

# BIOCONVERSION OF SUNFLOWER OIL INTO SURFACTANTS OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 AND *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405

I. Pavlyukovets, L. Nikityuk, K. Beregovaya, T. Pirog  
National University of Food Technologies

Key words:	ABSTRACT
Acinetobacter Calcoaceticus IMV B-7241, Nocardia vaccinii IMV B-7405, oil-containing substrate, microbial surfactants	The possibility of increasing biosurfactants synthesis under cultivation of Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241 and Nocardia vaccinii IMV B-7405 on sunflower oil was studied.
<b>Article history:</b> Received 1.11.2014 Received in revised form 10.11.2014 Accepted 20.11.2014	It was established that increasing the concentration of sunflower oil in basic medium for IMV B-7405 and IMV B-7241 strains cultivation from 2 to 5 % was accompanied by decrease of biosurfactants synthesis. However, increasing urea in 3—4 times (up 1,0—1,35 g/l) allowed to increase the amount of biosurfactants synthesized by A. calcoaceticus IMV B-7241 in the medium containing 6—7 % of sunflower oil up to 9,2—11,2 g/l, that almost 2—2.5 times higher than in the basic medium with the lower concentration of the carbon and nitrogen sources.
<b>Corresponding author:</b> skrotska@ya.ru	The obtained results indicate the possibility of biosurfactants synthesis under A. calcoaceticus IMV B-7241 and N. vaccinii IMV B-7405 cultivation in the medium with a high content of sunflower oil.

## БІОКОНВЕРСІЯ СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ В ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 І *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405

І.Ю. Павлюковець, студ., Л.В. Никитюк, студ.®  
Х.А. Берегова, асп., Т.П. Пирог, д-р біол. наук  
Національний університет харчових технологій

Показано можливість використання соняшникової олії як субстрату для біосинтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter Calcoaceticus* IMB B-7241 і *Nocardia Vaccinii* IMB B-7405. Встановлено, що збільшення концентрації соняшникової олії у базовому середовищі культивування штамів IMB B-7405 та IMB B-7241 з 2 до 5 % супроводжувалося зниженням показників синтезу ПАР. Проте підвищення вмісту сечовини в 3—4 рази (до 1,0—1,35 г/л) дало змогу збільшити кількість поверхнево-активних речовин, синтезованих *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 на середовищі з 6—7 % соняшникової олії, до 9,2—11,2 г/л, що майже в 2—2,5 рази вище, ніж на базовому середовищі з нижчою концентрацією джерел вуглецевого і азотного живлення.  
**Ключові слова:** *Acinetobacter Calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia Vaccinii* IMB B-7405, олієвмісний субстрат, мікробні поверхнево-активні речовини.

На сьогодні синтетичні поверхнево-активні речовини (ПАР) є лідерами на ринку хімічних сполук. Вони використовуються в різних галузях промисловості, медицині та сільському госпо-

дарстві. Щорічно у світі виробляється близько 13 млн т синтетичних ПАР [1]. Проте істотним їх є токсичність і стійкість до біологічної деструкції. Альтернативною заміною синтетичним ПАР можуть стати мікробні поверхнево-активні речовини, позбавлені цих недоліків [1, 3].

ПАР мікробного походження характеризуються постійними властивостями в широкому діапазоні температури і рН, а також їх можна отримувати з різних промислових відходів [1—4]. Раніше [4—6] із забруднених нафтою зразків ґрунту було виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter Calcoaceticus* IMB B-7241 і *Nocardia Vaccinii* IMB B-7405 та встановлено їх здатність синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями на вуглеводневих і гідрофільних (етанол, гліцерин) субстратах. Однак, на сьогоднішній день перспективними субстратами для отримання мікробних ПАР є різні рослинні олії, в тому числі й відпрацьовані (пересмажені) [1—3]. Так, *Candida bombicola* ATCC22214 і *Candida antarctica* синтезували 15,25 і 13,86 г/л софороліпідів на середовищі, що містило олію ятрофи (100 г/л) і соєву олію (65 г/л) відповідно [1, 2]. Культивування *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 на середовищі з соняшниковою олією (3,5 %) супроводжувалося утворенням 4,07 г/л ПАР [3].

