

## SYNTHESIS OF ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMV B-7241 SURFACTANTS ON WASTE SUNFLOWER OIL IN THE PRESENCE OF EXOGENOUS PRECURSORS

I. Pavliukovets, T. Pirog

National University of Food Technologies

---

### Key words:

surfactants,  
glucose,  
organic acids,  
*Acinetobacter calcoaceticus*  
IMV B-7241,  
sunflower oil

### Article history:

Received 24.10.2016  
Received in revised form  
31.10.2016  
Accepted 10.11.2016

### Corresponding author:

ira.morgana@mail.ru

---

### ABSTRACT

The effect of exogenous precursors, such as glucose (0,01% w/w), fumarate (0,01—0,1% w/w) and citrate (0,01—0,1% w/w) for the synthesis of surface active substances (SAS, surfactants) under *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 cultivation in the medium with waste and refined sunflower oil (2—4% v/v) was studied. The choice of precursors was caused by the fact that glucose is a part of surfactants trehalozomikolats synthesized by *A. calcoaceticus* IMV B-7241, fumarate — precursor of gluconeogenesis and thus of glycolipids biosynthesis too, and citrate — regulator of lipids synthesis. It was established that increasing SAS concentration by 80—85% was observed only in case of glucose adding into the medium with 2% of waste oil. Addition of organic acids into medium of the strain IMV B-7241 cultivation didn't accompanied by increase of SAS synthesis indexes that can be explained by inhibition by oil of fumarate and citrate transport into the *A. calcoaceticus* IMV B-7241 cells.

---

## СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMV B-7241 НА ВІДПРАЦЬОВАНІЙ СОНЯШНИКОВІЙ ОЛІЇ ЗА НАЯВНОСТІ ЕКЗОГЕННИХ ПОПЕРЕДНИКІВ

І.Ю. Павлюковець,

Т.П. Пирог, д-р. біол. наук

Національний університет харчових технологій

У статті досліджено вплив екзогенних попередників (глюкоза — 0,01%, фумарат — 0,01—0,1% і цитрат — 0,01—0,1%) на синтез поверхнево-активних речовин (ПАР) за умов росту *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 на середовищі з рафінованою і відпрацьованою соняшниковою олією (2—4%, об'ємна частка). Встановлено, що збільшення концентрації ПАР на 80—85% спостерігається лише у разі внесення глюкози у середовище з 2% відпрацьованої олії. Додавання органічних кислот у середовище культивування штаму IMV B-7241 не супроводжувалось збільшенням показників синтезу ПАР, що можна поясни-

ти інгібуванням олією транспорту фумарату і цитрату в клітини *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241.

**Ключові слова:** поверхнево-активні речовини, глюкоза, органічні кислоти, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, соняшникова олія.

**Постановка проблеми.** Останніми роками спостерігається значний інтерес до екологічно безпечних поверхнево-активних речовин (ПАР) мікробного походження. Завдяки своїй поліфункціональності вони є перспективними для застосування у різних галузях харчової промисловості, медицині й агропромислового комплексу [1]. Мікробні ПАР є біодеградабельними, нетоксичними і нешкідливими, на відміну від синтетичних, тому їх використання не завдає шкоди довкіллю [2].

Раніше [3] нами було встановлено можливість заміни рафінованої соняшникової олії на відпрацьовану після смаження картоплі та м'яса для синтезу ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241.

Відомо, що одним із підходів до підвищення ефективності мікробного синтезу є внесення у середовище культивування екзогенних попередників біосинтезу [4]. Такий підхід був використаний для підвищення показників синтезу ПАР *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* К-8 на н-гексадекані, етанолі, очищеному гліцерині [4; 5; 6].

**Мета статті:** дослідити можливість інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на відпрацьованій олії за наявності в середовищі культивування попередників біосинтезу.

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень був штам *Acinetobacter calcoaceticus* К-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;  $\text{NaCl}$  — 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.

