертов увеличится до 25 млн м³ [15]. Исследования последнего десятилетия направлены на использование технического глицерина в качестве субстрата в технологиях микробного синтеза, в том числе и поверхностно-активных веществ [8, 15]. Отметим, однако, что для получения микробных ПАВ используют преимущественно очищенный глицерин, поскольку технический содержит в своем составе метанол, этанол, хлориды натрия или калия, являющиеся ингибиторами как микробного роста, так и синтеза ПАВ. Тем не менее, в литературе есть сообщения о синтезе микробных ПАВ и на смешанных субстратах, содержащих технический глицерин [17, 21].

Ранее нами была установлена возможность образования ПАВ при культивировании *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на среде с техническим глицерином и разработаны подходы, позволяющие интенсифицировать этот процесс [5, 14].

Дальнейшие эксперименты показали возможность замены очищенного глицерина в смеси с мелассой для синтеза ПАВ штаммом IMB В-7405 (табл. 2). Исследование влияния соотношения концентраций моносубстратов в смешанном субстрате на образование ПАВ показало, что повышение концентрации технического глицерина до 6,0 % в смеси с 1,0 % мелассы сопровождалось увеличением количества синтезированных ПАВ более, чем в два раза по сравнению с таковым на среде, содержащей по 1,0 % моносубстратов. В то же время при повышении содержания мелассы до 3,0 % в смеси с 1,0 % технического глицерина наблюдали некоторое снижение уровня ПАВ. Отметим, что независимо от концентраций моносубстратов индекс эмульгирования культуральной жидкости практически не изменялся и составлял 55–60 % (табл. 2).

Таблица 2

Влияние концентрации технического глицерина и мелассы в смешанном субстрате на синтез ПАВ *N. vaccinii* IMB В-7405

Концентрация в смеси, %		ПАВ, г/л	E ₂₄ , %
технического глицерина	мелассы		
1,0	1,0	2,8±0,14	58
2,0	1,0	3,0±0,15	58
3,0	1,0	3,6±0,18	57
4,0	1,0	4,8±0,24	59
5,0	1,0	6,4±0,32	60
6,0	1,0	5,9±0,29	58
1,0	1,5	2,1±0,10	56
1,0	2,0	2,0±0,10	55
1,0	2,5	2,3±0,11	55
1,0	3,0	1,8±0,09	55

Пр и м е ч а н и е. При определении индекса эмульгирования погрешность не превышала 5 %.

Согласно данным литературы за период с 2004 по 2010 г. объем производства биодизеля в мире увеличился с 4 до 20 млн м³, а объем образующегося в качестве побочного продукта технического глицерина составил почти 2,5 млн м³ [8]. Таким образом, для эффективного использования такого отхода в качестве субстрата в биотехнологических процессах его содержание в среде культивирования продуцентов практически ценных микробных метаболитов должно быть как можно выше.

В связи с этим на следующем этапе устанавливали условия культивирования *N. vaccinii* IMB В-7405, позволяющие максимально повысить содержание технического глицерина в смешанном субстрате. Важным фактором, влияющим на синтез микробных вторичных метаболитов, в том числе и поверхностно-активных веществ, является соотношение C/N в среде культивирования продуцентов [2, 5, 6, 13, 20]. В работе [5] мы показали, что увеличение концентрации инокулята и источника азота позволило повысить содержание технического глицерина в среде культивирования *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 и *N. vaccinii* IMB В-7405 почти в два раза (до 7–8 %) и обеспечить высокие показатели синтеза ПАВ (3,4–5,3 г/л). Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют, что максимальное количество синтезированных *N. vaccinii* IMB В-7405 ПАВ наблюдалось при концентрации мелассы 1,0 % в смешанном с техническим глицерином субстрате. Такие результаты могут быть объяснены тем, что меласса в смешанном субстрате является дополнительным источником азота, а не углерода. Для проверки этого предположения на следующем этапе исследовали синтез ПАВ *N. vaccinii* IMB В-7405 на среде с повышенной концентрацией технического глицерина (7 %), в которой увеличивали в два раза содержание азота как в виде нитрата натрия, так и в виде мелассы (табл. 3).

