

## БІОКОНВЕРСІЯ ЗМІШАНИХ ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДІВ У ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

Т.П. Пирог<sup>1,2</sup>, А.Ю. Гершман<sup>1</sup>, Т.А. Шевчук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний університет харчових технологій,  
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03143, Україна  
e-mail: [tapirog@nift.edu.ua](mailto:tapirog@nift.edu.ua)

**Мета.** Визначити умови культивування *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на суміші технічного гліцерину (відходи виробництва біодизелю) та відпрацьованої соняшникової олії, що забезпечують максимальні показники синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР). **Методи.** Концентрацію поверхнево-активних речовин встановлювали ваговим методом після екстракції з супернатанту культуральної рідини модифікованою сумішшю Фолча (хлороформ–метанол–вода=4:3:2, рН 4,0–4,5 введенням 1н HCl). Оптимальне молярне співвідношення концентрацій рафінованої соняшникової олії та очищеного гліцерину у суміші розраховували теоретично згідно з концепцією «допоміжного субстрату» Бабеля. **Результати.** На основі теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів і біомаси *N. vaccinii* IMB B-7405 на енергетично дефіцитному субстраті (гліцерин) встановлено, що молярне співвідношення концентрацій рафінованої соняшникової олії та очищеного гліцерину у суміші, за якого досягається максимальний синтез ПАР, повинно становити 0,16:1. Експериментальні дослідження показали, що найвищі показники синтезу ПАР спостерігали за молярних співвідношень концентрацій цих субстратів 0,14:1–0,19:1, максимально наближених до теоретично розрахованого. Встановлено можливість заміни очищеного гліцерину та рафінованої олії у суміші на відходи виробництва біодизелю та відпрацьовану олію. За молярного співвідношення концентрацій відпрацьованої олії та технічного гліцерину 0,078:1 у суміші (з врахуванням 50 % вмісту гліцерину у складі відходів виробництва біодизелю) та використання інокуляту, вирощеного на технічному гліцерині, кількість синтезованих ПАР становила 5,1–5,4 г/л, що в 1,6–2,3 рази вище порівняно з культивуванням *N. vaccinii* IMB B-7405 на відповідних моносубстратах. **Висновки.** Наведені результати підтверджують попередні дані про доцільність використання суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів для підвищення синтезу вторинних метаболітів і засвідчують, що висока ефективність таких змішаних субстратів може бути досягнута як при правильному виборі субстратів, так і коректному визначенні молярного співвідношення їх концентрацій. Використання відпрацьованої соняшникової олії та технічного гліцерину для одержання мікробних ПАР дасть змогу вирішити одночасно кілька важливих проблем: знизити собівартість цільового продукту, утилізувати токсичні промислові відходи та підвищити рентабельність виробництва біодизелю.

**Ключові слова:** *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, поверхнево-активні речовини, суміші відпрацьованої соняшникової олії та технічного гліцерину, інтенсифікація біосинтезу

Незважаючи на те, що на теперішній час промислове виробництво мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) обмежується десятком компаній [1], інтерес дослідників до цих продуктів мультифункціонального призначення зростає з кожним роком. Завдяки поверхнево-активним, емульгувальним властивостям, антимікробній та антиадгезивній активності ці продукти мікробного синтезу є перспективними для використання у різних галузях промисловості, медицині, а також у природоохоронних технологіях [1–4]. Проте високі витрати на процес біосинтезу, а також невисока концентрація синтезованих ПАР є причиною недостатньо високої ефективності мікробних технологій одержання поверхнево-активних речовин. Одним з підходів до зниження собівартості мікробних ПАР є використання як субстратів промислових відходів.

У попередніх дослідженнях [5] було встановлено можливість утворення ПАР за умов росту *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на відпрацьованій соняшниковій олії та технічному гліцерині (відходи виробництва біодизелю), причому з підвищенням концентрації відпрацьованої олії понад 2 % показники синтезу знижувалися.

Разом з тим відомо, що одним з ефективних підходів до інтенсифікації синтезу будь-яких мікробних технологій є використання суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів [6–8]. Раніше [9] ми показали можливість підвищення синтезу ПАР у процесі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші глюкози та гліцерину, у подальших дослідженнях [10] глюкоза та очищений гліцерин були успішно замінені на мелясу та відходи виробництва біодизелю.

Мета даної роботи – визначити умови культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші технічного гліцерину (відходи виробництва біодизелю) та відпрацьованої соняшникової олії, що забезпечують максимальні показники синтезу поверхнево-активних речовин.

**Матеріали і методи.** Основним об'єктом досліджень був виділений нами з забрудненого нафтою зразка ґрунту штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8 [5]. Штам К-8 зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером ІМВ В-7405.

*N. vaccinii* ІМВ В-7405 вирощували у рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001, дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка). В одному з варіантів концентрацію нітрату натрію у середовищі підвищували до 0,75 г/л. Як джерело вуглецю та енергії використовували рафіновану соняшкову олію «Олейна» (Дніпропетровський олійно-екстракційний завод, м. Дніпро), відпрацьовану після смаження картоплі соняшкову олію (мережа ресторанів швидкого харчування Mcdonald's, Київ), а також очищений і технічний гліцерин (Комсомольський біопаливний завод, Полтавська обл.). У процесі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші субстратів їх концентрація становила (% об'ємна частка): рафінованої олії – 0,7–2; відпрацьованої – 0,7–4; очищеного гліцерину – 2–3,3; технічного гліцерину – 1–4.

Як посівний матеріал використовували культуру в експоненційній фазі, вирощену на середовищі наведеного складу, що містило як джерело вуглецю (% об'ємна частка): моносубстрати (рафіновану або відпрацьовану соняшникову олію, очищений або технічний гліцерин) – 0,5; суміш відпрацьованої соняшникової олії (0,25) та технічного гліцерину (0,25).