Як джерело вуглецю використовували рафіновану соняшкову олію «Сто-жар» (компанія Кернел, м. Київ), а також відпрацьовану після смаження картоплі та м'яса (мережа ресторанів швидкого харчування McDonald's, м. Київ) олію у концентрації 2 і 4% (об'ємна частка).

В одному з варіантів в середовище додатково вносили глюкозу (0,1%, масова частка) у вигляді 40% розчину, а також цитрат натрію (0,01 і 0,1%) і фумарат натрію (0,01 і 0,1%) у вигляді 10-відсоткових розчинів. Внесення попередників здійснювали на початку процесу культивування та в кінці експоненційної фази росту продуцента.

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на рафінованій або відпрацьованій соняшковій 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. Для одержання супернатанту культуральну рідину центрифугували при 5000 g впродовж 20 хв. Залишки соняшникової олії видаляли шляхом трикратної екстракції петролейним ефіром (співвідношення 1:1). ПАР екстрагували сумішшю Фолча (як описано у [7]), а також модифікованим методом [8]. Для цього 25 мл супернатанта переносили у циліндричну ділільну воронку об'ємом 100 мл, додавали 5 мл 1 М HCl, воронку закривали прищліфованим корком і струшували упродовж 3 хв, далі додавали ще 4 мл 1 М HCl й 16 мл суміші хлороформу та метанолу (2:1) і струшували протягом 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали у воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію зливали (органічний екстракт 1), а водну фазу ще раз екстрагували. Під час повторної екстракції у водну фазу додавали 9 мл 1М HCl, 16 мл суміші хлороформу з метанолом (2:1) і здійснювали екстракцію ліпідів упродовж 5 хв. Після розділення фаз збирали нижню фракцію (органічний екстракт 2). На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші хлороформу з метанолом (2:1) і проводили екстракцію, як описано вище, при цьому одержували органічний екстракт 3. Екстракти 1—3 об'єднували й упарювали на роторному випарнику ІРІМ2 (Росія) при температурі 50 °С за абсолютного тиску 0,4 атм до постійної маси.

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

**Результати досліджень.** Враховуючи хімічний склад ПАР, синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (комплекс нейтральних, аміно- та гліколіпідів), і той факт, що основним компонентом комплексу є трегалозоміколати [7], як один із попередників біосинтезу використовували глюкозу (табл. 1). Раніше такий підхід був використаний для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних гліколіпідів *R. erythropolis* ЕК-1 [10]. У [11, 12] як попередники біосинтезу ПАР дріжджів роду *Pseudozyma* використовували еритрол і манозу, які є складовими цих гліколіпідів.

Таблиця 1. Вплив екзогенної глюкози на біосинтез ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на соняшниковій олії

Олія	Момент внесення глюкози (фаза росту)	Концентрація ПАР, г/л
Рафінована	Без глюкози (контроль)	3,4±0,17
	Лаг-фаза	3,1±0,15
	Експоненційна	2,4±0,12
Після смаження картоплі	Без глюкози (контроль)	6,6±0,33
	Лаг-фаза	6,4±0,32
	Експоненційна	5,9±0,30
Після смаження м'яса	Без глюкози (контроль)	7,3±0,36
	Лаг-фаза	7,2±0,36
	Експоненційна	5,8±0,29

**Примітка.** Концентрація субстрату в середовищі становила 4% (об'ємна частка).

Проте експерименти показали, що на відміну від *R. erythropolis* ЕК-1 [10], показники синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 за внесення глюкози як на початку процесу культивування, так і в експоненційній фазі росту не підвищувались порівняно із такими на середовищі без попередника.

На наступному етапі досліджували синтез ПАР на олієвмісних субстратах за наявності в середовищі культивування фумарату і цитрату (табл. 2).

