

Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук², О.Ю. Машенко¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ БИОКОНВЕРСИИ ТЕХНИЧЕСКОГО ГЛИЦЕРИНА В ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017, *ACINETOBACTER* *CALCOACETICUS* IMB B-7241 И *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

Исследовали возможность синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 в среде с высокой (до 8 % по объему) концентрацией технического глицерина – отхода производства биодизеля.

Установлено, что увеличение концентрации инокулята до 10–15 % и повышение в два раза (по сравнению с базовой средой) содержания источника азотного питания позволяет реализовать процесс синтеза ПАВ штаммами IMB Ac-5017, IMB B-7241 и IMB B-7405 на среде, содержащей 7–8 % (по объему) технического глицерина. В таких условиях культивирования концентрация синтезированных исследуемыми штаммами внеклеточных ПАВ составляла 3,4–5,3 г/л, что в 1,4–3 раза выше, чем на базовой среде с аналогичной концентрацией субстрата.

Исследование потребности *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в факторах роста для синтеза ПАВ на техническом глицерине (2 % по объему) позволило исключить из состава среды дрожжевой автолизат и смесь микроэлементов, заменив их сульфатом меди (0,16 мкмоль/л) и сульфатом цинка (38 мкмоль/л), что упрощает и удешевляет процесс биосинтеза целевого продукта.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, интенсификация биосинтеза, поверхностно-активные вещества, технический глицерин.

В предыдущих исследованиях [2, 3] нами была показана возможность синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании штаммов *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccinii* K-8 (IMB B-7405) в среде с очищенным глицерином. Позже [4] при исследовании влияния компонентов технического глицерина (соли калия и натрия, этанол, метанол) – побочного продукта производства биодизеля на образование ПАВ *N. vaccinii* K-8 было 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. Максимальная концентрация внеклеточных ПАВ (4,78 г/л) была достигнута при 4 % технического глицерина в среде культивирования *N. vaccinii* K-8, а дальнейшее увеличение содержания субстрата сопровождалось снижением показателей синтеза ПАВ. В работе [6] мы установили возможность использования технического глицерина и для синтеза ПАВ штаммами IMB Ac-5017 и IMB B-7241, причем на отходах производства биодизеля концентрация ПАВ была в два раза выше, чем на эквимоллярной по углероду концентрации очищенного субстрата. В этих исследованиях содержание технического глицерина в среде не превышало 2 % (по объему) [6].

В то же время, учитывая объемы производства биодизеля в мире – более 11 млн т в 2008 году с ежегодным последующим увеличением на 8–10 % [15], а также количество образующегося в качестве отходов технического глицерина – 10 % от получаемого биодизеля [13], становится понятно, что 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 изложенным цель работы – установление условий культивирования штаммов *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на среде с максимально возможной концентрацией технического глицерина, обеспечивающих высокие показатели синтеза поверхностно-активных веществ.

Материалы и методы. Объекты исследования – штаммы *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины.

R. erythropolis IMB Ac-5017 выращивали на жидкой минеральной среде (г/л): NaNO_3 – 1,3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, NaCl – 1,0, Na_2HPO_4 – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, pH 6,8–7,0.

Для культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 использовали среду следующего состава (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, NaCl – 1,0, Na_2HPO_4 – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему), раствор микроэлементов [14], pH 6,8–7,0. В одном из вариантов в среду вместо дрожжевого автолизата и микроэлементов вносили (в различных комбинациях) сульфат цинка и сульфат меди в концентрации 38 и 0,16 мкмоль/л соответственно, а также хлорид калия (0,21 ммоль/л).

Штамм *N. vaccinii* IMB B-7405 выращивали на жидкой минеральной среде (г/л): NaNO_3 – 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, KH_2PO_4 – 0,1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01, дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему), pH 6,8–7,0.

В качестве источника углерода использовали технический глицерин, являющийся отходом производства биодизеля (Запорожский биотопливный завод). Концентрация технического глицерина в среде культивирования составляла 2–10 % (по объему).

В одном из вариантов содержание источника азота в среде для культивирования всех исследуемых штаммов увеличивали в 2 раза.

В качестве посевного материала использовали культуры из экспоненциальной фазы роста, выращенные на средах указанного выше состава с 0,5 % технического глицерина. Количество инокулята (10^4 – 10^5 клеток/мл) – 5–20 % от объема засеваемой среды.

Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (220 об/мин) при 30 °C в течение 120–168 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: условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), а также количество синтезированных ПАВ (г/л), которые определяли, как описано нами ранее [14].