Інокулят, в якому чисельність бактерій становила  $10^4$ – $10^5$  кл/мл, вносили у кількості 10% від об'єму середовища. Культивування здійснювали у 750 мл колбах з 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 5 діб.

Кількість позаклітинних ПАР визначали, використовуючи модифікований нами метод Блайя і Дайера [11] після екстракції їх сумішшю хлороформу і метанолу (2:1) з супернатанту культуральної рідини. Для отримання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 g упродовж 20 хв. Видалення залишкової олії з культуральної рідини здійснювали трикратною екстракцією гексаном або петролейним ефіром у співвідношенні 1:1.

Оскільки штам *N. vaccinii* ІМВ В-7405 синтезує комплекс полярних і неполярних ліпідів [5], а відомий метод Блайя і Дайера [11], який використовували для виділення ПАР, дає змогу екстрагувати в основному неполярні ліпіди, ми модифікували класичну систему розчинників (суміш Фолча) введенням в неї 1n HCl (хлороформ – метанол – вода = 4:3:2), завдяки чому відбувається максимально повна екстракція як полярних, так і неполярних ліпідів. Методику виділення позаклітинних ПАР детально наведено у праці [5].

Визначення емульгуювальної здатності (індекс емульгування) здійснювали, як описано раніше [5].

Для визначення оптимального молярного співвідношення концентрацій моносубстратів (рафінованої соняшникової олії та очищеного гліцерину) у суміші здійснювали відповідні теоретичні розрахунки, які базуються на визначенні енергетичних потреб синтезу ПАР і біомаси на енергетично дефіцитному субстраті (гліцерин) з наступним встановленням концентрації енергетично надлишкового субстрату (соняшникова олія), що забезпечить «покриття» енергетичних витрат на цей процес, як описано у нашій попередній роботі [9].

Генерацію енергії при катаболізмі лінолевої та олеїнової кислот (основних компонентів соняшникової олії) розраховували на основі інформації про β-окиснення жирних кислот [12], а також на основі власних даних про особливості катаболізму гліцерину, центрального метаболізму та анаплеротичних шляхів у штаму *N. vaccinii* ІМВ В-7405 [13].

Всі досліді проводили в 3 повторностях, кількість паралельних визначень в експериментах становило від 3 до 5. Статистичну обробку експериментальних даних проводили, як описано раніше [5]. Відмінності середніх показників вважали достовірними при рівні значущості  $p < 0,05$ .

**Результати.** У табл. 1 наведено дані щодо впливу природи джерела вуглецевого живлення у середовищі для одержання інокуляту на синтез поверхнево-активних речовин під час культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші технічного гліцерину та відпрацьованої соняшникової олії.

**Таблиця 1**

**Синтез поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші технічного гліцерину та відпрацьованої соняшникової олії залежно від способу підготовки інокуляту**

Субстрат для біосинтезу ПАР, %	Субстрат для одержання інокуляту, %	Концентрація ПАР, г/л
Відпрацьована олія, 4	Відпрацьована олія, 0,5	2,1± 0,11
Відпрацьована олія, 2 + Технічний гліцерин, 2	Відпрацьована олія, 0,5	2,8± 0,14
	Відпрацьована олія, 0,5 + Технічний гліцерин, 0,5	3,2± 0,16
	Технічний гліцерин, 0,5	3,3± 0,16
Технічний гліцерин, 4	Технічний гліцерин, 0,5	3,0± 0,15

**Примітка.** Концентрація нітрату натрію у середовищі 0,5 г/л.

Найвища концентрація ПАР за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші субстратів (3,2–3,3 г/л) досягалася у разі використання посівного матеріалу, вирощеного на змішаному субстраті або технічному гліцерині. У подальших експериментах інокулянт вирощували на монособстраті гліцерині. Зазначимо, що кількість ПАР, синтезованих на змішаному субстраті, була в 1,5–1,6 разів вищою порівняно з такою на відпрацьованій олії.

Оскільки ефективність технологій одержання продуктів мікробного синтезу на змішаних субстратах залежить не тільки від способу підготовки посівного матеріалу, а й від концентрації монособстратів у суміші [6], на наступному етапі досліджували вплив різних концентрацій технічного гліцерину та відпрацьованої соняшникової олії у суміші на синтез поверхнево-активних речовин (табл. 2).

**Таблиця 2**

**Вплив концентрації монособстратів у суміші на показники синтезу поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* ІМВ В-7405**

Концентрація відпрацьованої олії та технічного гліцерину у суміші, %	Показники синтезу	
	ПАР, г/л	E <sub>24</sub> , %
1,0 + 1,0	2,4 ± 0,12	41
1,5 + 1,5	2,6 ± 0,13	40
2,0 + 2,0	3,3 ± 0,16	42
2,5 + 2,5	3,6 ± 0,18	40
3,0 + 3,0	3,1 ± 0,16	41

**Примітки.** Концентрація нітрату натрію у середовищі – 0,5 г/л. Посівний матеріал, вирощений на технічному гліцерині (0,5% об'ємна частка). Під час визначення індексу емульгування похибка не перевищувала 5 %.

Дані, наведені у табл. 2, засвідчують, що за підвищення концентрації моноsubstrатів у суміші з 1,0 до 2,5 % кількість синтезованих ПАР збільшувалася у 1,5 рази. Разом з тим під час культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на середовищі з 3,0 % технічного гліцерину та олії концентрація поверхнево-активних речовин знижувалася. При цьому індекс емульгування культуральної рідини залишався однаковим (40–42 %) незалежно від умов культивування продуцента ПАР.