У той же час нам не вдалося знайти в літературі відомостей про синтез ПАР на олієвмісних субстратах бактеріями родів *Acinetobacter* і *Nocardia*.

У роботі [7] ми встановили можливість синтезу поверхнево-активних речовин *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. Vaccinii* IMB B-7405 на відходах олійно-жирової промисловості (фузи).

Зазначимо, що в Україні викиди відпрацьованої соняшникової олії в навколишнє середовище не регламентуються, а одним з шляхів утилізації цього токсичного відходу є використання його як субстрату в біотехнологічних процесах. У зв'язку з викладеним вище мета даної роботи — дослідити можливість синтезу ПАР *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. Vaccinii* IMB B-7405 на соняшниковій олії.

Матеріали та методи. Об'єкти дослідження — штами *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. Vaccinii* IMB B-7405, зареєстровані в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України.

Штам *A. calcoaceticus* IMB B-7241 культивували на рідкому поживному середовищі (г/л):  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  — 0,35;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{NaCl}$  — 1,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 0,6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 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;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  — 0,006;  $\text{KI}$  — 0,0001; ЕДТА (трилон Б) — 0,5.

*N. vaccinii* IMB B-7405 культивували на середовищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  — 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,1;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,01. Додатково в середовище вносили дріжджовий автолізат (0,5 %, об'ємна частка).

Як джерело вуглецю використовували соняшкову олію в концентрації 2—7 % (за об'ємом). В одному з варіантів у середовищі культивування збільшували вміст джерела азоту в 2—3 рази для *N. Vaccinii* IMB B-7405 та в 2—4 рази для *A. Calcoaceticus* IMB B-7241.

Як посівний матеріал використовували культури з експоненційної фази росту, вирощені на відповідних рідких середовищах, що містили 1% (масова частка за вуглеводами) меляси як джерела вуглецю. Зазначимо, що з метою скорочення тривалості лаг-фази в біотехнологічних процесах використовують однакові субстрати [8] як в середовищі для отримання інокуляту, так і біосинтезу цільового продукту. Проте раніше [4] було показано, що використання інокуляту, вирощеного на мелясі, супроводжувалося підвищенням синтезу ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. Vaccinii* IMB B-7405 на олієвмісних субстратах.

Кількість посівного матеріалу 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.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками: умовна концентрація ПАР (ПАР\*, безрозмірна величина), а також кількість синтезованих ПАР (г/л), які визначали як описано раніше [4—6, 8].

Усі досліді проводили в 3 повторях, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3—5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за Лакінім [9]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості  $p < 0,05$ .

Результати та обговорення. Показники синтезу ПАР за умов росту *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. Vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з різними концентраціями соняшникової олії наведено у табл. 1.

Таблиця 1. Синтез пар *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. Vaccinii* IMB B-7405 на середовищі з різними концентраціями олії

Штам	Концентрація соняшникової олії, %	Умовна концентрація ПАР (ПАР*)	Концентрація ПАР, г/л
<i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241	2	9,1±0,45	5,2±0,26
	3	8,7±0,43	5,1±0,25
	4	7,7±0,38	4,9±0,24
	5	7,3±0,36	3,7±0,18
<i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	2	3,9±0,19	3,3±0,16
	3	3,0±0,15	2,8±0,14
	4	2,9±0,14	2,3±0,11
	5	2,1±0,10	1,7±0,08

**Примітка.** Концентрація сечовини та нітрату натрію в середовищі культивування *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. Vaccinii* IMB B-7405 0,35 г/л і 0,5 г/л відповідно.

