

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1

Состав различных видов глицерина [2]

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 2

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 3

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

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

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

Таблица 4

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

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

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

Таблица 5

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

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

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

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

N.P.Pirog^{1,2}, Kh. A. Pokora¹, O. Yu. Mashchenko¹, T.A. Shevchuk²

¹National University of Food Technologies, Kyiv

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

INTENSIFICATION OF SYNTHESIS OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES OF *NOCARDIA VACCINII* K-8 ON CRUDE GLYCEROL

Summary

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

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

The paper is presented in Russian.

Key words: bacteria of *Nocardia* genus, surface-active substances, intensification of biosynthesis, biodiesel production waste, crude glycerol.

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

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

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

Отримано 23.11.2012