

PECULIARITIES OF SURFACTANTS SYNTHESIS BY *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 ON REFRIED SUNFLOWER OIL

T. Pirog, I. Pavliukovets, I. Savenko
National University of Food Technologies

Key words:

Acinetobacter calcoaceticus IMV B 7241
Waste (fried) sunflower oil
Way of preparing the inoculum
Surfactants

Article history:

Received 03.04.2016
Received in revised form
12.05.2016
Accepted 24.05.2016

Corresponding author:

T. Pirog
E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The dependence of surfactants synthesis by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on refried sunflower oil on the oil "quality" (waste after frying meat, french fries or peasant-style potatoes), the concentration and nature of the carbon source in the medium for the inoculum obtaining was established. The highest indices of surfactant synthesis on the all studied substrates were observed while inoculum grown on corresponding refried oil was used. The maximum concentration of surfactant (8.5 ± 0.42 and 7.9 ± 0.39 g/L) was achieved under cultivation of IMV B-7241 strain on waste oil after frying meat (4 %) and peasant-style potatoes (6 %), respectively. Using refried oils for the surfactants biosynthesis reduces the cost of the final product and allows to utilize toxic wastes.

ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 НА ПЕРЕСМАЖЕНІЙ СОНЯШНИКОВІЙ ОЛІЇ

Т.П. Пирог, І.Ю. Павлюковець, І.В. Савенко
Національний університет харчових технологій

У статті встановлено залежність синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 на пересмаженій соняшниковій олії від якості олії (відпрацьована після смаження м'яса, картоплі «фрі» або селянської), її концентрації та природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту. Найвищі показники синтезу ПАР на всіх досліджуваних субстратах спостерігалися у разі використання посівного матеріалу, вирощеного на відповідній пересмаженій олії. Максимальна концентрація ПАР ($8,5 \pm 0,42$ і $7,9 \pm 0,39$ г/л) досягалася під час культивування штаму IMV B-7241 на відпрацьованій після смаження м'яса (4 %) і картоплі селянської (6 %) олії. Використання пересмажених олій для біосинтезу ПАР дасть змогу знизити собівартість кінцевого продукту й утилізувати токсичні відходи.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, відпрацьована соняшниковіа олія, спосіб підготовки інокуляту. поверхнево-активні речовини.

Постановка проблеми. Необхідність утилізації значної кількості так званих харчових відходів (food waste), які утворюються як у процесі переробки сільськогосподарської продукції, так і в домашніх господарствах є надзвичайно важливою проблемою сьогодення [1]. Щорічно тільки індустріальні країни Азії (Японія, Китай, Корея) генерують 357 млн т таких відходів, країни Європи — 205 млн тонн. Близько 38 % відходів, до яких належать і пересмажені рослинні олії, утворюється в процесі обробки харчових продуктів [2]. Одним із варіантів утилізації харчових відходів може бути екстракція з них і повторне використання практично цінних речовин (білків, полісахаридів, харчових волокон тощо) [2]. Останніми роками стала з'являтися інформація про використання пересмажених рослинних олій для одержання біодизелю [3].

Проте найпоширенішим і найефективнішим способом утилізації відпрацьованих олій є використання їх як субстратів у біотехнологічних процесах, зокрема для одержання мікробних поверхнево-активних речовин. У праці [4] зазначається, що на теперішній час близько 50 % літературних даних щодо біоконверсії промислових відходів у мікробні ПАР стосується біосинтезу цих продуктів на основі саме олієвмісних субстратів. Перевагою використання таких субстратів є не лише їхня низька вартість, а й те, що у більшості випадків немає необхідності внесення в поживне середовище додаткових компонентів або факторів росту, оскільки олієвмісна сировина містить значну кількість життєво важливих нутрієнтів.

Раніше [5] нами було встановлено можливість заміни рафінованої соняшникової олії на відпрацьовану після смаження картоплі та м'яса для синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. Слід зазначити, що пересмажена олія, утворювана в значних кількостях у закладах громадського харчування, є одним з найдешевих олієвмісних відходів [6, 7]. Після використання олія змінює свій склад і містить понад 30 % полярних сполук, що залежить від типу приготовленої страви, способу смаження та кратності використання олії [8].