Синтез ПАВ *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на сумісі технічного глицерину і меласи в залежності концентрації джерела азоту

Концентрація в суміші, %		Содержання нітрату натрію в середі, г/л	ПАВ, г/л
технічного глицерину	меласи		
5,0	1,0	0,5	6,4±0,32
5,0	2,0	0,5	6,4±0,32
5,0	1,0	1,0	4,8±0,24
7,0	1,0	0,5	5,9±0,29
7,0	2,0	0,5	6,2±0,31
7,0	1,0	1,0	7,5±0,37

Як видно з представлених в табл. 3 даних, збільшення концентрації нітрату натрію до 1,0 г/л в середі, що містить 7,0 % технічного глицерину і 1,0 % меласи, супроводжувалося підвищенням кількості синтезованих ПАВ майже в 1,3 рази порівняно з показателями в середі з більш низьким вмістом азоту (0,5 % нітрату натрію). В той же час при підвищенні концентрації меласи до 2,0 % в суміші з 7,0 % технічного глицерину концентрація ПАВ практично не змінювалася. Ці дані можуть свідчити про те, що меласа є все-таки джерелом вуглецю, а не додатковим джерелом азоту. Відзначимо, однак, що для остаточних висновків про ролі меласи в середі з технічним глицерином для біосинтезу ПАВ *N. vaccinii* ІМВ В-7405 потрібні додаткові дослідження.

Таким чином, в результаті проведеної роботи встановлено можливість заміни глюкози і очищеного глицерину в сумішній субстраті на меласу і технічний глицерин – відходи свеклосахарного і виробництва біодизелю. Експериментально підбрані концентрації меласи (1,0 % по вуглеводам) і технічного глицерину (7 % по об'єму) в суміші, а також вміст джерела азотного харчування (1,0 г/л нітрату натрію) в середі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405, що дозволяють підвищити концентрацію синтезованих позаклітинних ПАВ до 7,5 г/л.

**Т.П. Пирог^{1,2}, Н.В. Кудря¹, Т.А. Шевчук²,
Х.А. Берегова¹, Г.О. Іутинська²**

¹ Національний університет харчових технологій, Київ, Україна

² Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

**БІОКОНВЕРСІЯ СУМІШІ ТЕХНІЧНОГО ГЛІЦЕРИНУ
І МЕЛАСИ У ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ
NOCARDIA VACCINII ІМВ В-7405**

Резюме

Встановлено можливість заміни глюкози і очищеного глицерину у змішаних субстратах для біосинтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на дешевші меласу (відхід бурякоцукрового виробництва) і технічний глицерин (побічний продукт виробництва біодизелю).

Показано, що підвищення концентрації технічного глицерину до 6,0% у суміші з 1,0 % меласи супроводжувалося збільшенням кількості синтезованих штамом ІМВ В-7405 ПАР більш, ніж у два рази, а підвищення вмісту меласи до 3,0 % у суміші з 1,0 % технічного глицерину – деяким зниженням рівня ПАР порівняно з таким на середовищі, що містило по 1,0 % монособстратів.

Встановлено, що збільшення у два рази концентрації нітрату натрію у середовищі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 дає змогу підвищити до 7,0 % вміст технічного глицерину у суміші з 1,0 % меласи. За таких умов культивування концентрація синтезованих позаклі-

тинних ПАР становила 7,5 г/л, що у 1,3 рази вище, ніж на базовому середовищі з нижчим вмістом джерела азоту.

К л ю ч о в і с л о в а: поверхнево-активні речовини, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, біо-синтез, промислові відходи, суміш субстратів.

**T.P. Pirog^{1,2}, N.V. Kudrya¹, T.A. Shevchuk²,
K.A. Beregova¹, G.O. Iutynska²**

¹ National University of Food Technologies, Kyiv

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

**BIOCONVERSION OF CRUDE GLYCEROLE
AND MOLASSES MIXTURE IN BIOSURFACTANTS
OF *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405**

S u m m a r y

The possibility of replacing glucose and pure glycerol in mixed substrates for surface-active substances (SAS, biosurfactants) biosynthesis of *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 on molasses (sugar production waste) and crude glycerol (by-product of biodiesel production) was established.

It was established that the increasing concentration of crude glycerol to 6% in mixture with 1,0 % molasses was accompanied by increase of amount of SAS synthesized more than twice, and the increasing content of molasses to 3,0 % in mixture with 1,0 % crude glycerol – by some decrease in the level of surfactant as compared to that in a medium containing 1,0% monosubstrates.

It was shown that the increasing concentration of sodium nitrate to 2-fold in medium cultivation of *N. vaccinii* IMB B-7405 allowed to increase to 7,0 % content of grude glycerol in mixture with 1,0 % molasses. Under such conditions of cultivation concentration of exocellular SAS synthesized was 7,5 g/l, that to 1,3 fold higher than in basic medium with a lower content of nitrogen source.

The paper is presented in Russian.

