

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Національний університет харчових технологій

БЕРЕГОВА ХРИСТИНА АНДРІЇВНА

УДК 759.873.088.5:661.185

**БІОКОНВЕРСІЯ ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДІВ У ПОВЕРХНЕВО-
АКТИВНІ РЕЧОВИНИ *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор **Пирог Тетяна Павлівна**, Національний університет харчових технологій, завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, доцент **Тодосійчук Тетяна Сергіївна**, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, завідувач кафедри промислової біотехнології

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Тугай Тетяна Іванівна**, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, старший науковий співробітник відділу фізіології та систематики мікроміцетів

Захист відбудеться «7» червня 2017 р. о 13⁰⁰ год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.058.03 Національного університету харчових технологій за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 68, корпус А, аудиторія А-311.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного університету харчових технологій за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 68.

Автореферат розісланий «27» квітня 2017 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н.О.Бублієнко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР) завдяки унікальним фізико-хімічним і біологічним властивостям можуть використовуватися у різноманітних галузях промисловості, таких як харчова, медична, нафтовидобувна, а також у сільському господарстві та для очищення довкілля [Gudiña, 2015, Eraqi, 2015]. Одним з факторів, що стримує великомасштабне виробництво мікробних ПАР є їх висока собівартість. Разом з тим, проблемою сьогодення є утилізація значної кількості промислових відходів.

Зазначимо, що небезпечними є не тільки відходи, що містять токсичні речовини (наприклад, гліцеринова фракція – відхід виробництва біодизелю), але й відходи, що потрапляють у навколишнє середовище у неконтрольованій кількості, наприклад олієвмісні (відходи оліє-жирового виробництва, пересмажена олія після використання в закладах громадського харчування).

Раніше на кафедрі біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій (НУХТ) із забруднених нафтою зразків ґрунту було виділено штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* K-8 [Pirog, 2005]. Встановлено здатність *N.vaccinii* K-8 (ІМВ В-7405) синтезувати метаболіти з поверхнево-активними властивостями на гідрофобних (рідкі парафіни, гексадекан) і гідрофільних (етанол, глюкоза, очищений гліцерин) субстратах [Pirog, 2013]. Показано, що за хімічною природою ПАР *N.vaccinii* K-8 (ІМВ В-7405) є комплексом гліко-, аміно- і нейтральних ліпідів (гліколіпіди представлені трегалозоміколатами), розроблено шляхи інтенсифікації синтезу ПАР на очищеному гліцерині оптимізацією складу поживного середовища з використанням математичних методів планування експерименту і внесенням попередників біосинтезу ПАР. Встановлено можливість практичного використання ПАР штаму ІМВ В-7405 у природоохоронних технологіях для очищення води і ґрунту від ксенобіотиків, а також як антимікробних щодо фітопатогенних бактерій агентів [Пирог, 2011].

Зазначимо, що у літературі є лише поодинокі повідомлення про синтез ПАР представниками роду *Nocardia* і тільки на дорогих нетехнологічних гідрофобних субстратах (зокрема, *n*-гексадекані) [Kim, 2000, Christova 2015].

Одним із шляхів здешевлення технології ПАР *N.vaccinii* K-8 (ІМВ В-7405) є використання як субстратів відходів різних виробництв.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота включає дослідження, виконані згідно плану науково-дослідних робіт кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій за темою «Розробка високоефективних ресурсозберігаючих біотехнологій з метою їх впровадження у мікробіологічну, фармацевтичну та харчову промисловість» (2011–2015 рр.), а також у рамках фундаментальних досліджень за рахунок видатків загального фонду державного бюджету «Розробка наукових основ регуляції синтезу і фізико-хімічних властивостей мікробних сурфактантів мультифункціонального призначення» (2010–2012 рр., № державної реєстрації 0109U008586), «Наукові засади створення комплексної безвідходної технології мікробних препаратів з

різноманітними біологічними властивостями» (2013–2015 рр., № державної реєстрації 0112U007799).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – дослідити можливість біосинтезу ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на різноманітних промислових відходах і визначити біологічні властивості синтезованих ПАР.

Для виконання роботи потрібно було вирішити такі завдання:

- дослідити можливість трансформації різноманітних промислових відходів у ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405;
- встановити можливість інтенсифікації біосинтезу ПАР на промислових відходах внесенням у середовище екзогенних попередників (органічні кислоти, вуглеводи, олія);
- дослідити можливість синтезу ПАР за умов росту *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші ростових субстратів, у тому числі й змішаних промислових відходах;
- встановити умови культивування, що забезпечують максимальний синтез ПАР на суміші промислових відходів;
- визначити шляхи катаболізму вуглеводів у *N.vaccinii* ІМВ В-7405 з подальшим використанням цих даних для теоретичного розрахунку оптимального співвідношення концентрації монособстратів у суміші для біосинтезу ПАР;
- визначити антиадгезивні та антимікробні властивості ПАР, синтезованих на промислових відходах;
- дослідити синтез штамом ІМВ В-7405 інших, відмінних від ПАР, практично цінних метаболітів;
- розробити технологію біосинтезу ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на промислових відходах, що забезпечить біоконверсію максимально можливої їх концентрації у поверхнево-активні речовини;
- розрахувати економічну ефективність запропонованої біотехнології.

Об'єкт дослідження – *N.vaccinii* ІМВ В-7405 та мікробні поверхнево-активні речовини.

Предмет дослідження – біосинтез поверхнево-активних речовин, біоконверсія технічного гліцерину, антимікробна та антиадгезивна дія ПАР.

Методи дослідження. Під час виконання дисертаційної роботи використовували такі методи досліджень: мікробіологічні (визначення морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознак бактерій, антимікробних та антиадгезивних властивостей ПАР, кількості життєздатних мікробних клітин); біотехнологічні (культивування мікроорганізмів); фізико-хімічні (визначення поверхневого натягу, концентрації ПАР, біомаси і фітогормонів, індексу емульгування); біохімічні (визначення активності ферментів катаболізму вуглеводів, анаплеротичних реакцій і біосинтезу ПАР, енергетичних потреб синтезу ПАР і біомаси на суміші субстратів); математичні (статистична обробка результатів досліджень).

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено можливість заміни дорогих субстратів (етанол, глюкоза, очищений гліцерин) для синтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відходи харчової промисловості (пересмажена

соняшникова олія, молочна сироватка, меляса, олійні фузи) та виробництва біодизелю (технічний гліцерин). Встановлено можливість підвищення в 1,3–2,8 разів синтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за внесення у середовище з відходами харчових виробництв і технічним гліцерином екзогенних попередників (фумарат і цитрат, соняшникова олія, глюкоза, 0,05–0,1 %).

Вперше показано можливість підвищення синтезу ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші енергетично нерівноцінних субстратів. На основі аналізу шляхів катаболізму С₃–С₆-сполук у штаму ІМВ В-7405 визначено енергетично надлишковий (глюкоза) та енергетично дефіцитний (гліцерин) субстрати.

На основі теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ПАР та біомаси на гліцерині визначено «доповнюючу» концентрацію глюкози, яка дає змогу підвищити ефективність конверсії вуглецю використуваних субстратів у ПАР. Встановлено, що інтенсифікація синтезу ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші гліцерину та глюкози зумовлена підвищенням в 1,2–5,7 разів активності ферментів біосинтезу ПАР (трегалозофосфатсинтази, фосфоенолпіруват(ФЕП)-карбоксікінази, ФЕП-синтетази) порівняно з культивуванням на відповідних моносубстратах.

Показано можливість інтенсифікації синтезу ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші меляси з етанолом та очищеним гліцерином, а також можливість заміни очищеного гліцерину на технічний у суміші з мелясою.

Вперше встановлено здатність *N.vaccinii* ІМВ В-7405 до одночасного синтезу ПАР і фітогормонів (ауксини, цитокініни, абсцизова кислота).

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологію одержання ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на змішаних промислових відходах, яка включає: 1) використання як джерел вуглецю суміші технічного гліцерину об'ємною часткою 8 % і меляси масовою часткою 1 %; 2) підвищення у два рази (до 1 г/дм³) вмісту нітрату натрію у середовищі культивування; 3) використання 10 % інокуляту, вирощеного на суміші технічного гліцерину (0,25 %) і меляси (0,25 %). Реалізація даної технології дає змогу не тільки утилізувати велику кількість токсичного технічного гліцерину, а й збільшити концентрацію позаклітинних ПАР до 13,0 г/дм³, що більш ніж у 2 рази вище, ніж на відповідних моносубстратах.

Встановлено, що за обробки медичних матеріалів та абіотичних поверхонь супернатантом культуральної рідини та розчином поверхнево-активних речовин (0,005–0,05 мг/см³) ступінь адгезії бактерій, дріжджів та мікроміцетів не перевищував 65 %.