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 и их обсуждение. В табл. 1 представлены данные по синтезу ПАВ при культивировании штаммов IMB B-7241, IMB Ac-5017 и IMB B-7405 на среде с различными концентрациями технического глицерина. Максимальное количество ПАВ (5,2–5,6 г/л) синтезировал штамм IMB B-7241 на среде, содержащей не более 4 % технического глицерина. При такой концентрации субстрата количество ПАВ, образуемых штаммом IMB B-7405, не превышало 4,8 г/л. При повышении концентрации технического глицерина в среде культивирования этих двух штаммов до 5–6 % количество синтезируемых ПАВ снижалось до 2,9–4,2 г/л (табл. 1).

Несколько иные закономерности отмечены для штамма IMB Ac-5017. Во-первых, максимальное количество ПАВ (2,4–3,2 г/л) штамм синтезировал на среде с 6 % глицерина (см. табл. 1). Во-вторых, концентрация образуемых *R. erythropolis* IMB Ac-5017 ПАВ была в 1,8–2 раза ниже, чем у двух других исследуемых штаммов. Установлено, что повышение концентрации субстрата в среде культивирования штамма IMB Ac-5017 до 7–8 % сопровождалось снижением количества синтезируемых ПАВ до 1,5–1,7 г/л.

Учитывая достаточно высокую концентрацию технического глицерина в среде культивирования штаммов-продуцентов ПАВ, предположили, что можно повысить эффективность трансформации субстрата в целевой продукт при увеличении длительности процесса культивирования. Однако эксперименты показали, что концентрация ПАВ, синтезируемая в течение 120 и 168 ч, практически не изменялась (см. табл. 1). В дальнейших исследованиях штаммы культивировали в течение 120 ч.

Таблица 1

Влияние концентрации технического глицерина и длительности культивирования штаммов *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на синтез ПАВ

Штамм	Концентрация глицерина в среде, %	Концентрация ПАВ (г/л) при культивировании в течение, ч	
		120	168
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	2	5,6±0,28	5,6±0,28
	3	5,2±0,26	5,5±0,27
	4	5,0±0,25	5,2±0,26
	5	4,0±0,20	4,2±0,21
	6	3,9±0,19	4,0±0,20
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	2	0,95±0,05	1,0±0,05
	3	Н.о.	Н.о.
	4	1,7±0,08	1,8±0,09
	5	1,8±0,09	2,0±0,10
	6	2,4±0,12	3,2±0,16
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	2	3,3±0,17	3,4±0,17
	3	3,4±0,17	3,6±0,18
	4	4,2±0,21	4,8±0,24
	5	3,8±0,19	4,0±0,20
	6	2,9±0,15	3,0±0,15

Примечания. Концентрация биомассы во всех вариантах составляла 0,7–0,8 г/л. Н. о. – не определяли. Концентрация посевного материала для *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017 – 5 %, *N. vaccinii* IMB B-7405 – 10 % (по объему).

Литературные данные свидетельствуют, что концентрация поверхностно-активных веществ, образуемых различными продуцентами на техническом глицерине, как правило, невысокая [9–12, 16]. Так, штамм *Bacillus subtilis* LSFМ-05 при культивировании на среде с 5 % технического глицерина синтезировал 1,36 г/л сурфактина [10] и такое же количество гомологов фенгигина [9]. При выращивании *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 на среде с предварительно гидролизированным (обработка серной кислотой) техническим глицерином (5 % по объему) количество синтезируемых рамнолипидов составляло 1,27 г/л, а на среде, содержащей негидролизированный субстрат, было в несколько раз ниже [11]. Штамм *Starmerella bombicola* ATCC 22214 синтезировал до 6,6 г/л софоролипидов на среде, содержащей 15 % (по объему) технического глицерина и/или 10 % (по объему) подсолнечного масла [16]. Более высокие показатели (около 9 г/л гликолипидов) наблюдались при культивировании в течение 12 сут *Ustilago maydis* на среде с 50 г/л технического глицерина [12]. Авторам удалось повысить концентрацию ПАВ до 32 г/л при внесении в среду с 50 г/л глицерина некоторых аминокислот, витаминов группы В, цитрата аммония, а также маннозы и эритрита (по 20 г/л) [12].

Отметим, что в большинстве работ концентрация технического глицерина в среде культивирования продуцентов ПАВ составляла 5 % (по объему) или 50 г/л [9–12]. В работе [12] авторы исследовали влияние более высоких концентраций субстрата на синтез гликолипидов. Однако повышение концентрации технического глицерина до 80 г/л сопровождалось снижением количества синтезируемых гликолипидов в 2 раза.

