

# 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:

Acinetobacter Calcoaceticus IMV B-7241,  
Nocardia vaccinii IMV B-7405,  
oil-containing substrate,  
microbial surfactants

## Article history:

Received 1.11.2014  
Received in revised form  
10.11.2014  
Accepted 20.11.2014

## Corresponding author:

skrotska@ya.ru

## ABSTRACT

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.

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.

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 IMV B-7241 І NOCARDIA VACCINII IMV 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 соняшnikової олії як субстрату для біосинтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter Calcoaceticus* IMV B-7241 і *Nocardia Vaccinii* IMV B-7405. Встановлено, що збільшення концентрації соняшnikової олії у базовому середовищі культивування штамів IMV B-7405 та IMV 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* IMV B-7241 на середовищі з 6–7 % соняшnikової 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* IMV B-7241, *Nocardia Vaccinii* IMV 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 емульгуювальними 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 софоролінідів 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 соняшникову 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 поживний 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 повторах, 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 C/N в середовищі культивування продуцентів [8]. У попередніх дослідженнях [8, 10] нами було встановлено оптимальне співвідношення C/N 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 азоту 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 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 san-ai* / 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 і Nocardia vaccinii ІМВ В-7405 на промислових відходах* / Пирог Т. П., Софилканич А. П., Покора К. А., Шевчук Т. А., Іутињська Г. А. // Микроб. журн. — 2014. — Т. 76, № 2. С. 17—23.
5. *Biosurfactant synthesis by Rhodococcus erythropolis ІМВ Ас -5017, Acinetobacter calcoaceticus ІМВ В-7241, Nocardia vaccinii ІМВ В-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 ІМВ Ас-5017, Acinetobacter calcoaceticus ІМВ В-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. *Інтенсифікація технологій мікробного синтезу* / Подгорський В.С., Іутињська 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.*