

## BIOCONVERSION OF BIODIESEL PRODUCTION WASTE INTO ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241 SURFACTANTS

T. Pirog, M. Shulyakova  
National University of Food Technologies

**Key words:**

*Acinetobacter Calcoaceticus IMV B-7241 Biodiesel production waste Surfactants Biosynthesis Cultivation*

**ABSTRACT**

The possibility of increasing the content of technical glycerin (byproduct of biodiesel production, glycerol fraction) in the medium cultivation for *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 — producer of surface-active agents (surfactants) was investigated. Maximal values of surfactants synthesis (5.9—6.1 g/l) were observed after addition of copper sulfate (0.16  $\mu\text{mol/l}$ ) and zinc sulfate (38  $\mu\text{mol/l}$ ) into medium with glycerol fraction as well as after increasing the content of urea to 0.7—0.9 g/l. Under such cultivation conditions the concentration of technical glycerol increased to 8 % (v/v), that in 4 times higher than the content of the base medium. The obtained data showed the high efficiency of the bioconversion of biodiesel production waste into *A. calcoaceticus* IMV B-7241 microbial surfactants.

**Article history:**

Received 20.07.2014  
Received in revised form 28.07.2014  
Accepted 09.08.2014

**Corresponding author:**

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

## БІОКОНВЕРСІЯ ВІДХОДІВ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ У ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ АСІНЕТОБАКТЕР CALCOACETICUS IMB B-7241

Т.П.Пірог, М.О.Шулякова  
Національний університет харчових технологій

У статті досліджено можливість підвищення вмісту технічного гліцерину (побічний продукт виробництва біодизелю, гліцерина фракція) у середовищі культивування *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 — продуцента поверхнево-активних речовин (ПАР). Максимальні показники синтезу ПАР (5,9—6,1 г/л) спостерігалися за внесення у середовище з гліцериною фракцією сульфату міді (0,16 мкмоль/л), сульфату цинку (38 мкмоль/л), а також підвищення вмісту сечовини до 0,7—0,9 г/л. За таких умов культивування вдалося збільшити концентрацію технічного гліцерину до 8 % (об'ємна частка), що у 4 рази вище порівняно з вмістом у базовому середовищі. Одержані дані засвідчують високу ефективність біоконверсії відходів виробництва біодизелю у мікробні поверхнево-активні речовини *A. Calcoaceticus* IMB B-7241.

**Ключові слова:** *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, відходи виробництва біодизелю, поверхнево-активні речовини, біосинтез, культивування.

З кожним роком потреби у біопаливі зростають, оскільки вичерпуються запаси нафти та природного газу. Вважається, що у 2017 р. виробництво біодизелю становитиме близько 25 млрд л. При цьому існує нагальна потреба утилізації гліцерину — побічного продукту, що утворюється при виробництві біодизелю (близько 10 % від об'єму біопалива) [1]. Відомо, що гліцерин може бути використаний як субстрат у біотехнології, зокрема для отримання мікробного білку, лимонної кислоти, 1,3-пропандіолу, пропіонової кислоти, етанолу, біополімерів, жирних кислот, а також поверхнево-активних речовин (ПАР) [1—4].

Варто зазначити, що для одержання мікробних ПАР автори переважно використовують очищений гліцерин, а не побічний продукт виробництва біодизелю — технічний гліцерин, що у своєму складі містить метанол, етанол, хлориди натрію або калію тощо, які є інгібіторами як мікробного росту, так і синтезу ПАР. Зокрема, встановлено здатність *Ustilago maydis* до синтезу гліколіпідів на неочищеному (технічному) гліцерині [5]. Максимальної концентрації ПАР (32,1 г/л) вдалося досягти за культивування продуцента у поживному середовищі, що містило 50 г/л гліцерину та 20,3 мг/л цитрату амонію як джерело вуглецю й азоту відповідно [5]. Проте у даному випадку в поживне середовище додатково вносили амінокислоти, вітаміни групи В, а також попередники гліколіпідних ПАР — маннозу й еритритол. Ще одним суттєвим недоліком, виявленим у ході дослідження, було те, що метанол у концентрації понад 2 % пригнічував ріст клітин продуцента і, як наслідок, біосинтез ПАР. Відомо, що будь-які додаткові процеси очищення технічного гліцерину суттєво впливають на його ціну і собівартість синтезованих ПАР. Так, вартість очищеного гліцерину перевищує у 2,5 раза вартість вихідного технічного субстрату. Враховуючи вищесказане, актуальним нині є пошук мікроорганізмів, здатних до утворення ПАР саме на технічному гліцерині та стійких до наявних у його складі токсичних домішок.