У попередніх роботах [6, 9] ми зазначали, що максимально повна конверсія вуглецю обох моноsubstrатів у цільовий продукт досягається за оптимального молярного співвідношення їх концентрацій у суміші, що в свою чергу потребує попереднього здійснення відповідних теоретичних розрахунків, що й було завданням наступного етапу досліджень. Зазначимо, що на основі теоретичних розрахунків можна встановити молярне співвідношення концентрацій не технічного гліцерину і відпрацьованої олії, а відповідних очищених substrатів.

Відповідно до енергетичної класифікації substrатів Бабеля [14] гліцерин є енергетично дефіцитним substrатом, а олія – енергетично надлишковим. Такий поділ substrатів базується на кількості енергії, що генерується при їх катаболізмі до центрального вуглецевого попередника – фосфогліцеринової кислоти (ФГК). Енергія, необхідна для синтезу клітинних компонентів з цього попередника, є постійною і становить 1 моль АТФ на 10,5 г сухої біомаси [14].

Для розрахунку оптимального співвідношення концентрацій гліцерину та соняшникової олії ми приймали такі самі припущення, як і в роботі [9] для культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші гліцерину та глюкози. Основним з них є наявність у складі трегалозомономіколатів 3-гідрокси-2-додеканоїлдокозанової кислоти, що містить 34 атоми вуглецю (аналогічно трегалозоліпідам *Rhodococcus erythropolis* [15]). Крім того, припускали, що соняшникова олія містить 50 % лінолевої та 50 % олеїнової вищих жирних кислот [12].

Теоретичні розрахунки енергетичних потреб на синтез ПАР і біомаси здійснювали згідно із схемою синтезу трегалозомономіколату з гліцерину, наведеною у роботі [9]. Ця схема складена на основі власних досліджень метаболізму цього substrату у штаму ІМВ В-7405 [13].

*Витрати енергії на синтез трегалозофосфату.* Для синтезу однієї молекули трегалозофосфату необхідно 8 моль гліцерину (4 моля для утворення гліюксилату і 4 – для синтезу ацетил-КоА, що взаємодіє з гліюксилатом з утворенням малату). Таким чином, 8 молей АТФ витрачається на утворення гліцерин-3-фосфату з гліцерину, 8 – на утворення фосфоенолпірувату (ФЕП) з пірувату, 4 – на синтез 1,3-дифосфогліцерату з фосфогліцеринової кислоти (ФГК) і 8 (4 НАДН) – при перетворенні 1,3-дифосфогліцерату в триозофосфат. Отже, витрати енергії становлять 28 молей АТФ. Крім того, один моль АТФ використовується при утворенні нуклеозиддифосфатсахариду (глюкозо-6-фосфат → УДФ-глюкоза), необхідного для синтезу трегалозо-6-фосфату. Отже, енергетичні потреби на синтез трегалозо-6-фосфату з гліцерину складають 30 моль АТФ.

*Витрати енергії на синтез міколової кислоти.* З огляду на шлях біосинтезу жирних кислот з ацетил-КоА [12] можна розрахувати, що для утворення 3-гідрокси-2-додеканоїлдокозанової кислоти, що містить



34 атоми вуглецю, необхідно 17 моль ацетил-КоА, на синтез яких з гліцерину витрачається 17 моль АТФ. З урахуванням кількості циклів (16) при синтезі міколової кислоти з ацетил-КоА енергетичні витрати складають  $16 + 17 = 33$  моль АТФ.

*Генерація енергії в процесі синтезу трегалозоміколату з гліцерину.* Енергія генерується в процесі синтезу міколової кислоти:



Оскільки для синтезу міколової кислоти необхідно 17 моль ацетил-КоА і 8 моль – для синтезу трегалозофосфату, рівняння (1) можна записати у вигляді:



З рівняння (2) з урахуванням Р/О 2, можна визначити, що при синтезі трегалозоміколату з гліцерину генерується  $25 + 100 = 125$  моль АТФ, або 5 моль АТФ на моль використаного гліцерину. Загальні витрати енергії на синтез трегалозофосфату та міколової кислоти з гліцерину становлять  $30 + 33 = 63$  моль АТФ, або 2,52 моль АТФ на моль використаного гліцерину.

Отже, генерація енергії при утворенні трегалозоміколату становить  $5 - 2,52 = 2,48$  моль АТФ/моль використаного гліцерину.

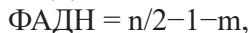
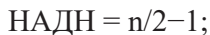
*Генерація АТФ при катаболізмі жирних кислот.* Перетворення лінолевої ( $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{COOH}$ ) та олеїнової ( $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{COOH}$ ) жирних кислот на ФГК проходить у кілька етапів (рисунок):

– активація жирної кислоти і перетворення її на ефір коферменту А за допомогою ацил-КоА-синтетази. Під час даної реакції виділяється АМФ і витрачається енергія двох макроергічних зв'язків;

– окиснення КоА-ефіру по  $\beta$ -положенню і розщеплення з утворенням ацетил-КоА та скороченого на два вуглецевих атоми КоА-ефіру жирної кислоти. У ході цих реакцій відновлюється по 1 моль НАД і ФАД. Зазначимо, що на ділянках з ненасиченими зв'язками ФАД не відновлюється, оскільки немає необхідності в утворенні подвійного зв'язку. Кількість утворених ацетил-КоА, ФАДН і НАДН у процесі  $\beta$ -окиснення можна розрахувати за такими формулами:



де  $n$  – кількість атомів вуглецю у складі жирної кислоти;



де  $m$  – кількість ненасичених зв'язків у жирній кислоті.

– залучення ацетил-КоА до циклу Кребса та гліюксилатного циклу, що супроводжується відновленням НАД і ФАД.

– утворення ФГК в реакціях гліюконеогенезу.

