

## **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:**

npnufit@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* UCP 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 seracia* 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 — штамп *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;  $\text{NaCl}$  — 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 соняшникову 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 °C 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 г 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 супернатанту 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 °C 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 Лакінім [11]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості  $p < 0,05$ .

**Результати і обговорення.** У [9] було показано, що використання інкуляту, 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 інкуляту 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 в 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* IMB В-7241 на різних олієвмісних субстратах

| Олія у середовищі культивування       | E <sub>24</sub> (%) 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* IMB 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* IMB В-7241 *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 на підсоленому маслі / І.Ю. Павлюковець, Л.В. Никитюк, Т.П. Пирог, К.А. Береговая // *Електронний науковий журнал «Апріорі. Серія: естественные и технические науки»*. — 2014. — № 5. — 10 с. — Режим доступу: <http://apriori-journal.ru/journal-estesvennie-nauki/last-number>.
9. Синтез поверхностно активних речовин *Rhodococcus erythropolis* IMB Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 И *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 на промислових відходах / Т.П. Пирог, А.П. Софілканіч, К.А. Покора, Т.А. Шевчук, Г.А. Іутинская // *Мікробіологічний 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 Ас-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.