Встановлено антимікробну дію ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на деякі бактерії (у тому числі, й умовно патогенні родів *Proteus*, *Staphylococcus*, *Enterobacter*), дріжджі роду *Candida* і мікроміцети.

Технології синтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на промислових відходах захищені патентами України на винахід – № 105975 (2014), № 108705 (2015), №109074 (2015), № 109825 (2015), № 109831 (2015), № 111045 (2016).

Розроблено паспорт штаму *N.vaccinii* К-8, отримано заключення Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України про його непатогенність і свідоцтво про депонування у Депозитарії Інституту

мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номером ІМВ В-7405.

Розроблено технологічну схему одержання поверхнево-активних речовин для контролю чисельності фітопатогенних бактерій за умов росту продуцента на суміші технічного гліцерину та меляси. Результати теоретичних розрахунків витрат на приготування поживних середовищ для отримання препарату «Фітолавін» і культуральної рідини *N. vaccinii* ІМВ В-7405, необхідних для двократної обробки ріпаку, свідчать про економічну ефективність запропонованої біотехнології. Визначено, що вартість поживного середовища для одержання препарату ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 у 1,5 разів нижча, ніж відомого аналогу.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Дисертантом проведено експериментальні дослідження, проаналізовано наукову літературу з даної проблеми, узагальнено отримані експериментальні результати, проведено порівняльний аналіз з даними літератури.

Планування основних напрямів і результатів роботи, підготовка публікацій за результатами досліджень проходили за безпосередньої участі наукового керівника д-ра біол. наук, проф. Т.П. Пирог.

Визначення активності ферментів здійснювали спільно з провідним інженером відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України Шевчук Т.А., визначення кількісного та якісного складу фітогормонів – спільно з старшим науковим співробітником відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України Леоновою Н.О., які є співавторами публікацій.

Берегова Х.А. є стипендіатом Кабінету Міністрів України (постанова президії Комітету з державних премій України в галузі науки і техніки від 10 жовтня 2016 року №6).

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на 17-й Міжнародній Пушчинській школі-конференції молодих вчених «Биология – наука XXI века» (м. Пушино, Російська Федерація, 2013), 77-ій студентській науково-практичній конференції присвяченій 90-річчю з дня народження професора П.Г. Зельмановича і 90-річчю з дня народження доцента Б.М. Зельмановича (м. Красноярськ, Російська Федерація, 2013), VIII, IX Міжнародній науковій конференції «Молодь та поступ біології» (м. Львів, Україна, 2012–2013), Всеросійській науково-практичній конференції «Актуальные вопросы медицинской науки» (м. Ярославль, Російська Федерація, 2013), XII Всеросійській науково-практичній конференції «Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем» (м. Кіров, Російська Федерація, 2014), IV Всеросійській науковій конференції «Актуальные вопросы биомедицинской инженерии» (м. Саратов, Російська Федерація, 2014), IV науково-практичній конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології» (м. Харків, Україна, 2014), Всеросійській молодіжній науковій конференції «Современные биоинженерные и ядерно-физические технологии в медицине–2014» (м. Саратов, Російська

Федерація, 2014), XI Українському біохімічному конгресі (м. Київ, Україна, 2014), VIII Всеукраїнській науково-практичній конференції (м. Київ, Україна, 2014), I Міжнародній науково-практичній інтернет конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації» (м. Київ, Україна, 2016), III Міжнародній науково-практичній конференції студентів і молодих вчених «Наука і медицина: сучасний погляд молоді» (м.Алмати, Республіка Казахстан, 2016), 82-й міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (м. Київ, Україна, 2016).

Публікації. За результатами наукових досліджень опубліковано 40 наукових праць, із них 15 статей (8 – у журналах бази SCOPUS, 5 – у фахових виданнях), 10 статей у матеріалах міжнародних конференцій та 9 тез доповідей, 6 патентів України на винахід.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 159 сторінках машинописного тексту і складається з таких структурних частин: «Вступ», «Огляд літератури» (1 розділ), «Результати досліджень» (6 розділів), «Обговорення», «Висновки», «Список використаних джерел», який містить 257 посилань. Робота містить 43 таблиці та 13 рисунків.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Розділ 1. Бактерії роду *Nocardia* як об'єкти біотехнології.

Узагальнено дані літератури про практичне використання бактерій роду *Nocardia*, зокрема для деструкції аліфатичних, ароматичних та гетероциклічних ксенобіотиків, як продуцентів широкого спектру сполук з антимікробною дією та цитотоксичністю щодо ракових клітин (бразилібактин А, нокарацин А, В, С, бразиліхінон D, наргеніцин А₁ тощо). Наведено дані про синтез представниками роду *Nocardia* поверхнево-активних речовин на гідрофобних субстратах.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Розділ 2. Матеріали і методи досліджень.

Об'єкти досліджень. Як основний об'єкт досліджень використовували виділений із ґрунту бактеріальний штам *Nocardia vaccinii* К-8 [Pirog, 2005], депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номером ІМВ В-7405.

У роботі також використовували чисті культури бактерій (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Proteus vulgaris* ПА-12, *Staphylococcus aureus* БМС-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Enterobacter cloacae* С-8, *Erwinia aroideae* Н-3, *Erwinia* sp. ТБ-4), дріжджів (*Candida albicans* Д-6, *Candida tropicalis* РЕ-2, *Candida utilis* ЕІ-8, *Candida guilliermondii* МК-7) і мікроміцетів (*Aspergillus niger* Р-3, *Fusarium culmorum* Т-7) із колекції культур мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

Культивування *N.vaccinii* ІМВ В-7405. Бактерії вирощували на мінеральному середовищі, (г/дм³): NaNO₃ – 0,5; MgSO₄×7H₂O – 0,1; CaCl₂×2 H₂O – 0,1; KH₂PO₄ – 0,1; FeSO₄×7H₂O – 0,001, рН 6,8–7,0. У середовище

культивування вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка).

Як джерело вуглецю та енергії використовували моносубстрати: очищений гліцерин в концентрації 0,92–2 % (об'ємна частка), етанол 1–2 %, мелясу – 1,1–2,2 % (масова частка за вуглеводами), пересмажену соняшникову олію, молочну сироватку; олійний фуз (відходи від оліє-жирового виробництва) – по 2 % (об'ємна частка), технічний гліцерин від Запорізького біопаливного заводу – 2–10 % (об'ємна частка); а також змішані субстрати: суміш меляси (0,5 і 1 %) з етанолом і очищеним гліцерином (0,5 і 1 %), меляси (1–3 %) і технічного гліцерину (1–9 %), глюкози (0,5–1 %) і гліцерину (0,2–0,8 %), суміш глюкози і гліцерину у молярному співвідношенні 1:1; 1:2; 1:2,5; 1:3; 1:4 відповідно. В одному із варіантів в середовище вносили попередники синтезу ПАР: цитрат і фумарат натрію (0,1 %), соняшникову олію – 0,05–0,5 %, та глюкозу – 0,05–0,5 %. Для модифікації середнього складу технічного гліцерину використовували «модифікований гліцерин»: до 2 % очищеного гліцерину добавляли солі NaCl, KCl (по 2,5 %), та етанол і метанол (по 0,3 % по об'єму).

Посівний матеріал – культура з середини експоненційної фази росту, вирощена на середовищі наведеного вище складу, що містило як джерело вуглецю моносубстрати у концентрації 0,5–1,0 % та суміші субстратів у концентрації 0,25 % кожного. Концентрація посівного матеріалу (10^4 – 10^5 клітин/см³) становила 10–20 % від об'єму середовища.

Культивування здійснювали в колбах об'ємом 750 см³ із 100 см³ середовища на качалці (320 об/хв) упродовж 24–240 год при 30°C.

Визначення параметрів росту і синтезу ПАР. Біомасу визначали за оптичною густиною культуральної рідини з наступним перерахунком на абсолютно суху масу за калібрувальним графіком або ваговим методом. Вимірювання поверхневого натягу (σ_s) здійснювали на напівавтоматичному тензіометрі «LAUDA TD 1C» (Німеччина). Для експрес-оцінки вмісту ПАР у культуральній рідині використовували показник «умовна концентрація ПАР» (ПАР*, безрозмірні одиниці), який визначали як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини в точці різкого зростання поверхневого натягу на кривій залежності σ_s від логарифму показника розведення. Концентрацію позаклітинних ПАР (г/дм³) визначали ваговим методом після трикратної екстракції поверхнево-активних ліпідів з супернатанту культуральної рідини сумішшю Фолча (хлороформ:метанол, 2:1) з наступним випарюванням при температурі 50 °C до постійної маси. Індекс емульгування визначали за методом, описаним у роботі [Cooper, 1987]. Як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

Ензиматичні аналізи. Визначення активності ферментів здійснювали у безклітинних екстрактах (клітини руйнували ультразвуком, одержаний дезінтеграт центрифугували, супернатант використовували як безклітинний екстракт). Для отримання безклітинних екстрактів використовували клітини, які перебували на початку експоненційної фази росту.