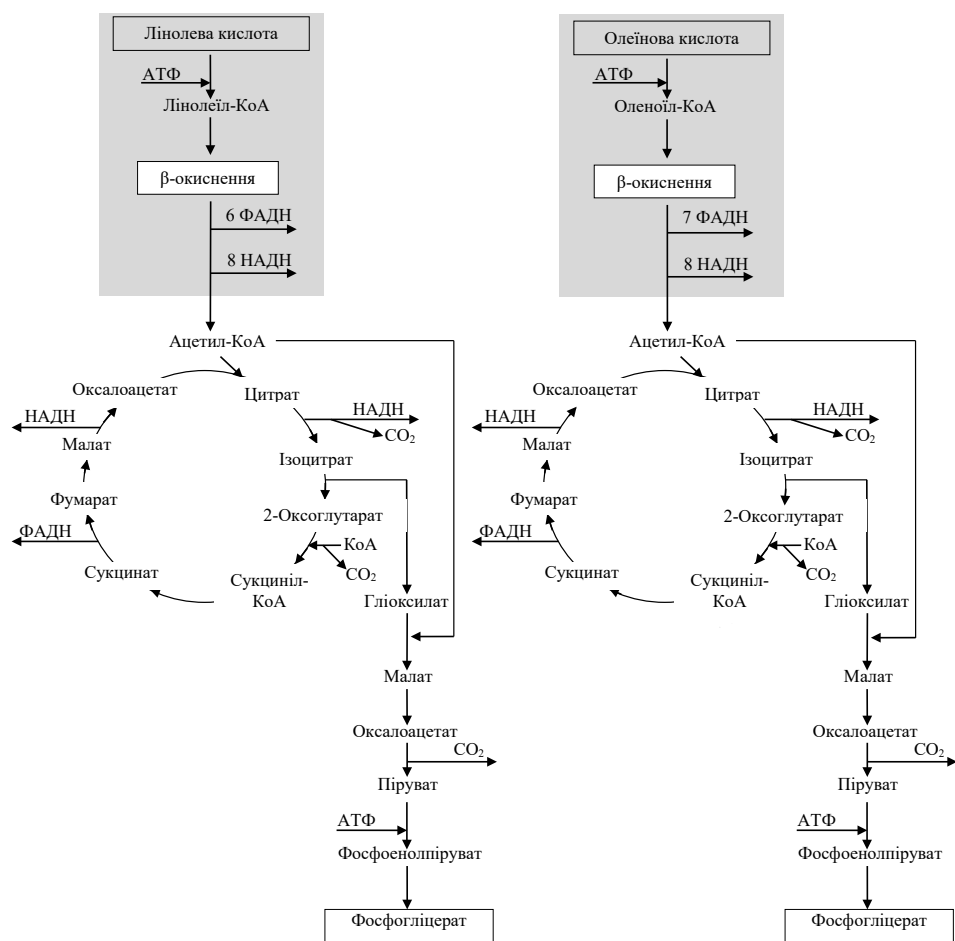
Беручи до уваги наведену вище інформацію, рівняння перетворення лінолевої та олеїнової кислот на ФГК можна представити так:



При Р/О 2 рівняння набуває такого вигляду:



Враховуючи те, що соняшникова олія містить 50% лінолевої та 50% олеїнової жирних кислот, рівняння 5 і 6 можна записати у вигляді:



**Передбачувана схема перетворення лінолевої та олеїнової кислот на фосфогліцеринову кислоту.**

Сірим кольором виділено дані літератури [12].



*Енергетичні витрати на синтез біомаси.* Енергетичні витрати на синтез біомаси можна представити у вигляді рівняння [14]:



де  $(\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2\text{N})_3$  – формула моля біомаси.

Сумарна реакція перетворення гліцерину на ФГК має вигляд:



Для Р/О 2 рівняння (9) можна представити у вигляді:



Виходячи з рівняння синтезу біомаси з ФГК (8) і рівняння катаболізму гліцерину до ФГК (10), можна розрахувати, що потреба в АТФ для синтезу біомаси (в розрахунку на моль гліцерину) становить 8 молей АТФ. Ця енергія може бути отримана з соняшникової олії (лінолевої та олеїнової кислот).

З огляду на те, що при синтезі трегалозомономіколату з гліцерину генерується 2,48 моль АТФ/моль використаного гліцерину, за рахунок жирних кислот має бути отримано  $8 - 2,48 = 5,52$  моль АТФ. З рівняння (7) випливає, що для отримання такої кількості енергії необхідно 0,16 моль жирних кислот.

Отже, молярне співвідношення концентрацій рафінованої соняшникової олії і очищеного гліцерину в середовищі повинно становити 0,16:1. Так, наприклад, за концентрації гліцерину 1% (об'ємна частка) (10 мл/л, або 12,6 г/л, або 0,137 моль), концентрація соняшникової олії має бути або 0,02 моль, або 5,6 г, або 0,62 % (об'ємна частка).

У табл. 3 наведено дані щодо залежності синтезу ПАР *N. vaccinii* IMB В-7405 від молярного співвідношення концентрацій рафінованої соняшникової олії та очищеного гліцерину у суміші. Ці дані засвідчують, що найвища кількість синтезованих ПАР (2,7–3,0 г/л) досягалася за молярних співвідношень (0,14:1–0,19:1), максимально наближених до теоретично розрахованого (0,16:1).