Наші попередні дослідження показали, що за умов росту *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на технічному гліцерині, одержаному безпосередньо від заводу-виробника біодизелю (Запорізький біопаливний завод), концентрація синтезованих позаклітинних ПАР була удвічі вищою, ніж на очищеному субстраті [6]. При цьому вміст технічного гліцерину у середовищі не перевищував 2 % (об'ємна частка). Разом з тим, враховуючи обсяги виробництва біодизелю у світі — 11 млн т у 2008 р. із щорічним збільшенням на 8—10 % [7], а також кількість утворюваного як відходу технічного гліцерину — 10 % від об'єму біодизелю [8], стає зрозумілим, що для ефективного використання такого відходу, як субстрат у біотехнологічних процесах його вміст у середовищі культивування продуцентів практично цінних мікробних метаболітів повинен бути якомога вищим.

У зв'язку з викладеним вище мета пропонованого дослідження — встановлення умов культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241, що забезпечують високі показники синтезу ПАР на середовищі з максимально можливим вмістом технічного гліцерину.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ

Культивування штаму ІМВ В-7241 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л):  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  — 0,35,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1,  $\text{NaCl}$  — 1,0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  — 0,6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,14, дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка), розчин мікроелементів, рН 6,8—7,0. Розчин мікроелементів містив такі солі (г/100 мл):  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 1,1;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  — 0,6;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,1;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  — 0,004;  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,03;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  — 0,006;  $\text{KI}$  — 0,0001; ЕДТА (Трилон Б) — 0,5. Під час дослідження впливу концентрації азоту на синтез ПАР вміст сечовини у середовищі культивування підвищували до 0,6—1,0 г/л. В одному з варіантів у середовище замість дріжджового автолізату і мікроелементів вносили (у різних комбінаціях) сульфат цинку і сульфат міді в концентрації 38 і 0,16 ммоль/л відповідно, а також хлорид калію (0,21 ммоль/л).

Як джерело вуглецю й енергії використовували технічний гліцерин у концентрації 2—8 % (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (48 год), вирощену на середовищі наведеного складу, що містить як джерело вуглецю й енергії 0,5 % технічного гліцерину (об'ємна частка). Кількість інокуляту — 10 % від об'єму середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об./хв) при 28 °С упродовж 120—168 год.

Концентрацію позаклітинних ПАР (г/л) визначали ваговим методом після екстракції поверхнево-активних ліпідів модифікованою сумішшю Фолча. Культуральну рідину, отриману після культивування штаму ІМВ В-7241, центрифугували при 5000g упродовж 20 хв для відділення біомаси. 25 мл супернатанту поміщали в циліндричну ділільну воронку об'ємом 100 мл, додавали 5 мл 1М  $\text{HCl}$ , воронку закривали пришліфованою пробкою і струщували 3 хв, потім додавали ще 4 мл 1М  $\text{HCl}$  і 16 мл суміші хлороформу й метанолу (2:1) і струщували (з метою екстракції ліпідів) упродовж 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали у воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції. Під час повторної екстракції до водної фази додавали 9 мл 1М  $\text{HCl}$  і 16 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснювали екстракцію ліпідів упродовж 5 хв. Після розділення фаз збирали нижню фракцію й отримували органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1) і здійснювали екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1—3 змішували і випарювали на роторній випарній установці ІР-1М2 (Росія) при температурі 50 °С і абсолютному тиску 0,4 атм до постійної маси.

У табл. 1 наведено дані про синтез ПАР штамом ІМВ В-7241 залежно від наявності дріжджового автолізату і мікроелементів у середовищі з 2 % технічного гліцерину.