НАД⁺-залежну гліцериндегідрогеназу (КФ 1.1.1.6), ізоцитратдегідрогеназу (КФ 1.1.1.42), 2-оксоглутаратдегідрогеназу (КФ

1.2.4.2), малатдегідрогеназну (КФ 1.1.1.37, КФ 1.1.1.82), глутаматдегідрогеназну (КФ 1.4.1.2), фосфоенолпіруват (ФЕП)-карбоксилазну (КФ 4.1.1.31), ФЕП-карбоксикіназну (КФ 4.1.1.49), ФЕП-синтетазну (КФ 2.7.9.2) активність визначали за реакцією окиснення/відновлення НАД(Ф)Н/НАД(Ф)⁺, відповідно при 340 нм. Піролохінолінхінон (ПХХ)-залежну алкогольдегідрогеназну (КФ 1.1.2.8) і ПХХ-залежну гліцериндегідрогеназну (КФ 1.1.99.22) активність визначили за відновленням дихлорфеноліндофенолу за присутності феназинметасульфату при 600 нм з гліцирином як донором електронів. Дигідроксиацетонкіназну (КФ 2.7.1.29) і гліцеринкіназну (КФ 2.7.1.30) активність визначали за утворенням дигідроксиацетонфосфату і гліцерин-3-фосфату відповідно, які аналізували спектрофотометрично за окисненням/відновленням НАДН (НАД⁺) у спряженій реакції з гліцерин-3-фосфатдегідрогеназою. Нікотинопротейнову (НАД(Ф)Н-вмісну) алкогольдегідрогеназну активність (КФ 1.1.99.36) вимірювали спектрофотометрично за відновленням 4-нітрозоз-N,N-диметиланіліну при 440 нм з етанолом і гліцирином як донором електронів. Ізоцитратліазну (КФ 4.1.3.1) активність визначали за швидкістю утворення фенілгідразону гліоксилату за довжини хвилі 324 нм. Трегалозофосфатсинтазну активність (КФ 2.4.1.15) визначали за утворенням уридинфосфату за окисненням НАДН за довжини хвилі 340 нм у спряжених реакціях утворення пірувату з ФЕП за участю піруваткінази і утворення лактату з пірувату за участю лактатдегідрогенази.

Визначення антимікробних властивостей ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405.

У дослідженнях використовували поверхнево-активні речовини у вигляді супернатанту культуральної рідини і розчину ПАР, екстрагованих з супернатанту сумішшю Фолча, а також водну фазу, що залишилася після екстракції ПАР. Супернатант, розчин ПАР і водну фазу стерилізували при 112 °С, 30 хв.

Антимікробні властивості ПАР визначали за методом, описаним у роботі [Maldonado, 2009]. Концентрацію живих клітин визначали за методом Коха.

Для визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) у 10 стерильних пробірок вносили по 1 см³ середовища [Mazzola, 2009]. У першу додавали 1 см³ розчину ПАР, перемішували, відбирали 1 см³ і переносили у наступну пробірку. Аналогічно проводили розведення для наступних дев'яти. У кожному з пробірок вносили по 0,1 см³ суспензії тест-культур (10⁵–10⁶ КУО/ см³) та перемішували. Пробірки інкубували упродовж 24 год при температурі, оптимальній для росту тест-культур. Результати оцінювали візуально по помутнінню середовища: (+) – пробірки, в яких спостерігали помутніння середовища (ріст тест-культури), (–) – помутніння не було (ріст відсутній). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР визначали як концентрацію ПАР в першій пробірці, де ріст був відсутній.

Визначення антиадгезивних властивостей препаратів ПАР.

Попередньо простерилізовані досліджувані матеріали обробляли препаратами 1–3, витримували 24 год при 30 °С, ополіскували дистильованою водою і вносили у суспензію тест-культур на 2 год при 30 °С. Неадгезовані клітини змивали водопровідною водою, а кількість прикріплених клітин визначали

двома методами, описаними у роботах [Nitschke, 2009] і [Rufino, 2011]. Рівень адгезії визначали як відношення оптичної густини суспензії або кількості клітин, прикріплених до попередньо оброблених препаратами 1–3 матеріалів, до оптичної густини суспензії (кількості клітин), адгезованих на необроблених матеріалах і виражали у відсотках. Концентрацію живих клітин визначали за методом Коха.

Дослідження синтезу фітогормонів *N.vaccinii* ІМВ В-7405. Фітогормони визначали у супернатанті культуральної рідини до і після вилучення ПАР. Екстракцію ауксинів, абсцизової кислоти здійснювали етилацетатом, а цитокінінів – *n*-бутанолом. Одержані екстракти очищали і концентрували методом тонкошарової хроматографії, після чого здійснювали кількісне визначення фітогормонів за допомогою скануючого спектроденситометра Сорбфіл (Росія), як стандарт використовували синтетичні фітогормони фірми Sigma-Aldrich (Німеччина) і Acros Organics (Бельгія). Кількість позаклітинних фітогормонів розраховували в мкг/дм³ супернатанту.

Розділ 3. Відходи харчової промисловості як субстрати для синтезу поверхнево-активних речовин *N.vaccinii* ІМВ В-7405. Одним із способів здешевлення технології одержання практично цінних метаболітів у тому числі й ПАР є використання дешевих субстратів, наприклад, відходів харчових виробництв [Makkar, 2011, Thavasi, 2009].

Наші експерименти показали, що використання як джерел вуглецю для культивування *N.vaccinii* ІМВ В-7405 меляси, пересмаженої соняшникової олії і фузів дало змогу підвищити умовну концентрацію ПАР у 2,8–3,6 разів порівняно з культивуванням штаму на очищеному гліцерині.

Відомо, що в деяких випадках, показники синтезу кінцевого продукту залежать від додавання у середовище екзогенних попередників біосинтезу, а також від природи джерела вуглецю для одержання інокуляту.

Наступні експерименти показали, що найвища концентрація ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 спостерігалася за використання посівного матеріалу, вирощеного на мелясі (1,7 г/дм³) та пересмаженій соняшниковій олії (1,8 г/дм³).

Виходячи з хімічної природи ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 (гліколіпіди, основним компонентом яких є трегалозоміколати), ми припустили, що можна підвищити показники їх біосинтезу додаванням у середовище з пересмаженою соняшниковою олією глюкози, а в середовище з мелясою – олії. Дійсно, додавання в середовище з соняшниковою олією 0,05–0,1% глюкози, а в середовище з мелясою 0,05–0,1% соняшникової олії супроводжувалось підвищенням показників синтезу ПАР у 1,3–2,8 разів (табл. 1).

Таблиця 1 – Вплив глюкози на синтез ПАР за умов росту штаму ІМВ В-7405 на пересмаженій соняшниковій олії (2 %)

| Субстрат для одержання інокуляту | Концентрація глюкози, % | Момент внесення глюкози (фаза росту) | Концентрація ПАР, г/дм ³ | |
|----------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Меляса негідролізована | 0,1 | Лаг-фаза | 3,6 ± 0,18 | |
| | | Експоненційна | 4,9 ± 0,24 | |
| | | Стаціонарна | 1,6 ± 0,08 | |
| | 0,05 | Лаг-фаза | 2,6 ± 0,13 | |
| | | Експоненційна | 3,2 ± 0,16 | |
| | | Стаціонарна | 4,3 ± 0,21 | |
| | 0 | Контроль (без глюкози) | 1,9 ± 0,09 | |
| | Пересмажена олія | 0,1 | Лаг-фаза | 3,9 ± 0,19 |
| | | | Експоненційна | 2,4 ± 0,12 |
| Стаціонарна | | | 3,0 ± 0,15 | |
| 0,05 | | Лаг-фаза | 3,1 ± 0,15 | |
| | | Експоненційна | 3,2 ± 0,16 | |
| | | Стаціонарна | 3,8 ± 0,19 | |
| 0 | | Контроль (без глюкози) | 1,7 ± 0,03 | |

Розділ 4. Біоконверсія відходів виробництва біодизелю у поверхнево-активні речовини *N. vaccinii* ІМВ В-7405. Стрімкий розвиток виробництва біодизелю у світі призвів до необхідності вирішення серйозної екологічної проблеми – утилізації побічного продукту (технічного гліцерину). Біодизель одержують переетерифікацією рослинних олій (тваринних жирів) з метанолом або етанолом (на 1 т олії витрачається близько 200 кг спирту) з використанням як каталізатора гідроксиду натрію або калію [Rivaldi, 2012], тому технічний гліцерин містить не більше 60–80 % очищеного, а також солі калію (натрію), залишки жирних кислот, спиртів і воду. Основною проблемою на сьогоднішній день є отримання мікроорганізмів-продуцентів практично цінних метаболітів, стійких до потенційних інгібіторів, що містяться в гліцериновій фракції (метанол, натрієві і калієві солі).