**Таблиця 3**

**Вплив молярного співвідношення рафінованої соняшникової олії та очищеного гліцерину у суміші на синтез поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* IMB В-7405**

Концентрація рафінованої олії та очищеного гліцерину у суміші, %	Молярне співвідношення концентрацій олії і гліцерину	Концентрація ПАР, г/л
2,0 + 2,0	0,23:1	2,1±0,10
1,8+ 2,2	0,193:1	2,7±0,14
1,5+ 2,5	0,140:1	3,0±0,15
1,2 + 2,8	0,094:1	2,0±0,10
0,7 + 3,3	0,054:1	1,2±0,06

**Примітка.** Концентрація нітрату натрію у середовищі – 0,5 г/л.

**Таблиця 4**

**Синтез поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* IMB В-7405 залежно від молярного співвідношення концентрацій відпрацьованої соняшникової олії та технічного гліцерину у суміші і концентрації джерела азоту**

Концентрація нітрату натрію у середовищі, г/л	Концентрація відпрацьованої олії та технічного гліцерину у суміші, %	Молярне співвідношення концентрацій олії і гліцерину*	Концентрація ПАР, г/л
0,5	2,0+2,0	0,23:1	3,3±0,17
	1,0+2,5	0,094:1	3,4±0,17
	1,0+3,0	0,078:1	<b>5,1±0,25</b>
	0,75+3,25	0,054:1	4,4±0,22
0,75	2,0+2,0	0,23:1	3,6±0,18
	1,0+2,5	0,094:1	3,1±0,16
	1,0+3,0	0,078:1	<b>5,4±0,27</b>
	0,75+3,25	0,054:1	4,5±0,23

**Примітка.** Досліджувані молярні співвідношення концентрацій відпрацьованої олії та технічного гліцерину у суміші відрізняються від наведених у табл. 3 співвідношень рафінованої олії та очищеного гліцерину, оскільки вміст гліцерину у складі відходів виробництва біодизелю становить в середньому 50 % [16]. Концентрація ПАР, синтезованих на моносубстратах (4 % відпрацьованої олії або технічного гліцерину), становила 2,3 і 3,3 г/л відповідно.



На наступному етапі досліджували можливість заміни рафінованої соняшникової олії та очищеного гліцерину у суміші на відпрацьовану олію та відходи виробництва біодизелю (табл. 4).

Встановлено, що незалежно від концентрації азоту у середовищі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за молярного співвідношення концентрацій моноsubstrатів 0,078:1 (що з врахуванням 50% вмісту гліцерину у складі відходів виробництва біодизелю співпадає з теоретично розрахованим) кількість синтезованих ПАР була в 1,6–2,3 рази вищою, ніж на моноsubstrатах (5,1–5,4 і 2,2–2,3 г/л відповідно).

**Обговорення.** Культивування мікроорганізмів на суміші ростових субстратів дає змогу уникнути непродуктивних витрат вуглецю та енергії, які мають місце за використання моноsubstrатів, а також підвищити ефективність трансформації вуглецю субстратів у біомасу та інтенсифікувати синтез вторинних метаболітів [6].

Зазначимо, що до недавнього часу в літературі було небагато відомостей про синтез мікробних ПАР на змішаних субстратах, проте останнім часом такий відносно простий підхід привертає все більше уваги, у першу чергу як спосіб здешевлення їх виробництва [17–27].

Dziegielewska і Adamzak [17] виявили, що додавання 5 % рапсової олії до базового середовища з глюкозою (2 %) підвищувало синтез манозилеритритолілідів *Pseudozyma antarctica* АТСС 20509 від 2,20 до 12,69 г/л. Штам дріжджів *Pichia caribbica* на середовищі з 100 г/л ксилози та 4 % олеїнової кислоти синтезував 7,48 г/л ксилілідів, причому на середовищі без олеїнової кислоти синтезу ПАР не спостерігали [18].

Синтез софоролілідів також можна інтенсифікувати, використовуючи для вирощування продуцентів змішані субстрати, зокрема гідрофобні і гідрофільні [19–22]. Так, вирощування *Candida bombicola* АТСС 22214 на глюкозі (оптимальна початкова концентрація 30 г/л) з періодичним внесенням рапсової олії та підтриманням оптимального рН упродовж 8 діб супроводжувалося підвищенням кількості синтезованих ПАР у 1,8 разів [21]. У праці [20] для цього ж штаму показано, що за культивування на суміші глюкози (2 %) та кукурудзяної олії (10 %) також спостерігали підвищення показників синтезу ПАР, а у [22] встановлено оптимальне співвідношення гліцерину (15 %) та олії (10 %), що супроводжувалося утворенням 6,6 та 5,6 г/л софоролілідів (соняшникова та пальмова олії відповідно).

Відомо, що використовуючи різні підходи до регуляції біосинтезу (у тому числі й внесення додаткових джерел вуглецю), можна не лише підвищити вихід продукту, а й модифікувати структуру отримуваних метаболітів, тим самим змінюючи їх властивості [23–25].

Прикладом впливу на структуру цільового продукту можна також вважати культивування продуцента софоролілідів *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069 на гліцерині (10 %) з додаванням касторової олії [23]. Рацинолеїнова кислота має бактерицидні і фунгіцидні властивості, зумовлені наявністю –ОН групи у 12-й позиції. За припущенням, природа жирної кислоти у середовищі культивування продуцента може впливати на структуру бокових ланцюгів синтезованих софоролілідів. Експерименти показали, що у разі внесення у середовище з гліцерином касторової олії

(10 %) рицинолеїнова кислота гідроксильється у положенні  $\omega$ -1 та включається у склад цільового продукту через вже наявну гідроксильну групу [23]. Одержані ПАР можуть бути використані як потенційні антимікробні речовини.

Аналогічно, виходячи із відомих бактерицидних властивостей доголанцюгових спиртів, за культивування *C. bombicola* ATCC 22214 на глюкозі (10 %) з внесенням лаурилового спирту (1 %) отримували модифіковані софороліпіди зі значною антибактеріальною активністю щодо грамнегативних та грампозитивних бактерій [24].