Відомо, що фумарат є попередником глюконеогенезу, а цитрат — регулятором синтезу ліпідів [4]. За одночасної наявності фумарату (0,01%) і цитрату (0,01%) у середовищі з очищеним гліцерином спостерігали збільшення на 40—100% кількості синтезованих *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 ПАР [13]. Зазначимо, що в літературі описано підвищення синтезу мікробних ПАР за наявності в середовищі тільки цитрату, який вносили на початку культивування [14].

Дані, наведені у табл. 2, показують, що у разі внесення в середовище з соняшниковою олією органічних кислот як окремо, так і в суміші, підвищення концентрації ПАР не спостерігалось.

**Таблиця 2. Синтез ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на рафінованій і відпрацьованій олії за наявності фумарату і цитрату**

Олія	Органічна кислота	Концентрація ПАР, г/л
Рафінована	Фумарат	3,6±0,18
	Цитрат	2,9±0,15
	Фумарат + Цитрат	2,1±0,11
	Без органічних кислот (контроль)	3,9±0,19
Після смаження м'яса	Фумарат	6,0±0,30
	Цитрат	2,8±0,14
	Фумарат + Цитрат	5,5±0,27
	Без органічних кислот (контроль)	6,6±0,33

**Примітка.** Концентрація субстрату в середовищі становила 4% (об'ємна частка). Органічні кислоти вносили на початку стаціонарної фази росту у концентрації 0,01%.

Отже, на відміну від культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на етанолі та гліцерині [4, 13], внесення фумарату і цитрату в середовище із соняшниковою олією не супроводжувалось інтенсифікацією синтезу ПАР.

Зазначимо, що у даних експериментах для визначення концентрації ПАР використовували класичну схему екстракції сумішшю Фолча, яка дає змогу вилучити неполярні ліпіди у той час, як до складу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 входять і полярні ліпіди [4]. Зважаючи на це, в наступних експериментах процес екстракції проводили модифікованою сумішшю Фолча [8]. Така схема проведення процесу дає змогу суттєво збільшити доступність полярних ліпідів для системи екстрагентів і підвищити ступінь їх видалення з культуральної рідини. Суть модифікації полягає в тому, що до супернатанту культуральної рідини додають 0,1 М соляну кислоту (співвідношення 1:3,5), що зсуває рівновагу електролітичної дисоціації ПАР у бік утворення їх недисоційованої форми. Таким чином підвищується спорідненість трансформованих полярних ліпідів до ключового екстрагенту (хлороформ), що відповідає за абсорбцію ліпідів і їх локалізацію в доступній для видалення фазі системи екстрагентів [8].

Експерименти показали, що використання модифікованого методу для екстракції поверхнево-активних речовин дало змогу підвищити їх концентрацію на 20—40%, тому надалі процес екстрагування ПАР здійснювали згідно з цією методикою.

Раніше було встановлено [4], що для *R. erythropolis* ЕК-1 та *N. vaccinii* ІМВ В-7405 оптимальними концентраціями фумарату та цитрату, які забезпечували суттєве підвищення синтезу ПАР, були 0,1—0,2%, тому в наступних експериментах підвищували концентрацію органічних кислот (табл. 3).

Таблиця 3. Вплив органічних кислот на синтез ПАР за умов росту штаму ІМВ В-7241 на соняшниковій олії (4%)

Олія	Органічна кислота	pH	Концентрація ПАР, г/л
Рафінована	Фумарат	6,4	5,4±0,27
	Цитрат	6,5	5,1±0,25
	Фумарат + Цитрат	6,5	4,7±0,23
	Без органічних кислот (контроль)	6,4	6,3±0,31
Після смаження м'яса	Фумарат	6,4	7,3±0,36
	Цитрат	6,3	5,2±0,26
	Фумарат + Цитрат	6,6	5,8±0,29
	Без органічних кислот (контроль)	6,2	7,4±0,37

**Примітка.** Органічні кислоти вносили на початку стаціонарної фази росту.

Дані, наведені в табл. 2 і 3, засвідчують, що при збільшенні концентрації органічних кислот до 0,1% кількість синтезованих ПАР була вищою, ніж за використання 0,01% фумарату і цитрату, проте залишалась нижчою, ніж на середовищі без попередників.