У попередніх дослідженнях [1] для одержання ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на відпрацьованій олії використовували посівний матеріал, вирощений на рафінованій олії. У той же час відомо, що з метою скорочення тривалості лаг-фази в біотехнологічних процесах одержання інокуляту і цільового продукту доцільно здійснювати на середовищі з одним і тим самим джерелом вуглецю й енергії [9]. Однак не завжди пересмажена олія є якісним субстратом через наявність в її складі потенційних інгібіторів росту та синтезу мікробних метаболітів [8]. Так, показники синтезу мікробного полісахариду етаполану на відпрацьованій після смаження м'яса та картоплі олії були найвищими у разі вирощування інокуляту на рафінованій олії [10].

Мета статті. Дослідити можливість використання посівного матеріалу, вирощеного на пересмаженій (відпрацьованій) олії, для біосинтезу поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на цьому субстраті.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень був штам *Acinetobacter calcoaceticus* K-4, зареєстрований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України за номером IMB B-7241.

Штам *A. calcoaceticus* IMB B-7241 вирощували в рідкому поживному середовищі (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 % (об'ємна частка). Розчин мікроелементів містив (г/100 мл): $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,1; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ — 0,6; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,004; $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,03; H_3BO_3 — 0,006; KI — 0,0001; ЕДТА (трилон Б) — 0,5.

Як джерело вуглецю використовували рафіновану соняшникову олію «Стожар» (компанія Кернел, Київ), а також відпрацьовану після смаження картоплі та м'яса (мережа ресторанів швидкого харчування McDonald's Київ) олію у концентрації 4 і 6 % (об'ємна частка). У разі використання субстратів концентрацією 6 % вміст $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ у середовищі підвищували до 1,35 г/л.

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на мелясі (0,5 % за вуглеводами), рафінованій або відпрацьованій соняшниковій олії (0,5 % об'ємна частка). Кількість посівного матеріалу (10^4 — 10^5 клітин/мл) становила 10 % від об'єму поживного середовища. Культивування здійснювали в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалках (320 об/хв) при 28—30 °С упродовж 120 год.

Кількість синтезованих позаклітинних ПАР (г/л) встановлювали ваговим методом після екстракції із супернатанту культуральної рідини сумішшю Фолча (хлороформ і метанол, 2:1), як описано у [5]. Для одержання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 g упродовж 20 хв. Залишки соняшникової олії з культуральної рідини видаляли шляхом трикратної екстракції петролейним ефіром (співвідношення 1:1).

Індекс емульгування (E_{24} , %) нативної та розбавленої в 10 і 50 разів культуральної рідини аналізували з використанням як субстрату для емульгування рафінованої соняшникової олії: до 2 мл культуральної рідини додавали 2 мл олії й струшували упродовж 2 хв. Визначення індексу емульгування проводили через 24 год як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини в пробірці і виражали у відсотках.

Усі досліди проводили в трьох повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3—5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали, як описано у [5]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати і обговорення. У табл. 1 наведено показники синтезу поверхнево-активних речовин за умов росту *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на відпрацьованій після смаження м'яса та картоплі олії з використанням посівного матеріалу, вирощеного на різних вуглецевих субстратах. Наведені результати підтверджують одержані раніше дані про те, що відпрацьована після смаження м'яса соняшникова олія є більш придатним субстратом для синтезу ПАР штамом IMB B-7241, ніж після смаження картоплі. Так, незалежно від природи джерела вуглецю у середовищі для одержання інокуляту (меляса, рафінована чи відповідна відпрацьована олія) концентрація ПАР та індекс емульгування культуральної рідини після вирощування *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на відпрацьованій після смаження м'яса олії були вищими, ніж аналогічні показники за умов росту бактерій на відпрацьованій після смаження картоплі олії (табл. 1).