Одним из факторов, определяющим эффективность микробных технологий, является способ подготовки инокулята, в частности его концентрация [7]. В наших предыдущих исследованиях было показано, что при культивировании штаммов IMB B-7241, IMB Ac-5017 и IMB B-7405 на этаноле, гексадекане, очищенном глицерине оптимальной концентрацией инокулята из экспоненциальной фазы роста является 5–10 % [2, 7]. Поскольку технический глицерин содержит потенциальные ингибиторы микробного роста (метанол, натриевые и калиевые соли) [8], мы предположили, что увеличение концентрации посевного материала позволит повысить содержание технического глицерина в среде культивирования исследуемых штаммов без снижения показателей синтеза ПАВ.

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что, независимо от концентрации технического глицерина в среде культивирования всех исследуемых штаммов, повышение концентрации инокулята до 10–15 % для *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017, а также до 15–20 % для *N. vaccinii* IMB B-7405 сопровождалось увеличением количества

синтезированных ПАВ. В дальнейших исследованиях для синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на техническом глицерине использовали посевной материал в концентрации 15, 10 и 15% соответственно.

Таблица 2

Влияние концентрации инокулята на синтез ПАВ при культивировании штаммов IMB Ac-5017, IMB B-7241 и IMB B-7405 в среде с техническим глицерином

Штамм	Концентрация субстрата, %	Концентрация инокулята, %	ПАВ (г/л), % от контроля*
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	4	10	120
		15	135
	5	10	124
		15	120
	6	10	122
		15	120
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	5	10	115
		15	110
	6	10	149
		15	140
	7	10	120
		15	117
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	4	15	137
		20	130
	5	15	130
		20	130
	6	15	148
		20	147

Примечания. Длительность культивирования 120 ч. Контроль (100 %) – количество ПАВ при концентрации инокулята для *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *R. erythropolis* IMB Ac-5017 5 %, *N. vaccinii* IMB B-7405 10 %. * – при определении показателя погрешность не превышала 5 %.

Важным фактором, влияющим на синтез микробных вторичных метаболитов, является соотношение C/N в среде культивирования продуцентов [7]. Ранее мы установили оптимальные для синтеза ПАВ концентрации источников углерода и азота в средах для выращивания штаммов IMB B-7241, IMB Ac-5017 и IMB B-7405 [2, 7, 14]. Однако при проведении данных исследований, повышая концентрацию технического глицерина в среде, мы не изменяли содержание азота, которое является оптимальным для 2 % (по объему) технического глицерина. В связи с этим на следующем этапе изучали синтез ПАВ при культивировании штаммов на средах, в которых концентрация азота была увеличена в 2 раза (табл. 3).

Как видно из данных, представленных в табл. 3, повышение содержания источника азота в среде культивирования всех штаммов сопровождалось увеличением количества синтезированных ПАВ. При этом максимальная концентрация ПАВ, образуемых *R. erythropolis* IMB Ac-5017 (3,4 г/л), *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (5,0 г/л), *N. vaccinii* IMB B-7405 (5,3 г/л) наблюдалась при содержании технического глицерина 7 % (штамм IMB B-7241) и 8 % (штаммы IMB Ac-5017 и IMB B-7405). Ранее (см. табл. 1) такие показатели синтеза отмечались при концентрации субстрата в среде 3–4 % (штамм IMB B-7241), 6 % (штамм IMB Ac-5017, длительность культивирования 168 ч), 4 % (IMB B-7405, длительность культивирования 168 ч).

Таким образом, увеличение концентрации инокулята и азота позволило повысить содержание технического глицерина в среде культивирования исследуемых штаммов почти в два раза и обеспечить высокие показатели синтеза ПАВ при снижении длительности процесса (для *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405). Отметим, что в таких условиях выращивания штаммов-продуцентов снижался выход ПАВ от субстрата, однако необходимость утилизации максимального количества отходов производства биодизеля компенсирует снижение этого показателя процесса биосинтеза. Тем более что, согласно литературным данным [9–12], максимальная концентрация технического глицерина в среде для биосинтеза ПАВ

не превышает 5 %, а количество синтезируемых поверхностно-активных веществ при этом часто ниже, чем для *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405.

