

BIOCONVERSION OF FRIED SUNFLOWER OIL INTO SURFACTANTS OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241

I. Pavliukovets, T. Pirog

National University of Food Technologies

Key words:

Acinetobacter calcoaceticus IMV B 7241
Waste (fried) sunflower oil
Surfactants

Article history:

Received 16.01.2016
Received in revised form
05.02.2016
Accepted 23.02.2016

Corresponding author:

I. Pavliukovets
E-mail:
npnft@ukr.net

ABSTRACT

The possibility of replacing refined sunflower oil on waste oil after frying potato and meat for the synthesis of *Acinetobacter calcoaceticus*-IMV B-7241 surfactants was shown. It was found that the use of sunflower oil as a carbon source for obtaining inoculum allowed to increase the surfactant concentration to 3.8—4.35 g/l, which is 1.5—2.5 times higher than in the case of inoculum growth on molasses.

БІОКОНВЕРСІЯ ПЕРЕСМАЖЕНОЇ СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ В ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241

І.Ю. Павлюковець, Т.П. Пирог

Національний університет харчових технологій

*У статті доведено можливість заміни рафінованої соняшникової олії на відпрацьовану після смаження картоплі та м'яса для синтезу поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. Встановлено, що використання соняшникової олії як джерела вуглецю для одержання посівного матеріалу дає змогу збільшити концентрацію ПАР до 3,8—4,35 г/л, що в 1,5—2,5 рази більше, ніж у разі застосування інокуляту, одержаного на мелясі.*

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, відпрацьована (пересмажена) соняшникова олія, поверхнево-активні речовини.

Постановка проблеми. На даний час у світі спостерігається підвищений інтерес до застосування мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР) у різних галузях промисловості, що зумовлено їхньою екологічною безпечністю та високою ефективністю [1, 2]. Проте промислове виробництво цих продуктів мікробного синтезу обмежено високими витратами на біосинтез.

Одним із шляхів здешевлення технології мікробних ПАР є використання як субстрату промислових відходів. Оскільки мікробні ПАР за хімічною природою ліпіди (нейтральні, гліко- та фосфоліпіди) [1, 2], оптимальним субстратом для їх синтезу є олієвмісні відходи.

На сьогодні в Україні особливо гостро стоїть проблема утилізації відпрацьованої соняшникової олії. Щоденно збільшується кількість закладів швидкого харчування, в яких пересмажена (відпрацьована) олія є основним побічним продуктом.

Слід зазначити, що в Україні викиди відпрацьованої соняшникової олії в навколишнє середовище не регламентуються. Одним із шляхів вирішення даної проблеми є використання цих токсичних відходів як субстрату в біотехнологічних процесах. Однак не завжди пересмажена олія є якісним субстратом через наявність в її складі потенційних інгібіторів росту та синтезу мікробних метаболітів [3].

З літератури [4—7] відомо про використання олієвмісних субстратів для біосинтезу софороліпідів і рамноліпідів. Так, на 72 год культивування *Candida lipolytica* УСР 0988 в середовищі з 6 % фузів (відходи оліє-жирової промисловості) синтезує до 8 г/л софороліпідів [5]. *Bacillus pumilus* ССТ 2487 утворює 5,7 г/л гліколіпідів на середовищі, що містить 3 % відпрацьованої після смаження овочів соняшникової олії [6]. У [7] вчені досліджували здатність до біоконверсії пересмаженої соєвої олії (2 %) бактеріями *Pseudomonas ceracia* ССТ6659. Встановлено, що на 24 год культивування поверхневий натяг культуральної рідини знижувався до 27,52 мН/м, а на 144 год культивування концентрація ПАР в середовищі становила 5,2 г/л. Проте у доступній літературі нам не вдалося знайти відомостей про синтез ПАР на олієвмісних субстратах бактеріями роду *Acinetobacter*.

Раніше [8] нами було встановлено можливість синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на рафінованій соняшниковій олії. Максимальна концентрація ПАР досягалася на середовищі, що містило 1,0 г/л сечовини і 4 % олії.

Мета статті. Дослідити можливість заміни рафінованої соняшникової олії на пересмажену (відпрацьовану) для синтезу ПАР *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження — штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, зареєстрований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України.

Штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-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 соняшкову олію «Стожар» (компанія Кернел, Київ), відпрацьовану після смаження картоплі та м'яса (мережа ресторанів швидкого харчування McDonald's Київ), а також

нерафіновану (холодного пресування) олію. Концентрація субстрату в середовищі становила 4 % (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на мелясі (0,5 % за вуглеводами) або рафінованій соняшниковій олії (0,5 % об'ємна частка). 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.

Кількість синтезованих позаклітинних ПАР (г/л) визначали ваговим методом після екстракції із супернатанту культуральної рідини сумішшю Фолча (хлороформ і метанол, 2:1). 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).

Для виділення позаклітинних ПАР у циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл додавали 20 мл супернатану та 25 мл суміші Фолча (хлороформ і метанол, 2:1), воронку закривали шліфованою пробкою і струшували (з метою екстракції ліпідів) упродовж 3—5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали в воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію (органічний екстракт 1) зливали в колбу, а водну фазу піддали повторній екстракції. При повторній екстракції до водної фази додавали 25 мл суміші Фолча і проводили екстракцію ліпідів протягом 3—5 хв. Після розділення фаз нижню фракцію зливали й отримували органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші Фолча і здійснюють екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1—3 змішували й упарювали на роторній випарній установці IP-1M2 (Росія) при температурі 50 °С і абсолютному тиску 0,4—0,5 атм до постійної маси.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали також за індексом емульгування (E_{24} , %) нативної та розбавленої в 10 та 50 разів культуральної рідини. Як субстрат для емульгування використовували рафіновану соняшникову олію: до 2 мл культуральної рідини додавали 2 мл олії та струшували впродовж 2 хв. Визначення індексу емульгування (E_{24}) проводили через 24 год як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини в пробірці і виражали у відсотках [9, 10].

Усі досліди проводили в трьох повторях, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3—5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за Лакнім [11]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати і обговорення. У [9] було показано, що використання інокуляту, вирощеного на мелясі, супроводжувалося підвищенням синтезу ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на рафінованій олії, тому на першому етапі досліджень як джерело вуглецю в середовищі для отримання інокуляту використовували мелясу.

Результати досліджень показали, що за використання такого посівного матеріалу показники синтезу ПАР на нерафінованій і відпрацьованій олії були нижчими, ніж на рафінованій (табл. 1). Так, наприклад, концентрація

ПАР на відпрацьованій після смаження картоплі олії була у 2,7 раза нижчою, ніж на очищеному субстраті. Незалежно від типу олії, що використовувалася для вирощування штаму ІМВ В-7412, індекс емульгування як нативної, так і розбавленої у 10 і 50 раз культуральної рідини практично не змінювався і перебував у межах 50—54 %.

Варто зазначити, що з метою скорочення тривалості лаг-фази в біотехнологічних процесах використовують однакові субстрати як у середовищі для отримання інокуляту, так і біосинтезу цільового продукту [12], тому на наступному етапі досліджень посівний матеріал вирощували на рафінованій соняшниковій олії (табл. 1).

*Таблиця 1. Синтез ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на олієвмісних субстратах залежно від якості інокуляту*

Джерело вуглецю в середовищі для отримання інокуляту	Олія у середовищі для біосинтезу ПАР	Концентрація ПАР, г/л
Меляса	Рафінована	4,0±0,20
	Нерафінована	2,3±0,12
	Відпрацьована після смаження картоплі	1,5±0,08
	Відпрацьована після смаження м'яса	2,8±0,14
Рафінована соняшникова олія	Рафінована	3,4±0,17
	Нерафінована	3,3±0,16
	Відпрацьована після смаження картоплі	3,85±0,19
	Відпрацьована після смаження м'яса	4,35±0,21

Експерименти показали, що заміна меляси у середовищі для одержання інокуляту на рафіновану олію супроводжувалась підвищенням концентрації синтезованих ПАР на відпрацьованій олії. Крім цього, у разі використання такого інокуляту кількість утворених на пересмаженій олії ПАР була навіть у 1,1—1,3 раза вищою, ніж на рафінованій.

У табл. 2 наведено дані про індекс емульгування нативної та розбавленої у 10 і 50 раз культуральної рідини після вирощування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на різних олієвмісних субстратах з використанням інокуляту, вирощеного на олії.

У разі використання інокуляту, вирощеного на рафінованій олії, індекс емульгування нативної культуральної рідини досягав 100 % і був у 2 рази вищим порівняно із застосуванням посівного матеріалу, отриманого на мелясі (табл. 2). Слід зазначити, що при розбавленні культуральної рідини у 10 та 50 разів індекс емульгування становив у середньому 45—55 % незалежно від типу олії, що використовувалася для синтезу ПАР.