*Таблиця 1. Вплив якості інокуляту на синтез ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на відпрацьованій олії (4 %)*

| Джерело вуглецю у середовищі для одержання інокуляту | Відпрацьована олія у середовищі для біосинтезу ПАР | Концентрація ПАР, г/л | Індекс емульгування розбавленої у 50 разів культуральної рідини, % |
|--|--|-----------------------|--|
| Рафінована олія | після смаження картоплі | 3,9±0,19 | 42 |
| | після смаження м'яса | 4,5±0,22 | 54 |
| Меляса | після смаження картоплі | 1,5±0,08 | 45 |
| | після смаження м'яса | 2,8±0,14 | 49 |
| Відпрацьована після смаження картоплі олія | після смаження картоплі | 5,0±0,25 | 50 |
| Відпрацьована після смаження м'яса олія | після смаження м'яса | 8,5±0,42 | 54 |

Примітка. При визначенні індексу емульгування похибка не перевищувала 5 %. У дослідженнях використовували відпрацьовану після смаження картоплі «фрі» олію.

Одержані результати можна пояснити таким чином: з літератури [8, 11] відомо, що у процесі смаження в олії відбуваються хімічні реакції окиснення, гідролізу, ізомеризації та полімеризації, в результаті яких утворюються вільні жирні кислоти, низькомолекулярні спирти, альдегіди, кетони, лактони, вуглеводні, моно- та дигліцериди, транс-ізомери тощо. Слід зауважити, що ступінь ненасиченості жирних кислот є основним фактором, що впливає на окиснювальну стабільність олії [11]. Рослинні олії з вищим вмістом поліненасичених жирних кислот (соняшникова, льняна) окиснюються швидше, ніж ті, що містять мононенасичені кислоти (оливкова), і саме у процесі смаження картоплі «фрі» у фритюрниці на соняшниковій олії утворюється найбільша кількість токсичних альдегідів [12], які можуть бути інгібіторами синтезу ПАР. Варто зазначити, що показники синтезу полісахариду етаполану на відпрацьованій після смаження картоплі були також нижчими, ніж на олії після смаження м'яса [11].

Враховуючи величезну кількість утвореної пересмаженої олії, а також той факт, що викиди її в навколишнє середовище в Україні не регламентуються, стає зрозумілим, що для ефективного використання таких відходів, як субстрати у біотехнологічних процесах їх вміст у середовищі культивування продуцентів практично цінних мікробних метаболітів повинен бути якомога вищим, тому на наступному етапі концентрацію пересмаженої олії у середовищі вирощування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 підвищували до 6 %. У цих дослідженнях посівний матеріал вирощували на відповідній відпрацьованій олії. Крім того, беручи до уваги літературні дані про те, що склад пересмаженої олії залежить від типу приготовленої страви, способу смаження та кратності використання олії [8], як субстрат для біосинтезу ПАР додатково до пересмажених олій, які використовували раніше, залучили відпрацьовану після смаження картоплі селянської олію (табл. 2).

Одержані експериментальні дані виявилися дещо неочікуваними. Так, концентрація ПАР, синтезованих штамом IMB В-7241 на середовищі з 6 %

відпрацьованої після смаження картоплі селянської олії була вищою, ніж за використання аналогічної концентрації відпрацьованій після смаження м'яса олії (7,9 і 6,5 г/л відповідно). Крім того, підвищення концентрації олії у середовищі культивування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 до 6 % не супроводжувалося збільшенням показників синтезу ПАР, що можна пояснити наявністю вищих концентрацій токсичних для продуцента речовин за таких умов вирощування. Слід також зазначити, що наведені у табл. 2 результати підтверджують літературні дані про вплив технології приготування і типу страви на склад пересмаженої олії і свідчать про необхідність врахування якості відпрацьованої олії у процесі розробки тієї чи іншої біотехнології з використанням її як субстрату.