З літератури відомо, що солі органічних кислот транспортуються у клітини шляхом активного транспорту (симпорт з протоном), в результаті чого рН культуральної рідини підвищується [15]. В наших експериментах не спостерігали підвищення рН за наявності органічних кислот в середовищі (див табл. 3). Такі результати можуть свідчити про те, що фумарат і цитрат не транспортуються в клітини *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. На нашу думку, однією з причиною цього може бути наявність певних інгібіторів у відпрацьованій соняшниковій олії, концентрація якої у середовищі була достатньо високою (4%). У той же час рафінована олія, на відміну від пересмаженої, не містить таких потенційних інгібіторів, тому цілком імовірно, що обмеження транспорту може бути зумовлено наявністю у середовищі високої концентрації водонерозчинного гідрофобного субстрату. Тому в наступних експериментах досліджували вплив органічних кислот на синтез ПАР за умов росту штаму ІМВ ВВ-7241 у середовищі з нижчою концентрацією як рафінованої, так і відпрацьованої олії. Зазначимо, що для *N. vaccinii* ІМВ В-7405 і *R. erythropolis* ЕК-1 спостерігалася інтенсифікація синтезу ПАР за внесення фумарату і цитрату в середовище з 2% олії [4]. Проте експерименти показали, що й у цьому разі не спостерігалася збільшення синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Разом з тим внесення екзогенної глюкози у середовище з 2% олії супроводжувалось підвищенням концентрації ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на 80—85% порівняно з такою на середовищі з 4% субстрату (рис.).

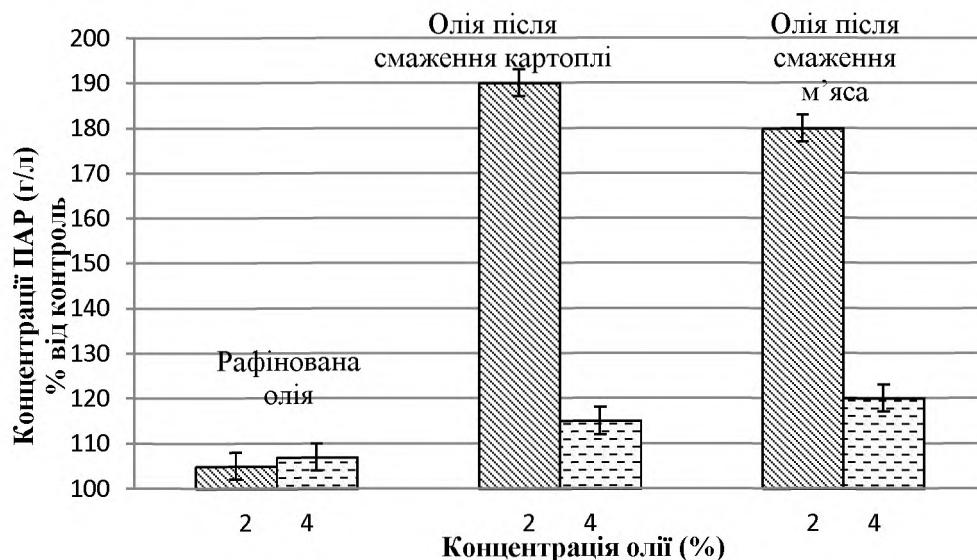


Рис. 1. Вплив концентрації олії на синтез ПАР *A. calcoaceticus* IMB B-7241 за внесення екзогенної глюкози: контроль (100%) — концентрація ПАР на середовищі без глюкози

