

УДК 759.873.088.5:661.185

СИНТЕЗ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 И *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 НА ПОДСОЛНЕЧНОМ МАСЛЕ

Павлюковец Ирина Юрьевна

студент

Никитюк Лилия Викторовна

студент

Береговая Кристина Андреевна

аспирант

Пирог Татьяна Павловна

д-р биол. наук

Национальный университет пищевых технологий, Киев (Украина)

author@apriori-journal.ru

Аннотация. Показана возможность замены традиционных дорогостоящих субстратов (*n*-гексэдекан и этанол) для биосинтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на дешевый и доступный – подсолнечное масло. При повышении концентрации подсолнечного масла в среде с 2 до 5 % наблюдали снижение концентрации ПАВ, синтезируемых штаммами IMB B-7405 и IMB B-7241. Увеличение в 2-3 раза содержания источника азота позволило реализовать биосинтез ПАВ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на среде, содержащий 4-5 % подсолнечного масла. Полученные результаты являются основой для разработки технологии ПАВ на маслосодержащих промышленных отходах.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241; *Nocardia vaccinii* IMB B-7405; подсолнечное масло; поверхностно-активные вещества.

SYNTHESIS SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 AND *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 ON SUNFLOWER OIL

Pavlyukovets Irina Yurievna

student

Nikityuk Lilia Viktorovna

student

Beregovaya Kristina Andreevna

post-graduate student

Pirog Tatiana Pavlovna

doctor of biological sciences

National university of food technologies, Kyiv (Ukraine)

Abstract. It was shown that traditional expensive substrates (n-hexadecan and ethanol) for synthesis surface-active (SAS) biosynthesis of *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 can be replaced on cheap and widespread (sunflower oil). Increasing of sunflower oil concentration from 2 to 5 % in a medium was accompanied by decreasing concentration of the SAS, synthesized by strains IMV B-7405 and IMV B-7241. Increase of nitrogen source in the medium in 2-3 times allowed to realize biosynthesis of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 surfactants in the medium containing 4-5 % of sunflower oil. The obtained results are the basis for the development of the technology of surfactants on the oil-containing industrial wastes.

Key words: *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241; *Nocardia vaccinii* IMV B-7405; sunflower oil; surfactants.

Синтетические поверхностно-активные веществ (ПАВ) являются одними из наиболее востребованных на рынке химических соединений. Они используются в различных отраслях промышленности, медицине и сельском хозяйстве. Ежегодно производство синтетических ПАВ составляет около 13 млн т в год [1]. Однако существенным их недостатком является токсичность и устойчивость к биологической деструкции. Альтернативной заменой синтетическим ПАВ могут стать микробные поверхностно-активные вещества, лишенные этих недостатков [1; 3]. ПАВ микробного происхождения характеризуются постоянством свойств в широком диапазоне температуры и pH, а также их можно получать на основе промышленных отходов [1-4].

Ранее [4-6] из загрязненных нефтью образцов почвы были выделены нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные как *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 и установлена их способность синтезировать метаболиты с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами на углеводородных и гидрофильных (этанол, глицерин) субстратах.

На сегодняшний день перспективными субстратами для получения микробных ПАВ являются различные растительные масла, в том числе и отработанные (пережаренные) [1-3]. Так, *Candida bombicola* ATCC22214 и *Candida antarctica* синтезировали 15,25 и 13,86 г/л софоролипидов на масле ятрофы (100 г/л) и соевом масле (65 г/л) соответственно [1; 2]. Выращивание *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 на среде с подсолнечным маслом (3,5 %) сопровождалось образованием 4,07 г/л ПАВ [3].

В то же время в литературе нам не удалось найти сведений о синтезе ПАВ на маслосодержащих субстратах бактериями родов *Acinetobacter* и *Nocardia*. В работе [7] мы установили возможность синтеза поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на отходах масло-жировой промышленности (фузы).

Отметим, что в Украине выбросы отработанного подсолнечного масла в окружающую среду не регламентируется, а одним из путей утилизации этого токсичного отхода является использование его в качестве субстрата в биотехнологических процессах.

В связи с изложенным выше цель данной работы – исследовать возможность синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на подсолнечном масле.

Материалы и методы

Объекты исследования – штаммы *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного Национальной академии наук Украины.

Штамм *A. calcoaceticus* IMB B-7241 выращивали в жидкой питательной среде, (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; NaCl – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,6; KH_2PO_4 – 0,14. В среду дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5 % (по объему) и раствор микроэлементов – 0,1 % (по объему). Раствор микроэлементов содержал (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; ЭДТА (трилон Б) – 0,5.

N. vaccinii IMB B-7405 культивировали в среде такого состава (г/л): NaNO_3 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1. Дополнительно в среду вносили дрожжевой автолизат (0,5 % по объему).

В качестве источника углерода использовали подсолнечное масло в концентрации 2–5 % (по объему). В одном из вариантов в среде культивирования обоих штаммов увеличивали в 2-3 раза содержание источника азота. В качестве посевного материала использовали культуры из экспоненциальной фазы роста, выращенные на соответствующих жидких средах, содержащих 1 % (по углеводам) мелассы в качестве источ-

ника углерода. Отметим, что с целью сокращения лаг-фазы в биотехнологических процессах в среде для получения инокулята и биосинтеза целевого продукта используют одинаковые субстраты [8]. Однако ранее [4] было показано, что использование инокулята, выращенного на мелассе, сопровождалось повышением синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на маслосодержащих отходах. Количество посевного материала составляло 10 % от объема питательной среды. Культивирование осуществляли в колбах объемом 750 мл с 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 28-30° С в течение 120 ч.