К е у в о р д s: biosurfactants, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, biosynthesis, industrial waste, mixture of substrates.

1. Кудря Н., Пирог Т. Особливості синтезу поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на суміші ростових субстратів // Ukrainian food journal. – 2013. – 2, N 2. – С. 203–209.
2. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикл. биохимия и микробиология. – 2009. – 45, № 3. – С. 304–310.
3. 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. журнал. – 2012. – 74, № 1. – С. 20–27.
4. Пирог Т.П., Конон А.Д., Шевчук Т.А., Билец И.В. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 на смеси гексадекана и глицерина // Микробиология. – 2012. – 81, № 5. – С. 611–618.
5. Пирог Т.П., Покора К.А., Мащенко О.Ю., Шевчук Т.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 на техническом глицерине // Микробиол. журнал. – 2013. – 75, № 4. – С. 13–22.
6. Пирог Т.П., Шулякова М.О., Шевчук Т.А. Змішані субстрати у природних умовах і біотехнологічних процесах // Biotechnologia Acta. – 2013. – 6, N 6. – Р. 28–44.
7. Шулякова М.О., Пирог Т.П., Шевчук Т.А. Деякі закономірності синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017 на суміші ростових субстратів // Микробиологія і біотехнологія. – 2012. – № 1 (17). – С. 57–65.
8. Almeida J.R. M., Fávares L.C.L. Quirino B.F. Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste // Biotechnol. Biofuels. – 2012. – 5:48. doi:10.1186/1754-6834-5-48.

9. *Bhardwaj G., Cameotra S.S., Chopra H.K.* Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production // *AMB Express*. – 2013. – **3**:68. doi: 10.1186/2191-0855-3-68.
10. *Daverey A, Pakshirajan K.* Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: production, purification and characterization // *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. – 2010. – **79**, N 1. – P. 246–253.
11. *Kalyani R. Bishwambhar M., Suneetha V.* Recent potential usage of surfactant from microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena: a perspective // *Int. Res. J. Pharm.* – 2011. – **2**, N 8. – P. 11–15.
12. *Lawniczak L., Marecik R., Chrzanowski L.* Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – **97**, N 6. – P. 2327–2339.
13. *Marchant R., Banat M.I.* Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants // *Biotechnol. Let.* – 2012. – **34**, N 9. – P. 1597–1605.
14. *Pirog T, Shulyakova M., Sofilkanych A., Shevchuk. T., Maschenko O.* Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac -5017, *Acinetibacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel product // *Food Bioprod. Proces.* – 2013. – doi 10.1016/j.fbp.2013.09.003.
15. *Rivaldi J.D., Sarrouh B.F., Branco R.de F., de Mancilha I.M., da Silva S.S.* Biotechnological utilization of biodiesel-derived glycerol for the production of ribonucleotides and microbial biomass // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – **167**, N 7. – P. 2054–2067.
16. *Rodríguez-Pazo N., Salgado J.M., Cortés-Diéguez S., Domínguez J.M.* Biotechnological production of phenyllactic acid and biosurfactants from trimming vine shoot hydrolyzates by microbial coculture fermentation // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2013. – **169**, N 7. – P. 2175–2188.
17. *Sari M., Kanti A., Artika I.M., Kusharyoto W.* Identification of *Pseudozyma hubeiensis* Y10BS025 as a potent producer of glycolipid biosurfactant mannosylerythritol lipids // *Amer. J. Biochem. Biotechnol.* – 2013. – **9**, N 4. – P. 430–437.
18. *Seghal K. G., Anto T. T, Selvin J., Sabarathnam B., Lipton A.P.* Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture // *Bioresour. Technol.* – 2010. – **101**, N 7. – P. 2389–2396.
19. *Slivinski C.T., Mallmann E., de Araújo J.M., Mitchell D.A. Krieger N.* Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent // *Proc. Biochem.* – 2012. – **47**, N 12. – P. 1848–1856.
20. *Syldatk C., Hausmann R.* Microbial biosurfactants // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* – 2010. – **112**, N 6. – P. 615–616.
21. *Wadekar S.D., Kale S.B., Lali A.M., Bhowmick D.N., Pratap A.P.* Utilization of sweetwater as a cost-effective carbon source for sophorolipids production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) // *Prep. Biochem. Biotechnol.* – 2012. – **42**, N 2. – P. 125–142. doi: 10.1080/10826068.2011.577883.
22. *Zhu Z., Zhang F., Wei Z., Ran W., Shen Q.* The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation // *J. Environ. Manage.* – 2013. – **127**:96–102. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.04.017.

Отримано 16.06.2014