**Висновки.** Отже, в результаті проведеного дослідження встановлено, що збільшення концентрації ПАР спостерігається лише у разі внесення глюкози у середовище з 2% відпрацьованої олії. Додавання органічних кислот у середовище культивування штаму IMB B-7241 не супроводжувалось інтенсифікацією синтезу ПАР, що можна пояснити інгібуванням олією транспорту фумарату і цитрату в клітини *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Microbial biosurfactants as additives for food industries / J.M. Campos [et al.] // *Biotechnol. Prog.* — 2013. — V. 29. № 5. — P. 1097—1108. doi: 10.1002/btpr.1796.
2. Surfactants tailored by the class *Actinobacteria* / J.H. Kügler [at al] // *Front. Microbiol.* — 2015. — doi: 10.3389/fmicb.2015.00212.
3. Особливості синтезу поверхнево—активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на пересмаженій соняшниковій олії / І.Ю. Павлюковець [та ін.] // *Наукові праці НУХТ.* — 2016. — Т. 22, №4, — С. 48—54.
4. Підгорський, В.С. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу / В.С. Підгорський, Г.О. Іутинська, Т.П. Пирог — К.: Наук. думка, 2010. — 327 с.
5. Синтез поверхностно активних веществ *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на етанолі в присутстві органіческих кислот / Т.П. Пирог [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 2012. — Т. 48, № 6. — С. 631—639.
6. Оптимизация синтеза поверхностно—активных веществ *Nocardia vaccinii* K-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля / Т.П. Пирог [и др.] // *Микробиол. журн.* — 2011. — Т. 73, № 4. — С. 15—24.
7. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на синтез поверхностно—активных веществ / Т.П. Пирог [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 2009. — Т. 45, № 3. — С. 304—310.

8. Тарасенко, Д.О. Модифікація методу кількісного визначення поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 / Д.О. Тарасенко// Харчова промисловість. — 2008. — Т. 2, №7. — С. 40—42.
9. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Лакин Г.Ф. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
10. Синтез поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ИМВ АС-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 на промышленных отходах / Т.П. Пирог [и др.] // Микробиол. журн. — 2014. — Т. 76, № 2. — С. 3—15.
11. Efficient production of mannosylerythritol lipids with high hydrophilicity by *Pseudozyma hubeiensis* KM-59 / M. Konishi [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 78. № 1. — P. 37—46.
12. Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 and their interfacial properties / T. Morita [et al.]// J. Biosci. Bioeng. 2008. — V. 105. № 5. — P. 493—502.
13. Пирог, Т.П. Вплив органічних кислот на синтез поверхнево-активних речовин штамом *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В—7241 у середовищі з гліцерином / Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук, М.О. Шулякова // Біотехнологія. — 2012 — Т.5, № 4. — С. 88—95.
14. De Roubin, M.R., Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity / M.R. De Roubin, C.N. Mulligan, B.F. Gibbs // Can. J. Microbiol. — 1989. — V. 35, N 9. — P. 854—859.
15. Ивановский, Р.Н. Биоэнергетика и транспорт субстратов у бактерий / Р.Н. Ивановский — М.: МАКСПресс. — 2001. — 46 с.

## СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241 НА ОТРАБОТАНОМ ПОДСОЛНЕЧНОМ МАСЛЕ В ПРИСУТСТВИИ ЭКЗОГЕННЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

И.Ю. Павлюковец, Т.П. Пирог

Национальный университет пищевых технологий

*В статье исследовано влияние экзогенных предшественников (глюкоза — 0,01%, фумарат — 0,01—0,1% и цитрат — 0,01—0,1%) на синтез поверхностно-активных веществ (ПАВ) при культивировании *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 в среде с рафинированным и отработанным подсолнечным маслом (2—4%, по объему). Установлено, что увеличение концентрации ПАВ на 80—85% наблюдали только при внесении глюкозы в среду с 2% отработанного масла. Добавление органических кислот в среду культивирования штамма ИМВ В-7241 не сопровождалось увеличением показателей синтеза ПАВ, что можно объяснить ингибированием маслом транспорта фумарата и цитрата в клетки *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241.*

**Ключевые слова:** *поверхностно-активные вещества, глюкоза, органические кислоты, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, подсолнечное масло.*