Результати досліджень показують, що максимальна концентрація ПАР *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. Vaccinii* IMB B-7405 (5,2 і 3,3 г/л відповідно) спостерігалася за концентрації соняшникової олії в середовищі 2 %. Подальше збільшення концентрації субстрату в середовищі до 4 і 5 % супроводжувалося зниженням показників синтезу (як показника ПАР\*, так і концентрації ПАР).

Одним з факторів, що визначають ефективність процесів мікробного синтезу вторинних метаболітів, є співвідношення С/Н в середовищі культивування продуцентів [8]. У попередніх дослідженнях [8, 10] нами було встановлено оптимальне співвідношення С/Н для біосинтезу ПАР штамми IMB B-7241 і IMB B-7405 на середовищах, що містять 1—2 % етанолу та гліцерину. У даній роботі, підвищуючи до 5 % концентрацію соняшникової олії в середовищі культивування *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. Vaccinii* IMB B-7405, ми не змінювали вміст у ній джерела азоту.

Тому на наступному етапі досліджували синтез ПАР на середовищах, в яких концентрація сечовини та нітрату натрію була збільшена в 2—3 рази для IMB B-7405 та в 2—4 рази для IMB B-7241 порівняно з їх вмістом у базовому середовищі (табл. 2 і 3).

Таблиця 2. Вплив концентрації нітрату натрію на синтез пар штамом IMB B-7405

Концентрація соняшникової олії, %	Концентрація NaNO <sub>3</sub> , (г/л)	Концентрація ПАР, (г/л)
3	0,5	3,2±0,16
	1,0	2,6±0,13
	1,5	2,2±0,11
4	0,5	2,1±0,10
	1,0	2,0±0,10
	1,5	1,8±0,09

Дані, наведені в табл.2, свідчать про те, що підвищення концентрації джерела азоту до 1,0—1,5 г/л в середовищі культивування *N. Vaccinii* IMB B-7405, що містить 3—4% соняшникової олії, не супроводжувалося підвищенням концентрації ПАР порівняно з показниками на середовищі з 0,5 г/л нітрату натрію. Таким чином, оптимальна концентрація олії в середовищі культивування штаму IMB B-7405, що забезпечує максимальний синтез ПАР, становить 2—3%, і подальше підвищення вмісту ростового субстрату є недоцільним.

Інші закономірності спостерігали для штаму *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 (табл. 3). Підвищення вмісту сечовини в середовищі культивування супроводжувалося збільшенням кількості синтезованих ПАР. Максимальна концентрація ПАР (11,2 г/л) досягалася на середовищі, що містило 1,35 г/л сечовини і 6 % соняшникової олії.

Зазначимо, що показники синтезу ПАР *A. Calcoaceticus* IMB B-7241 і *N. Vaccinii* IMB B-7405 на соняшниковій олії порівнянні з показниками синтезу інших штамів-продуцентів [1—3, 10]. Так, кількість рамноліпідів, синтезованих *Pseudomonas* sp. IS 13428 на середовищі з 4 % кукурудзяної олії, становила 7,6 г/л. *P. Aeruginosa* ATCC 27853 на середовищі з соняшниковою олією (3,5 %) синтезує 4,07 г/л ПАР [3]. Такий вихід кінцевого продукту може бути пов'язаний з кількісним вмістом жирних кислот у оліях.

Таблиця 3. Синтез пар штамом ІМВ В-7241 на середовищі з різними концентраціями сечовини і соняшникової олії

Концентрація соняшникової олії, %	Концентрація (NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO, (г/л)	Концентрація ПАР, (г/л)
4	0,35	4,9±0,24
	0,7	6,3±0,31
	1,0	7,3±0,36
5	0,35	3,7±0,18
	0,7	4,7±0,24
	1,0	5,7±0,28
6	1,0	9,2±0,46
	1,35	11,2±0,56
7	1,0	7,9±0,39
	1,35	9,2±0,46