Таблиця 1. Вплив дріжджового автолізату і мікроелементів на синтез ПАР за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7251 на технічному гліцерині (2 %)

Наявність у середовищі культивування					ПАР, г/л
мікро-елементів	дріжджового автолізату	сульфату цинку	сульфату міді	хлориду калію	
—	—	—	—	—	1,0±0,05
+	+	—	—	—	4,5±0,22

Наявність у середовищі культивування					ПАР, г/л
мікро-елементів	дріжджового автолізу	сульфату цинку	сульфату міді	хлориду калію	
-	-	+	+	+	4,7±0,24
-	-	+	+	-	5,2±0,26

Одержані результати свідчать, що за наявності сульфату міді і цинку у середовищі з 2 % технічного гліцерину концентрація синтезованих ПАР досягала максимального значення (5,2 г/л). Ці дані узгоджуються з одержаними раніше про те, що внесення у середовище з очищеним гліцерином сульфату міді (0,15—0,17 мкмоль/л), сульфату цинку (37—39 мкмоль/л) і хлориду калію (0,20—0,22 ммоль/л) дає змогу виключити зі складу середовища суміш мікроелементів і дріжджовий автолізат [9]. Слід зазначити, що у разі культивування штаму ІМВ В-7241 на технічному гліцерині (на відміну від вирощування на очищеному субстраті) немає необхідності у внесенні у середовище КСІ (тал. 1). Це зумовлено тим, що технічний гліцерин містить у своєму складі достатньо велику кількість катіонів калію [1—8].

Дані про синтез ПАР *A. salcoaceticus* ІМВ В-7241 на середовищі з різними концентраціями технічного гліцерину наведено у табл. 2.

*Таблиця 2. Вплив концентрації технічного гліцерину у середовищі культивування *A. salcoaceticus* ІМВ В-7241 на синтез ПАР*

Концентрація гліцерину у середовищі, %	Тривалість культивування, год	
	120	168
2	5,2±0,26	5,2±0,26
3	5,2±0,26	5,2±0,26
4	5,0±0,25	5,2±0,26
5	4,0±0,20	4,2±0,21
6	3,9±0,19	4,0±0,20

Отже, підвищення концентрації технічного гліцерину у середовищі до 6% супроводжувалося зниженням синтезу ПАР, причому збільшення тривалості культивування продуцента не приводило до підвищення концентрації синтезованих поверхнево-активних речовин.

Важливим фактором, що впливає на синтез мікробних вторинних метаболітів, є співвідношення С/Н у середовищі культивування продуцентів [7]. У попередніх дослідженнях було встановлене оптимальне для синтезу ПАР *A. salcoaceticus* ІМВ В-7241 співвідношення вуглець/азот [11]. Проте у процесі даних досліджень, підвищуючи концентрацію технічного гліцерину в середовищі (див. табл. 2), ми не змінювали вміст азоту, тому на наступному етапі вивчали синтез ПАР за умов росту штаму ІМВ В-7241 на середовищі, в якому концентрація азоту була збільшена (табл. 3).

Наведені у табл. 3 дані свідчать, що за концентрації сечовини 0,7—0,9 г/л у середовищі з 6—8 % технічного гліцерину концентрація синтезованих ПАР була максимальною і становила 5,9—6,1 г/л.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ, МИКРОБИОЛОГИЯ

**Таблиця 3. Вплив концентрації азоту і технічного гліцерину на синтез ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241**

Концентрація гліцерину, %	Концентрація сечовини, г/л	ПАР, г/л
6	0,6	5,3±0,26
	0,7	5,9±0,29
	0,8	6,1±0,30
Концентрація гліцерину, %	Концентрація сечовини, г/л	ПАР, г/л
6	0,9	6,1±0,30
	1,0	5,0±0,25
7	0,6	5,0±0,25
	0,7	6,0±0,30
	0,8	6,1±0,30
	0,9	5,9±0,29
	1,0	5,3±0,26
8	0,6	4,9±0,24
	0,7	6,0±0,30
	0,8	6,0±0,30
	0,9	6,0±0,30
	1,0	5,0±0,25

З літератури відомо, що показники синтезу ПАР за умов росту продуцентів на технічному гліцерині є суттєво нижчими, ніж на очищеному субстраті. Так, *Bacillus subtilis* LSFМ-05 на середовищі з 5 % технічного гліцерину синтезував 1,36 г/л сурфактину [12]. У процесі вирощування *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 на середовищі з попередньо гідролізованим (обробка сірчаною кислотою) технічним гліцерином (5 %) концентрація рамноліпідів становила 1,27 г/л [4]. Штам *Starmerella bombicola* ATCC 22214 синтезував до 6,6 г/л софороліпідів на середовищі, що містило 15 % технічного гліцерину та/або 10 % соняшникової олії [13]. Результати наших досліджень засвідчують, що штам *A. calcoaceticus* IMB В-7241 за показниками синтезу ПАР на технічному гліцерині не поступається описанам у літературі і навіть суттєво перевершує деякі з них.