У зв'язку з цим на першому етапі досліджували вплив складових технічного гліцерину на ріст і синтез ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405. Експерименти показали, що додавання в середовище з очищеним гліцерином NaCl (1–4 %) і KCl (1–6 %) супроводжувалося підвищенням синтезу ПАР в 1,5–2 рази порівняно з показниками на середовищі без солей.

Наступні дослідження показали можливість використання модифікованого гліцерину як субстрату для одержання ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 (див. матеріали і методи). У процесі культивування *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на такому модифікованому гліцерині (що містить спирти і хлориди солей) спостерігали збільшення умовної концентрації ПАР на 44–68 % порівняно з показниками на середовищі без спиртів і хлоридів.

У ході подальших експериментів встановлено, що *N.vaccinii* ІМВ В-7405 синтезує ПАР не тільки на модифікованій гліцериновій фракції, а й на технічному гліцерині, причому за таких умов культивування умовна концентрація ПАР була в 1,7 та 3 рази вищою, ніж на модифікованому та очищеному субстраті відповідно. У цих дослідженнях концентрація як модифікованого, так і технічного гліцерину не перевищувала 1–2 %, але оскільки на теперішній час у світі утилізується лише половина утворюваного технічного гліцерину [Samul, 2014], то для ефективного використання такого відходу як субстрату у біотехнології кількість його у середовищі культивування повинна бути максимальною. У зв'язку з цим на наступному етапі підвищували концентрацію технічного гліцерину до 7 – 8 %.

Встановлено, що за умов росту штаму ІМВ В-7405 на середовищі з 4 % технічного гліцерину концентрація ПАР була максимальною і становила 4,2 г/дм³. При підвищенні концентрації субстрату у середовищі до 5–6 % кількість ПАР знижувалась до 2,9–3,8 г/дм³, причому збільшення тривалості процесу культивування продуцента не супроводжувалося зростанням показників синтезу ПАР.

Відомо, що спосіб підготовки посівного матеріалу, у тому числі його концентрація, співвідношення С/Н в середовищі культивування, впливає на ефективність синтезу вторинних метаболітів. У попередніх дослідженнях [Пирог, 2011] концентрація інокуляту становила 10 %. Крім цього, при підвищенні концентрації технічного гліцерину у середовищі культивування штаму не змінювали концентрацію азоту.

Наступні експерименти показали, що збільшення концентрації інокуляту з 10 до 15 % і вмісту джерела азоту в два рази дало змогу реалізувати процес синтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на середовищі з концентрацією технічного гліцерину 8 % (табл.2).

Таблиця 2 – Вплив концентрації джерела азоту в середовищі з технічним гліцерином на синтез ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405

| Концентрація гліцерину, % | Концентрація джерела азоту, г/дм ³ | Концентрація ПАР, г/дм ³ |
|---------------------------|---|-------------------------------------|
| 6 | 0,5 | 2,9±0,14 |
| | 1,0 | 5,0±0,25 |
| 7 | 0,5 | 2,0±0,1 |
| | 1,0 | 5,0±0,25 |
| 8 | 0,5 | 1,8±0,09 |
| | 1,0 | 5,3±0,26 |

Розділ 5. Інтенсифікація синтезу поверхнево-активних речовин *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші субстратів. Одним із підходів до підвищення ефективності біосинтезу ПАР є використання суміші субстратів, що дає змогу уникнути непродуктивних втрат вуглецю і енергії, а також підвищує конверсію вуглецю у практично цінні вторинні метаболіти [Пирог, 2013]. У попередніх

дослідженнях [Пирог, 2013] показано можливість використання суміші ростових субстратів (гексадекан, гліцерин, етанол, глюкоза) для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *N.vaccinii* ІМВ В-7405, причому найвища концентрація ПАР спостерігалася на суміші глюкози і гліцерину. Але для максимальної біотрансформації вуглецю субстратів у ПАР необхідним є встановлення оптимального молярного співвідношення моносубстратів у суміші. Це потребує попереднього здійснення теоретичних розрахунків енергетичних потреб синтезу ПАР і біомаси на енергетично дефіцитному субстраті з наступним визначенням концентрації енергетично надлишкового, що забезпечить «покриття» енергетичних витрат на цей процес. Проведення ж теоретичних розрахунків передбачає знання шляхів метаболізму відповідних моносубстратів у *N.vaccinii* ІМВ В-7405.

Теоретичною основою досліджень з підвищення синтезу вторинних метаболітів на суміші субстратів служить концепція «допоміжного субстрату» запропонована Бабелем [Babel, 1985], в основу якої покладена їх «енергетична» класифікація. Згідно цієї класифікації гліцерин є завжди дефіцитним субстратом, в той час як глюкоза залежно від шляхів її катаболізму може бути енергетично дефіцитним (гліколіз, шлях Ентнера-Дудорова), або енергетично надлишковим (пентозофосфатний цикл).

Дослідження особливостей метаболізму глюкози показало, що у штаму ІМВ В-7405 основним шляхом катаболізму цього субстрату (на відміну від більшості мікроорганізмів) є пентозофосфатний цикл. Катаболізм гліцерину у *N. vaccinii* ІМВ В-7405 до дигідроксиацетонфосфату може здійснюватися двома шляхами: через гліцерин-3-фосфат і через дигідроксиацетон.

Розрахунок енергетичних потреб для синтезу біомаси і ПАР на енергетично дефіцитному гліцерині здійснювали як описано раніше [Pirog, 2012]. При розрахунку оптимального співвідношення концентрацій глюкози і гліцерину було прийнято такі припущення: 1) основним компонентом ПАР є трегалозоміколати; 2) катаболізм глюкози здійснюється у пентозофосфатному циклі; 3) гліцерин залучається до метаболізму через дигідроксиацетон за участю пірролохінолінхінон- і НДМА-залежних алкогольдегідрогеназ і дигідроксиацетонкінази; 4) глюкоза використовується переважно як джерело енергії, а на синтез біомаси і трегалозоміколатів затрачається вуглець гліцерину; 5) міколовою кислотою у складі трегалозоміколатів є 3-гідрокси-2-додеканоїлдокозанова кислота, яка містить 34 атоми вуглецю; 6) співвідношення Р/О рівне 2.

Розрахунки показали, що потреба в АТФ для синтезу біомаси і трегалозоміколату (в розрахунку на моль гліцерину) становить 8 та 2,52 моль АТФ на моль гліцерину. Враховуючи, що у процесі синтезу трегалозоміколатів з гліцерину генерується 2,48 моль АТФ на моль використаного енергетично дефіцитного субстрату [Pirog, 2012], за рахунок глюкози повинно бути отримано $8 - 2,48 = 5,52$ моль АТФ. Для одержання такої кількості енергії потрібно 0,394 моль глюкози. Отже, розраховане молярне співвідношення концентрацій глюкози і гліцерину у середовищі культивування *N.vaccinii* ІМВ В-7405 становить 0,394:1, або 1:2,5. Наступні експерименти показали, що за

молярного співвідношення концентрацій глюкози і гліцерину 1:2,5–1:4, максимально близького до теоретично розрахованого (1:2,5), кількість синтезованих ПАР була в 2,0–2,3 вищою, ніж на моносубстратах. Для встановлення механізмів підвищення синтезу поверхнево-активних речовин на суміші субстратів досліджували активність ферментів біосинтезу ПАР та анаплеротичних шляхів (табл. 3).

Таблиця 3 – Активність ферментів біосинтезу поверхнево-активних речовин і анаплеротичних шляхів у *N.vaccinii* ІМВ В-7405

| Фермент | Активність (нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка) у безклітинних екстрактах, одержаних з клітин, вирощених на | | |
|--|---|---------|----------------------------|
| | гліцерині | глюкозі | суміші гліцерину і глюкози |
| ФЕП-карбоксикіназа | 714±35 | 218±10 | 1250±62 |
| ФЕП-синтетаза | 1042±52 | 623±31 | 1290±64 |
| НАДФ ⁺ -залежна глутаматдегідрогеназа | 394±19 | 427±21 | 417±20 |
| ФЕП-карбоксилаза | 714±35 | 803±40 | 1036±51 |
| Ізоцитратліаза | 0 | 0 | 0 |
| Трегалозофосфатсинтаза | 39±2 | 38±2 | 69±3 |

Встановлено, що за умов росту на суміші гліцерину і глюкози активність ферментів біосинтезу гліколіпідів (ФЕП-карбоксикіназа, ФЕП-синтетаза) і анаплеротичної ФЕП-карбоксилазної реакції була вищою, ніж на моносубстратах. Отже, інтенсифікація синтезу ПАР зумовлена посиленням біосинтезу саме гліколіпідів, оскільки активність аміноліпідів була практично однаковою як на моно- так і на суміші субстратів.