**Висновки.** Таким чином, отримані результати свідчать про можливість синтезу поверхнево-активних речовин при культивуванні *A. Calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *N. Vaccinii* ІМВ В-7405 на середовищі з підвищеним вмістом соняшникової олії. Ці дані є основою для розробки технології отримання ПАР з використанням як субстрату відпрацьованої (пересмаженої) олії.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Jatropha oil derived sophorolipids: production and characterization as laundry detergent additive* / Joshi-Navare K., Khanvilkar P. and Prabhune A. // Biochem. — 2013. — V.1, № 10 — P. 15—24.
2. *Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate* / Accorsini F.R., Muttoni M.R., Lemos E.M., Benincasa M. Braz. J. // Microbiol. — 2012. — V. 43, № 1. — P. 116—125.
3. *Production and characterization of rhamnolipids from Pseudomonas aeruginosa strain* / Rikalovic M.G., Gojic-Cvijovic G., Vrvic M.M. and Karadzic I. J. // Serb. Chem. Soc. — 2012. — V. 77, № 1. — P. 27—42.
4. *Синтез поверхнево-активних речовин Rhodococcus erythropolis ІМВ Ас-5017, Acinetobacter calcoaceticus ІМВ В-7241 и Nocardia vaccinii ІМВ В-7405 на промислових відходах* / Пирог Т. П., Софилканич А. П., Покора К. А., Шевчук Т. А., Иутинская Г. А. // Микроб. журн. — 2014. — Т. 76, № 2. С.17—23.
5. *Biosurfactant synthesis by Rhodococcus erythropolis IMV Ac -5017, Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241, Nocardia vaccinii IMV B-7405 on byproduct of biodiesel product* / Pirog T., Shulyakova M., Sofilkanych A., Shevchuk T., Maschenko O. // Food Bioprod. Proces. — 2013. DOI 10.1016/j.fbp.2013.09.003.
6. *The influence of conditions of Acinetobacter calcoaceticus K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis* / Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. // Appl. Biochem. Microbiol. — 2009. — V. 45, № 3. — P. 272—278.
7. *Intensification of surfactants' synthesis by Rhodococcus erythropolis IMV Ac-5017, Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241 and Nocardia vaccinii K-8 on fried oil and glycerol containing medium* / Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S. // Food Bioprod. Proces. — 2013. — V. 91, № 2. P. 149—157.
8. *Интенсификация технологий микробного синтеза* / Подгорский В.С., Иутинская Г.О., Пирог Т.П. // Киев: Наук. Думка. — 2010. — 327 с.
9. *Биометрия* / Лакин Г.Ф. // М.: Высшая школа. — 1990. — 352 с.
10. *Вплив умов культивування на синтез поверхнево-активних речовин Nocardia vaccinii ІМВ В-7405 на гліцерині* / Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Яцук Д.В., Боровик О.О. // Наукові праці НУХТ. — 2012. — №44. С. 17—21.

# **БИОКОНВЕРСИЯ ПОДСОЛНЕЧНОГО МАСЛА В ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 И *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405**

**И.Ю. Павлюковец, Л.В. Никитюк, К.А. Береговая, Т.П. Пирог**

*Национальный университет пищевых технологий*

*Показана возможность использования подсолнечного масла в качестве субстрата для биосинтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter Calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia Vaccinii* IMB B-7405. Установлено, что увеличение концентрации подсолнечного масла в базовой среде культивирования штаммов IMB B-7405 и IMB B-7241 с 2 до 5 % сопровождалось снижением показателей синтеза ПАВ. Однако повышение содержания мочевины в 3–4 раза (до 1,0–1,35 г/л) позволило увеличить количество поверхностно-активных веществ, синтезированных *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на среде, содержащей 6–7 % подсолнечного масла, до 9,2–11,2 г/л, что почти в 2–2,5 раза выше, чем на базовой среде с более низкой концентрацией источников углеродного и азотного питания.*

**Ключевые слова:** *Acinetobacter Calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia Vaccinii* IMB B-7405, маслосодержащий субстрат, микробные поверхностно-активные вещества.