### Висновки

Отже, у результаті проведеного дослідження встановлено, що підвищення вмісту сечовини у 2—2,5 раза у середовищі культивування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 дало змогу підвищити концентрацію синтезованих поверхнево-активних речовин і вміст технічного гліцерину з 2 до 6—8 % (об'ємна частка).

### Література

1. Rivaldi J.D., Sarrouh B.F., Branco R.de F., de Mancilha I.M., da Silva S.S. Biotechnological utilization of biodiesel-derived glycerol for the production of ribonucleotides and microbial biomass // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2012. — Vol. 167, № 7. — P. 2054—2067.
2. da Silva G.P., Mack M., Contiero J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology // *Biotechnol. Adv.* — 2009. — Vol. 27, № 1. — P. 30—39.

3. Silva S.N., Farias C.B., Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 // Colloids Surf. B: Biointerfaces. — 2010. — Vol. 79, № 1. — P. 174—183.

4. de Sousa J.R., Correia J.A., de Almeida J.G.L., Rodrigues S., Pessoa O.D.L., Melo V.M.M., Gonçalves L.R.B. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02 // Proc. Biochem. — 2011. — Vol. 46, № 9. — P. 1831—1839.

5. Liu Y., Koh C.M.J., Ji L. Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis* // Bioresour Technol. — 2011. — Vol. 102, № 4. — P. 3927—3933.

6. Шулякова М.О., Мащенко О.Ю., Хом'як Д.І. Синтез поверхнево-активних речовини на відходах виробництва біодизелю у *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 та *Nocardia vaccinii* K-8 // Ukrainian food journal. — 2012. — № 2. — С. 43—46.

7. Posada J.A., Cardona C.A., Gonzalez R. Analysis of the production process of optically pure D-lactic acid from raw glycerol using engineered *Escherichia coli* strains // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2012. — Vol. 166, № 3. — P. 680—699.

8. Louhasakul Y., Cheirsilp B. Industrial waste utilization for low-cost production of raw material oil through microbial fermentation // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2013. — Vol. 169, № 1. — P. 110—122.

9. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Мащенко О.Ю., Парфенюк С.А., Иутинская Г.А. Влияние факторов роста и некоторых микроэлементов на синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 // Микробиол. журнал. — 2013. — Т. 75, № 5. — С. 19—27.

10. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: Наук. думка, 2010. — 327 с.

11. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // Appl. Biochem. Microbiol. — 2009. — Vol. 45, № 3. — P. 272—278.

12. de Faria A. F., Teodoro-Martinez D. S., de Oliveira Barbosa G. N., Vaz B. G., Silva I. S., Garcia J. S., Totola M. R., Eberlin M. N., Grossman M., Alves O. L., Durrant L. R. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry // Proc. Biochem. — 2011. — Vol. 46, № 9. — P. 1951—1957.

13. Wadekar S.D., Kale S.B., Lali A.M., Bhowmick D.N., Pratap A.P. Utilization of sweetwater as a cost-effective carbon source for sophorolipids production by *Starmerella bombicola* (ATCC 22214) // Prep. Biochem. Biotechnol. — 2012. — Vol. 42, № 2. — P.125—142.

## **БИОКОНВЕРСИЯ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА БИОДИЗЕЛЯ В ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241**

Т.П.Пирог, М.А. Шулякова

Национальный университет пищевых технологий

В статье исследована возможность повышения содержания технического глицерина (побочный продукт производства биодизеля, глицериновая фракция) в

среде культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 — продуцента поверхностно-активных веществ (ПАВ). Максимальные показатели синтеза ПАВ (5,9—6,1 г/л) наблюдались при внесении в среду с глицериновой фракцией сульфата меди (0,16 мкмоль/л), сульфата цинка (38 мкмоль/л), а также повышении содержания мочевины до 0,7—0,9 г/л. В таких условиях культивирования удалось увеличить концентрацию технического глицерина до 8 % (по объему), что в 4 раза выше по сравнению с содержанием в базовой среде. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности биоконверсии отходов производства биодизеля в микробные поверхностно-активные вещества *A. calcoaceticus* IMB B-7241.

**Ключевые слова:** *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, отходы производства биодизеля, поверхностно-активные вещества, биосинтез, культивирование.