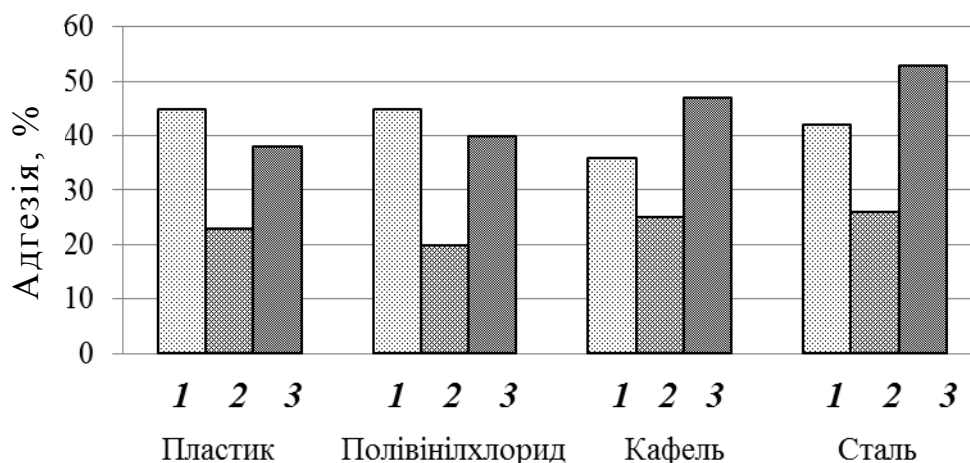
У зв'язку з цим наступні наші експерименти були присвячені дослідженню можливості заміни глюкози і очищеного гліцерину у змішаному субстраті на промислові відходи – технічний гліцерин і мелясу. Експериментально підібрані концентрації меляси (1 %) і технічного гліцерину (8 %) у суміші, а також нітрату натрію (1 г/дм³) в середовищі культивування *N.vaccinii* ІМВ В-7405, за використання яких концентрація ПАР підвищувалася до 13 г/дм³ (табл. 4).

Таблиця 4 – Концентрація ПАР *N.vaccinii* ІМВ В- 7405 за високого вмісту технічного гліцерину у середовищі культивування

| Концентрація в суміші, % | | ПАР, г/дм ³ |
|--------------------------|--------|------------------------|
| Технічного гліцерину | Меляси | |
| 7,0 | 1,0 | 8,7±0,44 |
| 8,0 | 1,0 | 13,0±0,65 |
| 9,0 | 1,0 | 12,3±0,62 |

Розділ 6. Біологічні властивості поверхнево-активних речовин *N.vaccinii* ІМВ В-7405. Мікробна контамінація різних поверхонь є дуже небажаним явищем, оскільки може спричиняти корозію деяких матеріалів, а біоплівка на харчовому обладнанні та медичних матеріалах є джерелом інфекційних захворювань у людей [Udompijitkul, 2013, Gudina, 2010, Hernandez-Delgadillo, 2013].

Встановлено, що за обробки ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 (0,005–0,02 мг/см³) кількість адгезованих клітин *B.subtilis* БТ-2, *E.coli* ІЕМ-1, *C.albicans* Д-6 та *A.niger* Р-3 на лінолеумі, пластику, кахлі, сталі не перевищувала 20–55 % (рис. 1), а при обробці медичних поверхонь (акриловий матеріал та силіконовий базис зубних протезів та урогенітальні катетери) адгезія грамнегативних бактерій *E.coli* ІЕМ-1, *P.vulgaris* ПА-12, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *E.cloacae* С-8, *E.aroideae* Н-3, *Erwinia* sp. ТБ-4 та дріжджів *C.albicans* Д-6 становила 35–85 %.



Концентрація ПАР (мг/см³): 1 – 0,02, 2 – 0,01, 3 – 0,005.

Рисунок 1 – Прикріплення *E.coli* ІЕМ-1 до абіотичних поверхонь після обробки ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405

Завдяки значним перевагам перед синтетичними аналогами мікробні ПАР, можуть бути альтернативою сучасним антибіотикам, оскільки нині особливо гостро стоїть питання про набуту резистентність мікроорганізмів до вже існуючих антибіотиків [Cortés-Sánchez, 2013, Bayani, 2013].

Мінімальні інгібуючі концентрації поверхнево-активних речовин штаму ІМВ В-7405 щодо бактерій становили 11,5–85, дріжджів роду *Candida* – 11,5–22,5, а для мікроміцетів – 165–325 мкг/см³ (табл.5).

Раніше [Pirog, 2012] було показано, що водна фаза, яка залишилася після екстракції поверхнево-активних речовин *N.vaccinii* ІМВ В-7405 з супернатанту культуральної рідини, стимулювала ріст деяких фітопатогенних бактерій. Такі результати дозволили припустити, що штам-продуцент ПАР крім комплексу поверхнево-активних гліколіпідів синтезує ряд інших біологічно активних речовин, зокрема, фітогормонів. Виясненню цього питання були присвячені наші подальші дослідження. Дійсно, наступні експерименти показали, що штам ІМВ В-7405 синтезує ауксини, цитокініни та абсцизову кислоту. Кількість

ауксинів становила 262,3 мкг/дм³, у той час як цитокінінів було значно менше – 29,8 мкг/дм³.

Таблиця 5 – Мінімальна інгібуюча концентрація поверхнево-активних речовин *N.vaccinii* ІМВ В-7405 щодо бактерій, дріжджів і грибів

| Мікроорганізми | Назва | МІК, мкг/см ³ |
|----------------|--|--------------------------|
| Бактерії | <i>B.subtilis</i> БТ-2 (вегетативні клітини) | 11,50 |
| | <i>B.subtilis</i> БТ-2 (спори) | 22,50 |
| | <i>E.cloaceae</i> С-8 | 85,00 |
| | <i>E.aroideae</i> Н-3 | 45,00 |
| | <i>E.coli</i> ІЕМ-1 | 85,00 |
| | <i>P.vulgaris</i> ПА-12 | 45,00 |
| | <i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2 | 85,00 |
| | <i>S.aureus</i> БМС-1 | 85,00 |
| Дріжджі | <i>C.albicans</i> ВІ-4 | 11,50 |
| | <i>C.guilliermondii</i> МК-7 | 22,50 |
| | <i>C.tropicalis</i> РЕ-2 | 22,50 |
| | <i>C.utilis</i> ЕІ-8 | 11,50 |
| Гриби | <i>A.niger</i> Р-3 | 325,00 |
| | <i>F.culmorum</i> Т-7 | 165,00 |

Розділ 7. Технологічна схема одержання поверхнево-активних речовин *N.vaccinii* ІМВ В-7405. На основі одержаних експериментальних даних розроблено технологічну схему одержання поверхнево-активних речовин *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші технічного гліцерину (8 %) та меляси (1 %).

Технологічний процес складається із допоміжних (приготування і стерилізація композицій поживного середовища для одержання інокуляту і біосинтезу, розчину меляси) і основних (вирощування посівного матеріалу на суміші технічного гліцерину (0,25 %) і меляси (0,25 %), біосинтез ПАР) робіт.

Для оцінки економічної ефективності запропонованої технології порівнювали витрати на приготування поживних середовищ для одержання ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 у вигляді культуральної рідини і наявного на ринку препарату «Фітолавін» для двократної обробки ріпаку (станом на листопад 2014 року в Україні вироблено 2,2 млн т насіння ріпаку, площі посівів становили 865,2 тис. га). Розраховано, що витрати на одержання культуральної рідини штаму ІМВ В-7405 становлять 5438 грн, у той час як відомого препарату – 9816 грн. Згідно Інструкції по використанню біопрепарату при постійному застосуванні «Фітолавіну» спостерігали виникнення резистентності бактерій до антибіотику стрептоміцину. Зазначимо, що крім ПАР у постферментаційній культуральній рідині *N.vaccinii* ІМВ В-7405 містяться фітогормони – стимулятори росту рослин.

ВИСНОВКИ

Розроблено економічно вигідну безвідходну технологію одержання поверхнево-активних речовин *N.vaccinii* ІМВ В-7405, першою складовою якої є біотехнологічний спосіб утилізації промислових відходів, а другою – отримання в одному процесі комплексного мікробного препарату з різними біологічними властивостями.