Таблица 3

Влияние концентрации источника азота в среде с техническим глицерином на синтез ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405

Штамм	Концентрация глицерина, %	Концентрация источника азота, г/л	ПАВ, г/л
<i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017	6	1,3	2,4±0,12
		2,6	2,9±0,14
	7	1,3	1,7±0,08
		2,6	2,9±0,14
	8	1,3	1,5±0,07
		2,6	3,4±0,17
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	5	0,35	3,8±0,19
		0,7	4,6±0,23
	6	0,35	3,9±0,19
		0,7	4,3±0,21
	7	0,35	3,5±0,17
		0,7	5,0±0,25
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	6	0,5	2,9±0,14
		1,0	5,0±0,25
	7	0,5	2,0±0,10
		1,0	5,0±0,25
	8	0,5	1,8±0,09
		1,0	5,3±0,26

Примечания. Длительность культивирования 120 ч. Концентрация инокулята для *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 и *N. vaccinii* IMB B-7405 15, 10 и 15 % соответственно.

Ранее [14] нами было показано, что внесение дрожжевого автолизата и микроэлементов в среду культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 сопровождалось увеличением синтеза ПАВ. Учитывая, что показатели синтеза ПАВ штаммом IMB B-7241 на среде с техническим глицерином (2 %) были в два раза выше по сравнению с таковыми на среде, содержащей эквивалентную по углероду концентрацию очищенного субстрата [6], предположили возможность исключения из состава среды, содержащей технический глицерин, дрожжевого автолизата и микроэлементов. Однако в таких условиях концентрация ПАВ существенно снижалась и составляла всего 1 г/л (табл. 4).

Таблица 4

Влияние дрожжевого автолизата и микроэлементов на синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7251 на техническом глицерине

Наличие в среде культивирования					ПАВ, г/л
микро-элементов	дрожжевого автолизата	сульфата цинка	сульфата меди	хлорида калия	
—	—	—	—	—	1,0±0,05
+	+	—	—	—	4,5±0,22
—	—	+	+	+	4,7±0,24
—	—	+	+	—	5,2±0,26

Примечания. Концентрация сульфата цинка и меди 38 и 0,16 мкмоль/л соответственно, хлорида калия 0,21 ммоль/л, технического глицерина — 2 % (по объему). Длительность культивирования 120 ч. Инокулят (5 %) выращен на среде без дрожжевого автолизата и микроэлементов.

В предыдущих исследованиях [5] нами была установлена возможность замены дрожжевого автолизата и смеси микроэлементов в составе среды с очищенным глицерином для культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на 0,21 ммоль/л KCl, 38 мкмоль/л сульфата цинка и 0,16 мкмоль/л сульфата меди. В таких условиях культивирования штамма IMB B-7241 концентрация ПАВ в 1,2–1,6 раза превышала таковую на исходной среде, содержащей дрожжевой автолизат и микроэлементы. В то же время при выращивании штамма IMB B-7241 на среде с

технічним глицерином максимальна концентрація ПАВ наблюдалась в присутстві тільки сульфата цинку і міді (табл. 4). Можливість виключення із середовища хлориду калію об'ясовується наявністю достаточного високого вмісту K^+ в складі технічного глицерину [11, 15]. В даних дослідженнях концентрація технічного глицерину в середовищі становила 2 %. Ми передбачаємо, що підвищення концентрації інокуляту до 15 % і вмісту джерела азоту в два рази в середовищі культивування штаму IMB B-7241, а також введення в середовище сульфату міді і цинку замість дріжджового автолізу та мікроелементів дозволить суттєво збільшити концентрацію технічного глицерину і забезпечити високі показники синтезу ПАВ. Роз'ясненню цього питання будуть присвячені наші подальші дослідження.

Таким чином, в результаті проведеної роботи встановлено умови культивування штамів *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405, що дозволяють реалізувати біосинтез ПАВ в середовищі з високим (до 8 %) вмістом технічного глицерину.

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

¹ Національний університет харчових технологій, Київ

² Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Київ

ШЛЯХИ ПІДВИЩЕННЯ БІОКОНВЕРСІЇ ТЕХНІЧНОГО ГЛІЦЕРИНУ У ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017, *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 І *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

Резюме

Досліджували можливість синтезу поверхнево-активних речовин (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 у середовищі з високим (до 8 %, об'ємна частка) вмістом технічного глицерину – відходу виробництва біодизеля.

Встановлено, що збільшення концентрації інокуляту до 10–15 % і підвищення у два рази (порівняно з базовим середовищем) вмісту джерела азотного живлення дає змогу реалізувати процес синтезу ПАВ штамми IMB Ac-5017, IMB B-7241 і IMB B-7405 на середовищі, що містить 7–8 % (об'ємна частка) технічного глицерину. За таких умов культивування концентрація синтезованих досліджуваними штамми позаклітинних ПАВ становила 3,4–5,3 г/л, що у 1,4–3 рази вище, ніж на базовому середовищі з аналогічною концентрацією субстрату.