Разом з тим у літературі є лише поодинокі повідомлення про синтез мікробних ПАР на суміші промислових відходів. Так, встановлено [26], що показники синтезу ПАР штамом *Pseudomonas* sp. PS-17 на суміші гліцерину і відпрацьованої олії та відходів виробництва соняшникової олії були на 15–20 % вищими, ніж на моносубстратах.

Відомо про культивування продуцента софороліпідів *C. bombicola* NRRL Y-17069 на суміші відпрацьованого моторного мастила та соняшникового шроту [27]. Максимальні показники синтезу (концентрація ПАР 26,4 г/л, вихід 13,2 г/г змішаного субстрату) досягалися на 96 год культивування.

Зазначимо, що на теперішній час інформація про використання технічного гліцерину як компонента змішаних субстратів для одержання мікробних ПАР відсутня, а для біосинтезу інших практично цінних мікробних метаболітів – вкрай обмежена.

За допомогою методів генної інженерії (делеція генів *ptsG*, *sdhA*, *pta* і гіперекспресія *phaC1*) було створено рекомбінантний штам *Escherichia coli* KNSP1, здатний утилізувати суміш технічного гліцерину і жирних кислот з утворенням полігідроксиалканоатів та сукцинату [28]. Під час росту на змішаному субстраті штам KNSP1 синтезував 21,07 г/л сукцинату і 0,54 г/л полігідроксиалканоатів.

Мікроводорості, які не потребують вирощування на орних землях і здатні до швидкого накопичення біомаси упродовж короткого часу, розглядаються як перспективні біологічні агенти для виробництва біодизелю третього покоління [29]. Продуктивність синтезу ліпідів гетеротрофними мікроводоростями *Chlorella protothecoides* на середовищі з глюкозою та дріжджовим екстрактом становила 2,07 і 1,61 г/л/добу відповідно, у той час як за використання суміші відходів пивоваріння і технічного гліцерину цей показник підвищувався до 2,12 і 1,81 г/л/добу [30].

Вченими вперше показано можливість використання технічного гліцерину як джерела вуглецю для продуцента фумарової кислоти *Rhizopus arrhizus* RH-07-13 [31]. Так, на середовищі з 80 г/л цього субстрату спостерігали утворення 4,37 г/л фумарової кислоти на 192 год. При цьому використання суміші технічного гліцерину (40 г/л) та глюкози (40 г/л) дало змогу збільшити кількість синтезованої кислоти на 553,6 % (до 22,81 г/л) і скоротити тривалість культивування до 144 год [31].

Зазначимо, що більшість дослідників емпірично встановлювали як концентрацію субстратів у суміші, так, власне, і вибір моносубстратів [19–33]. Звертає на себе увагу надзвичайно висока (іноді 100 г/л) концентрація використаних субстратів. У цьому разі підвищення синтезу ПАР на суміші субстратів навіть у разі порівняно з культивуванням на моно-

субстратах не є показовим, адже основним критерієм ефективності змішаних субстратів є максимальна конверсія вуглецю в цільовий продукт, для досягнення якої необхідним є встановлення оптимального для його синтезу молярного співвідношення концентрацій моносубстратів у суміші, як було встановлено нами у попередніх дослідженнях [6, 9].

Так, теоретичний розрахунок енергетичних потреб синтезу трегалозоміколатів *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на суміші енергетично надлишкового гексадекану і енергетично дефіцитного гліцерину показав, що оптимальним для синтезу ПАР є молярне співвідношення субстратів 1:7. За таких умов спостерігали збільшення синтезу ПАР у 2,6–3,5 рази порівняно з показниками на відповідних моносубстратах [6].

Досліджено можливість інтенсифікації синтезу ПАР при вирощуванні *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші енергетично дефіцитного гліцерину і енергетично надлишкової глюкози. За молярного співвідношення концентрацій глюкози і гліцерину 1:2,5 кількість синтезованих позаклітинних ПАР була в 2,0–2,3 рази вищою, ніж на відповідних моносубстратах [9].

Наведені результати щодо синтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на змішаних промислових відходах підтверджують попередні наші дані про доцільність використання суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів для підвищення синтезу вторинних метаболітів і засвідчують, що висока ефективність таких змішаних субстратів може бути досягнута як при правильному виборі субстратів, так і коректному визначенні молярного співвідношення їх концентрацій. Використання відпрацьованої соняшникової олії та технічного гліцерину для одержання мікробних ПАР дасть змогу вирішити одночасно кілька важливих проблем: знизити собівартість цільового продукту, утилізувати токсичні промислові відходи та підвищити рентабельність виробництва біодизелю.

## БИОКОНВЕРСИЯ СМЕШАННЫХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ В ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА *NOCARDIA VACCINII* ИМВ В-7405

Т.П. Пирог<sup>1,2</sup>, А.Ю. Гершман<sup>1</sup>, Т.А. Шевчук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный университет пищевых технологий,  
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

### Резюме

**Цель.** Определить условия культивирования *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 на смеси технического глицерина (отходы производства биодизеля) и отработанного подсолнечного масла, обеспечивающие максимальные показатели синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ). **Методы.** Концентрацию поверхностно-активных веществ устанавливали весовым методом после экстракции из супернатанта культуральной жидкости модифицированной смесью Фолча (хлороформ–метанол–вода=4:3:2, рН 4,0–4,5 при добавлении 1н НСl). Оптимальное молярное соотношение концентраций рафинированного подсолнечного масла и очищенного глицерина в смеси рассчитывали теоретически согласно концепции «вспо-