1. Встановлено можливість використання відходів різних виробництв (харчової, виробництва біодизелю і пересмаженої олії) як субстратів для синтезу ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405: умовна концентрація ПАР становила 3,4–9,4 та 7,6 відповідно, що в 1,5–3,5 разів вище, ніж на очищеному гліцерині.

2. Показано, що внесення у середовище з пересмаженою соняшниковою олією і технічним гліцерином екзогенних попередників біосинтезу ПАР (фумарату 0,1 % і цитрату 0,1 %), соняшникової олії (0,05–0,1 %) і глюкози (0,05–0,1 %) супроводжувалося підвищенням синтезу поверхнево-активних речовин в 1,3–2,8 разів, порівняно з показниками на середовищі без попередників.

3. Встановлено, що за умов росту *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші меляси (0,5 % масова частка) з етанолом (0,5 % об'ємна частка) і очищеним гліцерином (0,5 % об'ємна частка) концентрація ПАР була в 1,3–2,7 разів вищою, ніж на відповідних моносубстратах.

4. Встановлено, що основним шляхом катаболізму глюкози є пентозофосфатний цикл (активність НАДФ⁺-залежної 6-фосфоглюконатдегідрогенази 357 ± 17 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹білка), а гліцерину – дигідроксиацетонфосфатний (активність дигідроксиацетонкінази 732 ± 37 нмоль·хв⁻¹·мг⁻¹білка), що дає змогу класифікувати глюкозу як енергетично надлишковий субстрат, гліцерин – як енергетично дефіцитний.

5. Показано, що за молярного співвідношення концентрацій глюкози і гліцерину 1:2,5–1:4, максимально близьких до теоретично розрахованої (1:2,5) кількість синтезованих *N.vaccinii* ІМВ В-7405 ПАР була в 2,0–2,3 рази вищою порівняно з такою на моносубстратах.

6. Встановлено, що підвищення концентрації інокуляту до 15–20 % і підвищення в два рази вмісту нітрату натрію (до 1 г/дм³) дає змогу реалізувати процес синтезу ПАР на середовищі, що містить 8 % технічного гліцерину. За таких умов концентрація поверхнево-активних речовин становила 5,3 г/дм³, що в 3 рази вище ніж на базовому середовищі з аналогічною концентрацією субстратів.

Підвищення концентрації технічного гліцерину до 8 % з 1 % меляси супроводжувалося збільшенням концентрації ПАР до 13 г/дм³.

7. Встановлено, що ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 (0,005–0,05 мг/см³) зменшували ступінь адгезії *E.coli* ІЕМ-1, *B.subtilis* БТ-2, *P.vulgaris* ПА-12, *E.aroideae* Н-3, *E.cloaceae* С-8, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *C.albicans* Д-6, *A.niger* Р-3 до медичних (зубні протези, урогенітальні катетери) та інших абіотичних матеріалів (сталь, кахель, лінолеум, пластик) на 20–85 %.

8. Мінімальні інгібуючі концентрації ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 щодо бактерій (*B.subtilis* БТ-2, *E.coli* ІЕМ-1, *P.vulgaris* ПА-12, *S.aureus* БМС-1, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *E.cloacae* С-8, *E.aroideae* Н-3), дріжджів роду *Candida* і мікроміцетів (*A.niger* Р-3, *F.culmorum* Т-7) становили 11,5–85,0; 11,5–22,5 і 165,0–325,0 мкг/см³ відповідно, що перебуває в межах, визначених для відомих з літератури мікробних ПАР.

9. Теоретичні розрахунки витрат на приготування поживного середовища для отримання постферментаційної культуральної рідини *N.vaccinii* ІМВ В-7405 необхідної для двократної обробки ріпаку (площі посівів становили 865,2 тис. га) становлять 5438 грн, у той час як для одержання відомого препарату «Фітолавін»– 9816 грн, для обробки аналогічної площі засіву культурою ріпака, що свідчить про економічні переваги запропонованої біотехнології.

СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Покора Х.А. Антиадгезивна активність поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* К-8 / Х.А. Покора* // Наукові праці НУХТ. – 2013. – № 48. – С. 75–79.

Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу препаратів поверхнево-активних речовин штаму ІМВ В-7405 в адгезії деяких мікроорганізмів до медичних поверхонь.

2. Покора Х.А. Синтез поверхнево-активних речовин за умов вирощування *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 і *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відходах виробництва / Х.А. Покора *// Наукові праці НУХТ. – 2013. – № 51. – С. 8–13.

Особистий внесок дисертанта: дослідження можливості використання відходів оліє-жирової промисловості, пересмаженої олії, м'яса та молочної сироватки як субстратів для синтезу ПАР.

3. Пирог Т.П. Синтез поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші м'яса з етанолом та гліцерином / Т.П. Пирог, Н.В. Кудря, Х.А. Берегова // Наукові праці НУХТ. – 2014. – Т.20, № 1. – С. 17–23.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на суміші м'яса з етанолом та м'яса з очищеним гліцерином.*

4. Особливості центрального метаболізму *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 – продуцента поверхнево-активних речовин / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, Х.А. Берегова, Н.В. Кудря // Наукові праці НУХТ. – 2014. – Т.20, № 5. – С. 28–34.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження активності ферментів циклу трикарбонових кислот (ЦТК), анаплеротичних і деяких біосинтетичних шляхів у продуцента ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за умов росту на вуглеводних (глюкоза) і неуглеводних (гліцерин) субстратах.*

5. Берегова Х.А. Вплив екзогенних попередників на синтез поверхнево-активних речовин за умов росту *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на

промислових відходах / Х.А. Берегова // Наукові праці НУХТ. – 2015. – Т. 21, № 1. – С. 33–38.

Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу ПАР N. vaccinii IMB B-7405 за умови додавання в середовище з пересмаженою олією і мелясою екзогенних попередників вуглеводної та ліпідної природи.

6. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 на техническом глицерине / Т.П. Пирог, *К.А. Покора, О.Ю. Машенко, Т.А. Шевчук // Мікробіологічний журнал. – 2013. – Т.75, № 4. – С. 13–23. (Наукометрична база SCOPUS).

Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу ПАР N. vaccinii К-8 (IMB B-7405) за умов культивування продуценту на відході виробництва біодизелю.

7. Синтез поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на промышленных отходах / Т.П. Пирог, А.П. Софилканич, *К.А. Покора, Т.А. Шевчук, Г.А. Иутинская // Мікробіологічний журнал. – 2014. – Т.76, № 2. – С. 17–24. (Наукометрична база SCOPUS).

Особистий внесок дисертанта: дослідження здатності штаму IMB B-7405 до синтезу ПАР за використання технічного глицерину та відходів харчової галузі (визначення показників синтезу ПАР, підбір способу підготовки посівного матеріалу).

8. Антиадгезивные свойства поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 / Т.П. Пирог, А.Д. Конон, К.А. Береговая, М.А. Шулякова // Микробиология. – 2014. – Т. 83, № 6. – С. 631–639. (Наукометрична база SCOPUS).

Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу супернатанту культуральної рідини та розчину очищених ПАР в адгезії бактерій, дріжджів та мікроміцетів до медичних матеріалів та абіотичних поверхонь.

9. Антимікробна дія поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 / Т.П. Пирог, Х.А. Берегова, І.В. Савенко, Т.А. Шевчук, Г.О. Іутинська // Мікробіологічний журнал. – 2015. – Т.77, № 6. – С. 2–10. (Наукометрична база SCOPUS).

Особистий внесок дисертанта: дослідження антимікробних властивостей препаратів ПАР, та визначення мінімальних інгібуючих концентрацій розчину очищених поверхнево-активних речовин щодо бактерій, дріжджів та мікроміцетів.

10. Пирог Т.П. Метаболизм глюкозы у продуцента поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, К.А. Береговая // Мікробіологічний журнал. – 2015. – Т. 77, № 5. – С. 2–10. (Наукометрична база SCOPUS).

Особистий внесок дисертанта: визначення активності ключових ферментів метаболізму глюкози у N. vaccinii IMB B-7405.

11. Особливості метаболізму глюкози і гліцеролу у *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, Х.А. Берегова, Н.В. Кудря //

Український біохімічний журнал. – 2015. – Т. 87, № 2. – С. 66–75. (Наукометрична база SCOPUS).

Особистий внесок дисертанта: визначення активності ключових ферментів метаболізму глюкози та гліцерину, а також ферментів циклу трикарбонових кислот, анаплеротичних реакцій та деяких біосинтетичних шляхів.

12. Биоконверсия смеси технического глицерина и мелассы в поверхностно-активные вещества *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 / Т.П. Пирог, Н.В. Кудря, Т.А. Шевчук, К.А. Береговая, Г.А. Иутинская // Мікробіологічний журнал. – 2015. – Т. 77, № 3. – С. 28–35. (Наукометрична база SCOPUS).

Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу ПАР N. vaccinii IMB B-7405 за умов росту продуцента на суміші меляси і технічного гліцерину (відбір оптимальних концентрацій моносубстратів у суміші, дослідження впливу концентрації джерела азоту у середовищі культивування для синтезу ПАР).

13. Синтез фитогормонов продуцентом поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 / Т.П. Пирог, Н.О. Леонова, Т.А. Шевчук К.В. Панасюк, К.А. Береговая, Г.А. Иутинская // Мікробіологічний журнал. – 2015. – Т. 77, № 6. – С. 21–30. (Наукометрична база SCOPUS).

Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу фітогормонів ауксинової, циткінінової природи у процесі росту N. vaccinii IMB B-7405 на гліцерині.

14. Пат. 105975 Україна, МПК С 12 N 1/02 С 12 Р 1/04 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Мащенко О.Ю., *Покора Х.А., Гриценко Н.А.; заявник і патентовласник Національний університет харчових технологій. – № а 201301185; заявл. 10.10.2013; опубл. 10.07.2014, Бюл. №13.

Особистий внесок дисертанта: дослідження можливості використання технічного гліцерину для біосинтезу ПАР штамом IMB B-7405.

15. Пат. 108705 Україна, МПК С 12 N 1/20 С 12 Р 1/04 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Берегова Х.А., Кудря Н.В.; заявник і патентовласник Національний університет харчових технологій. – № а 201402241; заявл. 25.12.2014; опубл. 25.05.2015, Бюл. №10.

Особистий внесок дисертанта: дослідження можливості синтезу ПАР на суміші гліцерину та меляси.

16. Пат. 109074 Україна, МПК С 12 N 1/14 С 12 Р 1/06 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Берегова Х.А., Панасюк К.В.; заявник і патентовласник Національний університет харчових технологій. – № а 201402575; заявл. 10.12.2014; опубл. 10.07.2015, Бюл. №13.

Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу тривалості культивування та моменту внесення олії при культивуванні N. vaccinii IMB B-7405 на технічному гліцерині.

17. Пат. 109825 Україна, МПК С 12 N 1/14 С 12 Р 1/06 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Берегова Х.А., Панасюк К.В.; заявник і патентовласник Національний університет харчових технологій. – № а 201402240; заявл. 25.12.2014; опубл. 12.10.2015, Бюл. №19.

Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу якості інокуляту для біосинтезу ПАР на пересмаженій олії.

18. Пат. 109831 Україна, МПК С 12 N 1/14 С 12 Р 1/06 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Берегова Х.А., Кудря Н.В.; заявник і патентовласник Національний університет харчових технологій. – № а 201403748; заявл. 25.12.2014; опубл. 12.10.2015. Бюл. №19.

Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу концентрацій технічного гліцерину і м'яси у змішаному субстраті на синтез ПАР штамом ІМВ В-7405.

19. Пат. 111045 Україна, МПК С 12 N 1/14 С 12 Р 1/06 Спосіб одержання поверхнево-активних речовин / Пирог Т.П., Берегова Х.А., Никитюк Л.В.; заявник і патентовласник Національний університет харчових технологій. – № а; 201502424 заявл.18.03.2015; опубл. 10.03.2016. Бюл. №5.

Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу співвідношення молярних концентрацій глюкози та гліцерину на синтез ПАР.

20. Intensification of surfactants synthesis under cultivation *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on a mixture of glucose and glycerol / Т.Р. Pirog, Т.А. Shevchuk, К.А. Beregova, N.V. Kudrya // *Biotechnologia Acta*. – 2015. – Vol. 8, N. 6. – P. 23–31.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження можливості підвищення показників синтезу ПАР за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на змішаних промислових відходах.*

21. Бактерії роду *Nocardia* як об'єкти біотехнології / Т.П. Пирог, Д.І. Хом'як, Н.А. Гриценко, А.П. Софілканич, А.Д. Конон, *Х.А. Погора // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Vol. 6, N. 3. – P. 23–35.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження можливості біосинтезу ПАР *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на промислових відходах, а також визначення антимікробних властивостей.*

22. Береговая К. Метаболізм глюкози у продуцента поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 / Кристина Береговая, Надежда Кудря // Актуальные вопросы биомедицинской инженерии: IV всерос. науч. конф. молод. уч., студ. и школ., 15–20 декабря 2014 г.: тезисы докл. – Саратов, 2012. – С. 62–64.

Особистий внесок дисертанта: дослідження активності ферментів катаболізму глюкози.

23. Никитюк Л.В. Биоконверсия подсолнечного масла в поверхностно-активные вещества *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 и *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 / Л.В. Никитюк, И.Ю. Павлюковец, К.А. Береговая // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: XII всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участ., 2–3 декабря 2014 г.: тезисы докл. – Киров, 2014 – Книга 1. – С. 303–306.

*Особистий внесок дисертанта: дослідження закономірностей утворення ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за використання пересмаженої соняшникової олії як джерела вуглецю та енергії.*

24. Антимікробна дія позаклітинних метаболітів *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, *Nocardia*

vaccinii K-8 щодо фітопатогенних бактерій / Х.А. Покора*, К.В. Чеботарьова, А.Д. Конон, А.П. Софілканич, Т.П. Пирог // Молодь та поступ біології: VIII міжнар. наук. конф. студ. та асп., 3–6 квітня 2012 р.: тези доп. – м. Львів, 2012. – С. 246–247.

Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу супернатанту культуральної рідини на виживання деяких фітопатогенних бактерій..

25. *Покора К. Синтез поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 на промышленных отходах / Кристина Покора*, Анна Софилканич // Биосистема: от теории к практике: школа-конф. молод. уч. на базе Инст. фонд. проб. биол. РАН, 24–25 октября 2013 г.: тези док. – Пушино, 2013. – С. 50.

Особистий внесок дисертанта: дослідження здатності штаму ИМВ В-7405 до синтезу ПАР за умов культивування на промислових відходах

26. *Покора Х. А. Влияние препаратов поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 на адгезию микроорганизмов до медицинских материалов / Х. А. Покора* // Молодь та поступ біології: IX міжнар. наук. конф. студ. та асп. приуроч. до 150-річчя від дня народж. акад. В. Вернадського, 16–19 квітня, 2013 р.: тези доп. – м. Львів, 2013. – С. 341–342.

Особистий внесок дисертанта: дослідження дії препаратів ПАР N. vaccinii ИМВ В-7405 на адгезію бактерій та дріжджів до урогенітальних катетерів та зубних протезів.

27. *Покора К. Антимикробная и антиадгезивная активность внеклеточных метаболитов *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 / Кристина Покора*, Татьяна Пирог // 17-я междуна. Пушинская школа - конф. молод. уч., 21 – 26 апреля 2013 г.: тези док. – Пушино, 2013. – С. 40.

Особистий внесок дисертанта: дослідження антимікробних властивостей ПАР N.vaccinii ИМВ В-7405 щодо деяких бактерій.

28. Берегова Х. Адгезия бактерий та дріжджів до різних матеріалів під впливом поверхнево-активных веществ *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 / Христина Берегова, Тетяна Пирог // Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології: IV наук.-прак. конф. з міжнар. уч., 16–17 жовтня 2014 р.: тези доп. – м. Харків, 2014. – С. 44.

Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу препаратів поверхнево-активных веществ в адгезії мікроорганізмів до медичних та абіотичних поверхонь.

29. Пирог Т.П. Біоконверсія відпрацьованої соняшникової олії в мікробні поверхнево-активні речовини мультифункціонального призначення / Т.П. Пирог, Х.А. Берегова, Н.А. Гриценко // XI Укр. біохім. конгр., 6–10 жовтня 2014 р.: тези доп. – м. Київ, 2014. – Vol. 86, № 5 (suppl. 1). – Р. 215.

Особистий внесок дисертанта: дослідження росту і синтезу ПАР N.vaccinii ИМВ В-7405 за умов культивування продуцента на пересмаженій соняшниковій олії, та визначення антимікробних та антиадгезивних властивостей препаратів ПАР щодо деяких бактерій та дріжджів.

30. Берегова Х. Особливості центрального метаболізму *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 – продуцента поверхнево-активных веществ / Христина

Берегова, Надія Кудря // VIII Всеукр. наук.-практ. конф., присвяч. 200-й річ. з дня народж. Т.Г.Шевченка, 25 квітня 2014 р.: тези доп. – м. Київ, 2014. – С. 16.
*Особистий внесок дисертанта: дослідження активності ферментів анаплеротичних і деяких біосинтетичних шляхів у продуцента ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405.*

* – прізвище Покора змінено на Берегова.