Порівняння отриманих нами результатів з літературними даними [4—7] показало, що синтезувальна здатність *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відпрацьованій соняшниковій олії не поступається такій продуцентам відомих у світі гліколіпідів.

*Таблиця 2. Індекс емульгування культуральної рідини за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на різних олієвмісних субстратах*

Олія у середовищі культивування	E ₂₄ (%) культуральної рідини		
	нативної	розведеної у 10 разів	розведеної у 50 разів
Рафінована	96	56	52
Нерафінована	100	53	47
Відпрацьована після смаження картоплі	100	55	42
Відпрацьована після смаження м'яса	100	56	54

Примітка. При визначенні індексу емульгування похибка не перевищувала 5 %.

Висновок

Отримані результати свідчать про можливість використання відпрацьованої після смаження м'яса та картоплі соняшникової олії для синтезу поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241. Використання такого субстрату дасть змогу знизити собівартість кінцевого продукту й утилізувати токсичні відходи харчової промисловості.

Література

1. Campos J.M., Stamford T.L., Sarubbo L.A., de Luna J.M., Rufino R.D., Banat I.M. Microbial biosurfactants as additives for food industries // *Biotechnology Progress*. — 2013. — V. 29, # 5. — P. 1097—1108. doi:10.1002/btpr.1796.
2. Sachdev D.P., Cameotra S.S. Biosurfactants in agriculture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2013. — V. 97, # 3. — P. 1005—1116. doi: 10.1007/s00253-012-4641-8.
3. Rafulla D.P., Veera G.G. Biodiesel production from waste cooking oil using sulfuric acid and microwave irradiation processes // *Environmental Research*. — 2012. — doi:10.4236/jep.2012.31013.
4. Пирог Т.П., Софілканіч А.П., Конон А.Д., Гриценко Н.А. Біосинтез поверхнево-активних речовин на промислових відходах // *Acta Biotechnologica*. — 2014 — V. 7, # 5. — С. 9—26.
5. Rufino R.D., Luna J.M., Takaki C.M. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988 // *Electronic Journal of Biotechnology*. — 2014. — doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.006.
6. Oliveira J.G., Cruz C.H. 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. — V. 56, # 1. — P. 155—160.
7. Nathalia P., Rocha S., Rufino D., Luna M., Santos V., Sarubbo L. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. — 2013. — V. 3, # 2. — P. 132—139. doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.005.
8. Павлюковець І.Ю. Синтез поверхностно-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на подсолнечном маслі / І.Ю. Павлюковець, Л.В. Никитюк, Т.П. Пирог, К.А. Береговая // *Электронный научный журнал «Apriori. Серия: естественные и технические науки»*. — 2014. — № 5. — 10 с. — Режим доступа: <http://apriori-journal.ru/journal-estesvennie-nauki/last-number>.
9. Синтез поверхностно активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 И *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на промислових відходах / Т.П. Пирог, А.П. Софілканіч, К.А. Покора, Т.А. Шевчук, Г.А. Иутинская // *Микробиологический журнал*. — 2014. — Т. 76, № 2. — С. 17—23.
10. Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S. 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 // Food and Bioproducts Processing. — 2013. — V. 91, # 2. — P. 149—157.

11. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — Москва: Высшая школа, 1990. — 352 с.

12. Подгорский В.С. Интенсификация технологий микробного синтеза / В.С. Подгорский, Г.О. Иутинская, Т.П. Пирог. — Киев: Наук. Думка, 2010. — 327 с.

БИОКОНВЕРСИЯ ПЕРЕЖАРЕННОГО ПОДСОЛНЕЧНОГО МАСЛА В ПОВЕРХНОСТНО- АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ИМВ В-7241

И.Ю. Павлюковец, Т.П. Пирог

Национальный университет пищевых технологий

*В статье проанализирована возможность замены рафинированного подсолнечного масла на отработанное после жарки картофеля и мяса для синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241. Установлено, что использование подсолнечного масла в качестве источника углерода для получения посевного материала позволило увеличить концентрацию ПАВ до 3,8—4,35 г/л, что в 1,5—2,5 раза превышает показатели, полученные при использовании инокулята, выращенного на мелассе.*

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, отработанное (пережаренное) подсолнечное масло, поверхностно-активные вещества.