Дослідження потреб *A. calcoaceticus* IMB B-7241 у факторах росту для синтезу ПАВ на технічному глицерині (2 %, об'ємна частка) дало змогу виключити зі складу середовища дріжджовий автолізат і суміш мікроелементів, замінивши їх сульфатом міді (0,16 мкмоль/л) і сульфатом цинку (38 мкмоль/л), що спрощує і з дешевлює процес біосинтезу цільового продукту.

Ключові слова: *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, інтенсифікація біосинтезу, поверхнево-активні речовини, технічний глицерин.

T.P. Pirog^{1,2}, T.A. Shevchuk², O.Yu. Mashchenko¹

¹ National University of Food Technologies, Kyiv

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

THE WAYS OF INCREASING BIOCONVERSION OF CRUDE GLYCEROL IN BIOSURFACTANTS OF *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* IMB Ac-5017, *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 AND *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

Summary

The possibility of surface-active substances (SAS, biosurfactants) synthesis under cultivation of *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 in the medium with high (to 8 %, v/v) concentration of crude glycerol – by-product of biodiesel production was investigated.

It was established that the increasing inoculum concentration to 10–15 % and content of nitrogen source to twice (as compared to basic medium) allowed realizing the surfactants synthesis by IMB Ac-5017, IMB B-7241 and IMB B-7405 strains in the medium, containing 7–8 % (v/v) of crude glycerol. Under such conditions of cultivation the concentration of extracellular surfactants, synthesized by strains under study, was 3.4–5.3 g/l that is to 1.4–3 times higher than in the basic medium with analogous substrate concentration.

The study of *A. calcoaceticus* IMB B-7241 strain demand for growth factors for surfactants synthesis on crude glycerol (2 %, v/v) allowed excepting the yeast autolysate and microelements from the medium, replacing them by copper sulfate (0.16 $\mu\text{mol/l}$) and zinc sulfate (38 $\mu\text{mol/l}$).

The paper is presented in Russian.

Key words: *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, intensification of biosynthesis, biosurfactants, crude glycerol.

The author's 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. 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.
3. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ B-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ac-5017 в среде с глицерином // Там же. – 2012. – 74, № 1. – С. 20–27.
4. Пирог Т.П., Покора К.А., Мащенко О.Ю., Шевчук Т.А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* K-8 на техническом глицерине // Там же. – 2013. – 75, № 4. – С. 13–22.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Мащенко О.Ю., Парфенюк С.А., Иутинская Г.А. Влияние факторов роста и некоторых микроэлементов на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ B-7241 // Там же. – 2013. – 75, № 5. – С.
6. Пирог Т.П., Софилканич А.П., Покора К.А., Шевчук Т.А., Иутинская Г.А. Синтез поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ B-7241 и *Nocardia vaccinii* ИМВ B-7405 на промышленных отходах // Там же. – 2014. – 76, №2. – С. 17–23.
7. Подгорский В.С., Иутинская Г.А., Пирог Т.П. Интенсификация технологий микробного синтеза. Киев: Наук. думка, 2010. – 327 с.
8. 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.
9. 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 // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – 38, N 7. – P. 863–871.
10. de Faria A. F., Teodoro-Martinez D. S., de Oliveira Barbosa G. N., Vaz B. G., Silva I. S., Garcia J. S., Totola M. R., Eberlin M. N., Grossman M., Alves O. L., Durrant L. R. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry // Proc. Biochem. – 2011. – 46, N 9. – P. 1951–1957.
11. de Sousa J. R., da Costa Correia J. A., de Almeida J. G. L., Rodrigues S., Pessoa O. D. L., Melo V. M. M., Gonçalves L. R.B. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 // Ibid. – 2011. – 46, N 9. – P. 1831–1839.
12. 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.
13. Louhasakul Y., Cheirsilp B. Industrial waste utilization for low-cost production of raw material oil through microbial fermentation // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2013. – 169, N 1. – P. 110–122.
14. Pirog T.P., Antonyuk 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. Biotechnol. – 2009. – 45, N 3. – P. 272–278.
15. Posada J.A., Cardona C.A., Gonzalez R. Analysis of the production process of optically pure D-lactic acid from raw glycerol using engineered *Escherichia coli* strains // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2012. – 166, N 3. – P. 680–699.
16. 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.

Отримано 23.09.2013