Таблиця 2. Синтез поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на відпрацьованій соняшниковій олії

| Олія як субстрат | Концентрація олії у середовищі, % | ПАР, г/л |
|--|-----------------------------------|----------|
| Рафінована | 4 | 3,4±0,17 |
| | 6 | 3,5±0,17 |
| Відпрацьована після смаження картоплі «фрі» | 4 | 5,0±0,25 |
| | 6 | 3,8±0,19 |
| Відпрацьована після смаження картоплі селянської | 4 | Н.в. |
| | 6 | 7,9±0,39 |
| Відпрацьована після смаження м'яса | 4 | 8,5±0,42 |
| | 6 | 6,5±0,32 |

Примітки. Інокулят вирощували на відповідній відпрацьованій олії. Н.в. — не визначали.

Подальші експерименти показали, що індекс емульгування як нативної, так і розбавленої у 10 і 50 разів культуральної рідини після вирощування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на відпрацьованій після смаження м'яса та картоплі селянської олії був дещо вищим, ніж на відпрацьованій після смаження картоплі «фрі» (50—64 і 49—56 % відповідно) (табл. 3).

Таблиця 3. Індекс емульгування культуральної рідини за умов росту *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на відпрацьованій олії (6 %)

| Відпрацьована олія у середовищі культивування | E ₂₄ (%) культуральної рідини | | |
|---|--|-----------------------|-----------------------|
| | нативної | розведеної у 10 разів | розведеної у 50 разів |
| Після смаження картоплі «фрі» | 56 | 51 | 49 |
| Після смаження картоплі селянської | 64 | 54 | 50 |
| Після смаження м'яса | 63 | 55 | 53 |

Примітка. При визначенні індексу емульгування похибка не перевищувала 5 %. Посівний матеріал вирощений на відповідній відпрацьованій олії.

Показники синтезу ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на пересмаженій олії є порівнянними з даними літератури. Так, у [13] досліджували синтез рамноліпідів у процесі вирощування *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 на середовищі з пересмаженими харчовими оліями. За таких умов культивування

штам продукував 2,8—7,5 г/л ПАР. Інші дослідники показали, що *Bacillus pumilus* CCT2487 на середовищі з пересмаженою соняшниковою олією (5 %) синтезував 5,7 г/л ПАР [14]. У [15] досліджувався вплив різних концентрацій пересмаженої соняшникової олії (з ресторану швидкого харчування) на синтез ПАР штамом *P. aeruginosa* USM-AR2. У процесі культивування штаму в колбах на середовищі з 18,4 г/л олії концентрація ПАР становила 4,7 г/л. Підвищення концентрації пересмаженої олії до 27,6 г/л призводило до зниження в 1,2 раза кількості синтезованих ПАР.

Висновки

У результаті проведеного дослідження доведено можливість використання відпрацьованої після смаження картоплі і м'яса олії як субстрату для вирощування посівного матеріалу та біосинтезу поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241. Перевагою відпрацьованих рослинних олій як субстратів для отримання практично цінних мікробних продуктів порівняно з іншими промисловими відходами, є те, що вони не вимагають попередньої обробки (на відміну, наприклад, від лігноцелюлозних комплексів, молочної сироватки, технічного гліцерину) і стерилізації, до того ж містять додаткові поживні речовини. Крім того, такі субстрати є надзвичайно дешевими і доступними у великих кількостях для використання в мікробних технологіях.

Заміна традиційних субстратів для біосинтезу ПАР відходами промислових виробництв дозволить знизити собівартість технології в кілька разів, а також утилізувати непотрібні відходи і вирішити проблему зберігання або знешкодження значної маси відходів, на що витрачається величезна кількість енергії і засобів.