могательного субстрата» Бабеля. **Результаты.** На основе теоретических расчетов энергетических потребностей синтеза поверхностно-активных трегалозомиколатов и биомассы *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на энергетически дефицитном субстрате (глицерин) установлено, что молярное соотношение концентраций рафинированного подсолнечного масла и очищенного глицерина в смеси, при котором достигается максимальный синтез ПАВ, должно составлять 0,16:1. Экспериментальные исследования показали, что наиболее высокие показатели синтеза ПАВ наблюдались при молярных соотношениях концентраций этих субстратов 0,14:1–0,19:1, максимально приближенным к теоретически рассчитанному. Установлена возможность замены очищенного глицерина и рафинированного масла в смеси на отходы производства биодизеля и отработанное масло. При молярном соотношении концентраций отработанного масла и технического глицерина 0,078:1 в смеси (с учетом 50% содержания глицерина в составе отходов производства биодизеля) и использовании инокулята, выращенного на техническом глицерине, количество синтезированных ПАВ составляло 5,1–5,4 г/л, что в 1,6–2,3 раза выше по сравнению с культивированием *N. vaccinii* ИМВ В-7405 на соответствующих моносубстратах. **Выводы.** Приведенные результаты подтверждают предыдущие данные о целесообразности использования смеси энергетически неравноценных ростовых субстратов для повышения синтеза вторичных метаболитов и показывают, что высокая эффективность таких смешанных субстратов может быть достигнута как при правильном выборе субстратов, так и корректном определении молярного соотношения их концентраций. Использование отработанного подсолнечного масла и технического глицерина для получения микробных ПАВ позволит решить одновременно несколько важных проблем: снизить себестоимость целевого продукта, утилизировать токсичные промышленные отходы и повысить рентабельность производства биодизеля.

*Ключевые слова:* *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405, поверхностно-активные вещества, смесь отработанного подсолнечного масла и технического глицерина, интенсификация биосинтеза.

## BIOCONVERSION OF MIXED INDUSTRIAL WASTE IN BIOSURFACTANTS OF *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405

*T.P. Pirog*<sup>1,2</sup>, *A.Yu. Gershtman*<sup>1</sup>, *T.A. Shevchuk*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*National University of Food Technologies,  
68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine*

<sup>2</sup>*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

### Summary

**Aim.** To determine the conditions of *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 cultivation on mixture of crude glycerol (waste of biodiesel production) and frying sunflower oil, which provide the maximum parameters of surfactants synthesis. **Methods.** The surfactants concentration was determined by gravimetrically after extraction from the supernatant of the culture liquid with a modified mixture of Folch (chloroform–methanol–water =4:3:2, pH 4.0–4.5 with addition of 1N HCl). The optimal molar ratio of refined sunflower oil and purified glycerol concentrations in mixture was calculated theoretically according to the concept of «auxiliary substrate» of Babel. **Results.** Based on theoretical calculations of

the energy requirements for *N. vaccinii* IMV B-7405 biomass production and the synthesis of surface-active trehalose mycolates on the energy-deficient substrate (glycerol), it was established that the molar ratio of refined sunflower oil and purified glycerol concentrations in mixture providing maximum surfactant synthesis should be 0.16:1. Experimental studies have shown that highest values of surfactant synthesis were observed when the molar ratios of these substrates concentrations was 0.14:1–0.19:1, which is as close as possible to the theoretically calculated one. The possibility of replacing purified glycerol and refined sunflower oil in mixture with biodiesel production waste and frying oil was established. At a molar ratio of frying oil and crude glycerol concentrations in mixture 0.078:1 (considering 50% of glycerol content in biodiesel production waste) and using inoculum grown on crude glycerol, the amount of synthesized surfactants was 5.1–5.4 g/l, which is 1.6–2.3 times higher in comparison with the cultivation of *N. vaccinii* IMV B-7405 on corresponding monosubstrates. **Conclusions.** The obtained results confirm the previous data on the advisability of using mixture of energetically unequal growth substrates to increase the synthesis of secondary metabolites and show that high efficiency of such mixed substrates can be achieved both with the correct choice of substrates and the correct determination of their concentrations molar ratio. The using frying sunflower oil and crude glycerol for production of microbial surfactants will solve several important problems simultaneously: reduce the cost of final product, utilize toxic industrial waste, and increase rentability of biodiesel production.

*Key words:* *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, surfactants, mixture of frying sunflower oil and crude glycerol, intensification of biosynthesis

1. Sekhon Randhawa KK, Rahman PK. Rhamnolipid biosurfactants – past, present, and future scenario of global market. *Front Microbiol.* 2014; 5:454. doi: 10.3389/fmicb.2014.00454.
2. Paulino BN, Pessôa MG, Mano MC, Molina G, Neri-Numa IA, Pastore GM. Current status in biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100(24):10265–93. doi: 10.1007/s00253-016-7980-z.
3. Parthipan P, Preetham E, Machuca LL, Rahman PK, Murugan K, Rajasekar A. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Front Microbiol.* 2017; 8:193. doi: 10.3389/fmicb.2017.00193. 2017.
4. Chong H, Li Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microb Cell Fact.* 2017; 16(1):137. doi: 10.1186/s12934-017-0753-2.
5. Pirog T, Sofilkanych A, Konon A, Shevchuk T, Ivanov S. Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium. *Food Bioprod Process.* 2013; 91(2):149–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.001>.
6. Pirog TP, Shulyakova MO, Shevchuk TA. [Mixed substrates in environment and biotechnological processes]. *Biotechnologia acta.* 2013; 6(6):28–44. doi: 10.15407/biotech6.06.028. Ukrainian.