АНОТАЦІЯ

Берегова Х.А. Біоконверсія промислових відходів у поверхнево-активні речовини *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний університет харчових технологій МОН України, Київ, 2017.

Дисертаційна робота присвячена розробці технологій поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 з використанням суміші промислових відходів, а також дослідженню практичного використання ПАР для контролю чисельності фітопатогенних бактерій.

Розроблена технологія дає змогу отримати 13 г/дм³ ПАР за умов культивування *N.vaccinii* ІМВ В-7405 на технічному гліцерині (8 %) і мелясі (1 %), підвищення у два рази (до 1 г/дм³) вмісту нітрату натрію у середовищі культивування та використання 10 % інокуляту, вирощеного на суміші технічного гліцерину (0,25 %) і меляси (0,25 %).

Ключові слова: *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, поверхнево-активні речовини, біоконверсія, технічний гліцерин, суміш субстратів.

АННОТАЦИЯ

Береговая К.А. Биоконверсия промышленных отходов в поверхностно-активные вещества *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности – 03.00.20. Национальный университет пищевых технологий МОН Украины, Киев, 2017.

Диссертационная работа посвящена разработке технологии поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 с использованием смеси промышленных отходов (от производства биодизеля и сахара), а также и исследованию практического использования ПАВ в сельском хозяйстве для контроля численности фитопатогенных бактерий.

Разработанная технология позволяет получить до 13 г/дм³ ПАВ при культивировании *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на техническом глицерине (8 %) и мелассе (1 %), использовании 10 % инокулята, выращенного на смеси этих субстратов, увеличение в два раза концентрации нитрата натрия в среде культивирования.

Показано, что минимальные ингибирующие концентрации (МИК) ПАВ *N.vaccinii* ІМВ В-7405 по отношению к исследуемым бактериям, дрожжам и микромицетам составляли 11,5–85,0; 11,5–22,5 и 165,0–325,0 мкг/см³

соответственно. Адгезия клеток бактерий, дрожжей и микромицетов на медицинских и абиотических поверхностях, обработанных препаратами ПАВ, составляла 15–80 % по сравнению с необработанными поверхностями.

Ключевые слова: *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, поверхностно-активные вещества, биоконверсия, технический глицерин, смесь субстратов.

SUMMARY

Beregova K.A. Bioconversion of industrial waste by surface-active substances *Nocardia vaccinii* IMV B-7405. – Manuscript.

Dissertation for the degree of Candidate of Technical Sciences in speciality 03.00.20 – Biotechnology. – National University of Food Technologies, the MES of Ukraine, Kyiv, 2017.

The dissertation thesis is devoted to a development of technology of surface-active substances (surfactants) synthesized by *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 using a mixture of industrial waste, such as crude glycerol and molasses, and to investigation of practical use of surfactants.

Production of surfactants is highly promising direction in the industry, since such connections have several advantages over synthetic analogs. Surfactants are widely used in various industries (environmental technologies, food processing, agriculture, medicine).

The oil-oxidizing bacteria were isolated from the oil-polluted samples of soil and identified as *Nocardia vacinii* K-8 (IMV B-7405). The ability of these strain to synthesize the metabolites with surface-active and emulsifying properties was determined during the cultivation in medium with hydrophobic (*n*-hexadecane, liquid paraffin) and hydrophilic (glucose, ethanol) substrates was established in previous studies. It was also determined that the chemical composition of surfactants synthesized by *N. vaccinii* K-8 on pure glycerol was a complex of neutral, glyco- and aminolipids. Glycolipids represented by trehalosediacylates and trehalosemycolates. Was showed that biosurfactant preparations of strain IMV B-7405 were effective against phytopathogenic bacteria.

The possibility of replacing of pure glycerol for the surfactant biosynthesis by *N.vaccinii* IMV B-7405 with industry food waste (oil and fat industry, sugar, dairy industry, fried sunflower oil) was established. Thus, cultivation of *N.vaccinii* IMV B-7405 on fried sunflower oil and molasses was accompanied by increase of conditional concentrations of surfactants to 9.4 and 7.7 respectively compared with indexes on traditional substrate (pure glycerol). Adding 0.1 % glucose into medium with fried sunflower oil (2 %) in exponential growth phase of *N. vaccinii* IMB B-7405 and using inoculum grown on molasses, was accompanied by increase concentrations of biosurfactants in 2.6 times compared with cultivation without precursors. It was established that after addition of 0.05 % fried sunflower oil into medium with molasses (2 %) and using inoculum grown on oil contained medium the amount of synthesized surfactants increased by 2.8 times in comparison with those without oil.

The next it was showed that concentration of surfactants under cultivation of *N.vaccinii* IMB B-7405 in crude glycerol was higher by 3 times as compared to that

in a medium containing pure glycerol. Adding low (0.05–0.1 %) concentration exogenous precursors (fumarate and citrate, glucose, sunflower oil) into medium with crude glycerol (4 %) allowed to increase synthesis rates of surfactants more by 17–44 %.

It was established that the increasing concentration of inoculum from 10 to 15 % and sodium nitrate to 2-fold in medium cultivation of *N.vaccinii* IMB B-7405 allowed to increase to 8.0 % content of crude glycerol. Under these conditions, the concentration of surfactants was 5.3 g/dm³, which is 3 times higher than the base medium with the same concentration of substrates. Activity of key enzymes of glucose and glycerol metabolism, tricarboxylic acid cycle, anaplerotic reactions and some biosynthetic pathways was determined in cells of *N.vaccinii* IMV B-7405. It has been established that glucose catabolism is performed through pentose phosphate cycle. Glycerol catabolism to dihydroxyacetonephosphate (the intermediate of glycolysis) may be performed in two ways: through glycerol-3-phosphate and through dihydroxyacetone. Replenishment of the C₄-dicarboxylic acids pool in *N.vaccinii* IMV B-7405 grown on glucose and glycerol occurs in the phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylase reaction (714–803 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ of protein). The observed activity of both key enzymes of gluconeogenesis (PEP-carboxykinase and PEP synthase), trehalose phosphate synthase and NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase confirmed the ability of IMV B-7405 strain to the synthesis of surface active glyco- and aminolipids respectively.

One approach of improving surfactants biosynthesis is the combination of unequal energy substrates, avoiding unnecessary loss of carbon and energy, and increasing the conversion of carbon in biomass or practically valuable secondary metabolites. The possibility of intensification of surfactant synthesis in *N.vaccinii* IMV B-7405 on mixed substrates was investigated (molasses and pure glycerol, molasses and ethanol). Found that conventional surfactant concentration on mixed substrates was 1.3–2.7 times higher in comparison with the corresponding monosubstrates. The possibility of replacing pure glycerol in mixed substrates with molasses on crude glycerol (by-product of biodiesel production) was established. Under cultivation of *N.vaccinii* IMV B-7405 in mixed substrates using 1 % molasses and 8 % crude glycerol and also 1 g/dm³ sodium nitrite were observed increased of surfactants concentrations to 13 g/dm³.

We have shown that *N.vaccinii* IMB B-7405 surfactant can be used for development of effective preparations decreasing the adhesion of microorganisms on the surface. Thus, treatment with the surfactants from strain IMB B-7405 (0.005–0.05 mg/ml) various surfaces (catheters, dentures, plastic, polyvinyl chloride, tiles, and steel) was accompanied by decrease adhesion of bacteria, yeast and micromycetes by 20–85 %. We also studied the antimicrobial properties of biosurfactants. It is shown that the antimicrobial activity of *N. vaccinii* IMV B-7405 surfactant depended on the degree of purification (supernatant, solution of surfactant), concentration and exposure. Survival of *Escherichia coli* IEM-1 and *Bacillus subtilis* BT-2 (both vegetative cells and spores) after treatment for 1–2 hours with surfactants solution and the supernatant (the surfactant concentration 21 mg/ml) was 3–28%. Minimum inhibitory concentrations of *N.vaccinii* IMV B-7405 surfactants on studied bacteria,

yeast and micromycetes were 11.5–85.0; 11.5–22.5 and 165.0–325.0 μ /ml respectively. Minimum inhibitory concentrations of *N.vaccinii* IMV B-7405 surfactants are comparable to those of the known microbial surfactants.

A technological scheme of surfactants' biosynthesis by *N.vaccinii* IMV B-7405 on medium with mixed substrates (crude glycerol 8 % and molasses 1 %) was designed. It consists of auxiliary work (preparing and sterilization of nutrient medium for inoculum obtaining and biosynthesis process) and major works (growing of inoculum and biosynthesis). It was found that the costs of preparation of post-fermentative cultural liquid of *N.vaccinii* IMV B-7405 were lower almost double while in the case of preparation with «Phytolavin».

Keywords: *Nocardia vaccinii* IMV B-7405, bioconversion, surfactants, waste of biodiesel production, mixture of substrates.