Література

1. Pleissner D., Lin C. Valorisation of food waste in biotechnological processes // Sustainable Chemical Processes. — 2013. — Vol. 1. — doi:10.1186/2043-7129-1-21.
2. Baiano A. Recovery of biomolecules from food wastes — a review // Molecules. — 2014. — Vol. 19, # 9. — P. 14821—14842. doi: 10.3390/molecules190914821.
3. Hossain A., Aleissa M. Biodiesel fuel production from palm, sunflower waste cooking oil and fish byproduct waste as renewable energy and environmental recycling process // British Biotechnol. J. — 2016. — Vol. 10. — # 4. — P. 1—9. doi: 10.9734/BBJ/2016/22338.
4. Banat I.M., Satpute S.K., Cameotra S.S., Patil R., Nyayanit N.V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production // Front. Microbiol. — 2014. — Vol. 5. — doi: 10.3389/fmicb.2014.00697.
5. Павлюковець І.Ю. Біоконверсія пересмаженої соняшникової олії в поверхнево-активні речовини *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 / І.Ю. Павлюковець, Т.П. Пирог // Наукові праці Національного університету харчових технологій. — 2016. — Т. 22. — № 2. — С. 54—59.
6. Пирог Т.П. Біосинтез поверхнево-активних речовин на промислових відходах / Т.П. Пирог, А.П. Софілканич, А.Д. Конон, Н.А. Гриценко // Biotechnologia Acta. — 2014. — Vol. 7. — # 5. — P. 9—26.
7. Xia W.J., Luo Z.B., Dong H.P., Yu L., Cui Q.F., Bi Y.Q. Synthesis, characterization, and oil recovery application of biosurfactant produced by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 using waste vegetable oils // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2012. — Vol. 166, # 5. — P.1148—1166.

8. Zhang Q., Saleh A.S., Chen J., Shen Q. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: A review // Chemistry and Physics of Lipids. — 2012. — Vol. 165, # 6. — P. 662—681.
9. Підгорський В.С. Интенсифікація технологій мікробного синтезу / В.С. Підгорський, Г.О. Іугинська, Т.П. Пирог. — Київ: Наук. думка, 2010. — 328 с.
10. Івахнюк М. Вплив способу підготовки посівного матеріалу на синтез полісахариду етаполану на олієвмісних субстратах / М. Івахнюк, Т.П. Пирог // Наукові праці національного університету харчових технологій. — 2015. — Т. 21, № 5. — С. 17—21.
11. Bordin K., Kunitake M. T., Aracava K. K., Trindade C. S. F. Changes in food caused by deep fat frying — A review // Archivos Latinoamericanos de Nutrición. — 2013. — Vol. 63, # 1. — P. 5—13.
12. Guillén M. D., Uriarte P. S. Aldehydes contained in edible oils of a very different nature after prolonged heating at frying temperature: Presence of toxic oxygenated α,β unsaturated aldehydes // Food Chemistry. — 2012. — Vol. 131, # 3. — P. 915—926.
13. Wadekar S.D., Kale S.B., Lali A.M., Bhowmick D.N., Pratap A.P. Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source // Prep. Biochem. Biotechnol. — 2012. — Vol. 42, # 4. — P. 249—266.
14. Oliveira J.G., Cruz C.H.G. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources // Brazilian Archives of Biology and Technology. — 2013. — Vol. 56, # 1. — P. 155—160.
15. Zainatul A.S., Yusof S.Z., Asshifa M.S. Fed-batch production of valuable biosurfactant, rhamnolipid, from waste cooking oil by indigenously isolate *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2 // Advances in Environmental Biology— 2014. — Vol. 8, # 14. — P. 33—38.

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241 НА ПЕРЕЖАРЕННОМ ПОДСОЛНЕЧНОМ МАСЛЕ

Т.П. Пирог, И.Ю. Павлюковец, И.В. Савенко
Национальный университет пищевых технологий

*В статье установлена зависимость синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 на пережаренном подсолнечном масле от качества масла (отработанное после жарки мяса, картофеля «фри» или крестьянского), его концентрации и природы источника углерода в среде для получения инокулята. Наиболее высокие показатели синтеза ПАВ на всех исследуемых субстратах наблюдались при использовании посевого материала, выращенного на соответствующем пережаренном масле. Максимальная концентрация ПАВ ($8,5 \pm 0,42$ и $7,9 \pm 0,39$ г/л) достигалась при культивировании штамма ИМВ В-7241 на отработанном после жарки мяса (4 %) и картофеля крестьянского (6 %) масле. Использование пережаренных масел для биосинтеза ПАВ позволит снизить себестоимость конечного продукта и утилизировать токсичные отходы.*

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, отработанное подсолнечное масло, способ подготовки инокулята, поверхностно-активные вещества.