7. Bommareddy RR, Sabra W, Zeng AP. Glucose-mediated regulation of glycerol uptake in *Rhodospiridium toruloides*: insights through transcriptomic analysis on dual substrate fermentation. *Eng Life Sci.* 2017; 7(3):282–91. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600010>
8. Huang K, Mohd Yahya AR, Amirul AA. Pronounced synergistic influence of mixed substrate cultivation on single step copolymer P(3HB-co-4HB) biosynthesis with a wide range of 4HB monomer composition. *J Chem Technol Biotechnol.* 2014; (89):1023–129. <https://doi.org/10.1002/jctb.4195>.
9. Pirog T, Shevchuk T, Beregova K, Kudrya N. Intensification of surfactants synthesis under cultivation *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on a mixture of glucose and glycerol. *Biotechnologia acta.* 2015; 8(6):23–31. <https://doi.org/10.15407/biotech8.06.023>.
10. Pirog TP, Kudrya NV, Shevchuk TA, Beregova KA, Iutynska GO. [Bioconversion of crude glycerole and molasses mixture in biosurfactants of *Nocardia vaccinii* IMB B-7405]. *Mikrobiol Z.* 2015; 77(3):28–35. Russian. doi: <https://doi.org/10.15407/mikrobiolj77.03.028>
11. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37(8):911–7.
12. Ratledge C. Biodegradation of oils, fats and fatty acids. In: *Biochemistry of microbial degradation.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1994. 590 p.
13. Pirog T, Shevchuk T, Beregova K, Kudrya N. [Peculiarities of glucose and glycerol metabolism in *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 – producer of biosurfactants]. *Ukr Biochem J.* 2015; 87 (2):66–75. Ukrainian.
14. Babel W, Müller RH. Mixed substrates utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics. *J Gen Microbiol.* 1985; 131 (1):39–45.
15. Rosenberg E, Ron EZ. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999; 52(2):154–62.
16. Valerio O, Horvath T, Ponda C, Misra M, Mohanty A. Improved utilization of crude glycerol from biodiesel industries: synthesis and characterization of sustainable biobased polyesters. *Ind Crops Prod.* 2015; 78:141–7.
17. Dziegielewska E, Adamzak M. Free fatty acids and a high initial amount of biomass in the medium increase the synthesis of mannosylerythritol lipids by *Pseudozyma Antarctica*. *Environ Biotechnol.* 2013; 9(1):14–8.
18. Joshi-Navare K, Singh PK, Prabhune AA. New yeast isolate *Pichia caribbica* synthesizes xylolipid biosurfactant with enhanced functionality. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2014; 116(8):1070–9. doi:10.1002/ejlt.201300363.
19. de Oliveira MR, Camilios-Neto D, Baldo C, Magri A, Celligoi MA. Biosynthesis and production of sophorolipids. *Int J Sci Technol Res.* 2014; 3(11):133–46.
20. Elshafie AE, Joshi SJ, Al-Wahaibi YM, Al-Bemani AS, Al-Bahry SN, Al-Maqbali D, Banat IM. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. *Front Microbiol.* 2015; 6:1324. doi: 10.3389/fmicb.2015.01324.
21. Kim YB, Yun HS, Kim EK. Enhanced sophorolipid production by feeding-rate-controlled fed-batch culture. *Bioresour Technol.* 2009; 100(23):6028–32.



22. Wadekar SD, Kale SB, Lali AM, Bhowmick DN, Pratap AP. Utilization of sweetwater as a cost-effective carbon source for sophorolipids production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214). Prep Biochem Biotechnol. 2012; 42(2):125–42. doi: 10.1080/10826068.2011.577883.
23. Bajaj VK, Annature US. Castor oil as secondary carbon source for production of sophorolipids using *Starmerella bombicola* NRRL Y-17069. J Oleo Sci. 2015; 64(3):315–23. doi: 10.5650/jos.ess14214.
24. Denge Pulate V, Bhagwat S, Prabhune A. Microbial oxidation of medium chain fatty alcohol in the synthesis of sophorolipids by *Candida bombicola* and its physicochemical characterization. J Surfact Deterg. 2013; 16(2):173–81. <https://doi.org/10.1007/s11743-012-1378-4>.
25. Ribeiro IA, Bronze MR, Castro MF, Ribeiro MH. Sophorolipids: improvement of the selective production by *Starmerella bombicola* through the design of nutritional requirements. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97(5):1875–87. doi:10.1007/s00253-012-4437-x.
26. Karpenko I, Midyana G, Karpenko O, Novikov V. Influence of food industry wastes as substrates on the yield of biosurfactants of the strain *Pseudomonas* sp. PS-17. Ecol Eng Environ Protec. 2016; VI:44–51.
27. Rashad MM, Al-Kashef AS, Nooman MU, El-din-Mahmoud AE. Co-utilization of motor oil waste and sunflower oil cake on the production of new sophorolipids by *Candida bombicola* NRRL Y-17069. Res J Pharm Biol Chem Sci. 2014; 5(4):1515–28.
28. Kang Z, Du L, Kang J, Wang Y, Wang Q, Liang Q, Qi Q. Production of succinate and polyhydroxyalkanoate from substrate mixture by metabolically engineered *Escherichia coli*. Bioresour Technol. 2011; 102(11):6600–4. doi: 10.1016/j.biortech.2011.03.070.
29. Leite GB, Abdelaziz AE, Hallenbeck PC. Algal biofuels: challenges and opportunities. Bioresour Technol. 2013; 145:134–41. doi: 10.1016/j.biortech.2013.02.007.
30. Feng X, Walker TH, Bridges WC, Thornton C, Gopalakrishnan K. Biomass and lipid production of *Chlorella protothecoides* under heterotrophic cultivation on a mixed waste substrate of brewer fermentation and crude glycerol. Bioresour Technol. 2014; 166:17–23. doi: 10.1016/j.biortech.2014.03.120.
31. Zhou Y, Nie K, Zhang X, Liu S, Wang M, Deng L, Wang F, Tan T. Production of fumaric acid from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhizopus arrhizus*. Bioresour Technol. 2014; 163:48–53. doi: 10.1016/j.biortech.2014.04.021.

Отримано 15.05.2018