Способность к синтезу ПАВ оценивали по таким показателям: условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), а также количество синтезированных ПАВ (г/л), которые определяли как описано ранее [4-6; 8].

Все опыты проводили в трех повторностях. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Лакину [9].

Результаты и обсуждение

Данные по синтезу ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на средах с различными концентрациями подсолнечного масла представлены в табл. 1.

Результаты исследований показывают, что максимальная концентрация ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 (5,2 и 3,3 г/л соответственно) наблюдалась при содержании подсолнечного масла в среде, равном 2 %. Дальнейшее увеличение концентрации субстрата в среде до 4 и 5 % сопровождалось снижением показателей синтеза (причем как показателя ПАВ*, так и концентрации ПАВ).

Одним из факторов, определяющих эффективность технологий микробного синтеза, является соотношение С/Н в среде культивирования продуцентов практически ценных метаболитов [8]. В предыдущих исследованиях [8; 10] нами было установлено оптимальное соотноше-

ние C/N для биосинтеза ПАВ штаммами IMB B-7241 и IMB B-7405 на средах, содержащих 1-2 % этанола и глицерина. В данной работе, повышая до 5 % концентрацию подсолнечного масла в среде культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405, мы не изменяли содержание в ней источника азота.

Таблица 1

Синтез ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 в зависимости от концентрации подсолнечного масла в среде культивирования

Штамм	Концентрация подсолнечного масла, %	Условная концентрация ПАВ (ПАВ*)	Концентрация ПАВ, 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

Примечание. Концентрация мочевины и нитрата натрия в среде культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 0,35 г/л и 0,5 г/л соответственно.

Таблица 2

Влияния концентрации нитрата натрия и подсолнечного масла в среде культивирования *N. vaccinii* IMB B-7405 на синтез ПАВ

Концентрация подсолнечного масла, %	Концентрация NaNO ₃ , (г/л)	Концентрация ПАВ, (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

Поэтому на следующем этапе исследовали синтез ПАВ штаммами IMB B-7241 и IMB B-7405 на средах, в которых концентрация мочевины и нитрата натрия была увеличена в 2-3 раза по сравнению с их содержанием в исходной среде (табл. 2 и 3).

Данные, представленные в табл.2, свидетельствуют о том, что повышение концентрации источника азота до 1,0-1,5 г/л в среде культивирования *N. vaccinii* IMB B-7405, содержащей 3-4 % подсолнечного масла, не сопровождалось повышением концентрации ПАВ по сравнению с показателями на среде с 0,5 г/л нитрата натрия. Таким образом, оптимальная концентрация масла в среде культивирования штамма IMB B-7405, обеспечивающая максимальный синтез ПАВ, составляет 2-3 %, и дальнейшее повышение содержания ростового субстрата нецелесообразно.

Таблица 3

Синтез ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на среде с различным содержанием подсолнечного масла и мочевины

Концентрация подсолнечного масла, %	Концентрация $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, (г/л)	Концентрация ПАВ, (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

Другие закономерности наблюдали для штамма *A. calcoaceticus* IMB B-7241 (табл. 3). Повышение содержания мочевины в среде сопровождалось увеличением количества синтезируемых ПАВ. Максимальная концентрация ПАВ (7,3 г/л) достигалась на среде, содержащей 1 г/л мочевины и 4 % подсолнечного масла.

Отметим, что показатели синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на подсолнечном масле, сравнимы с показателями синтеза описанных в литературе других штаммов-продуцентов [1-3; 10; 11]. Так, количество рамнолипидов, образуемых *Pseudomonas* sp. IS 13428 на среде с 4 % кукурузного масла, составляло 7,6 г/л [11]. *P. aeruginosa* ATCC 27853 на среде с подсолнечным маслом (3,5 %) синтезировал 4,07 г/л ПАВ [3].

При культивировании *P. aeruginosa* UW-1 на среде, содержащей 6% соевого масла концентрация ПАВ составляла 14,5 г/л, но при использование такой же концентрации подсолнечного масла количество рамнолипидов не превышало 2 г/л [12].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и *N. vaccinii* IMB B-7405 на среде с повышенным содержанием подсолнечного масла. Эти данные являются основой для разработки технологии получения ПАВ с использованием в качестве субстрата отработанного (пережаренного) масла.

Список использованных источников

1. Joshi-Navare K., Khanvilkar P. and Prabhune A. Jatropha oil derived sophorolipids: production and characterization as laundry detergent additive // Biochem. Res. Int. 2013:169797. doi: 10.1155/2013/169797.
2. Accorsini F.R., Mutton M.R., Lemos E.M., Benincasa M. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate // Braz. J. Microbiol. 2012. V. 43. № 1. P. 116-125.
3. Rikalovic M.G., Gojgic-Cvijovic G., Vrvic M.M. and Karadzic I. Production and characterization of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai // J. Serb. Chem. Soc. 2012. V. 77. № 1. P. 27-42.
4. Пирог Т.П., Софилканич А.П., Покора К.А., Шевчук Т.А., Иутинская Г.А. Синтез поверхностно активных веществ *Rhodococcus erythropolis*

- IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 И *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на промышленных отходах // Микроб. журн. 2014. Т. 76. № 2. С. 17-23.
5. Pirog T., Shulyakova M., Sofilkanych A., Shevchuk T., Maschenko O. Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac -5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on byproduct of biodiesel product // Food Bioprod. Proces. 2013. DOI 10.1016/j.fbp.2013.09.003.
 6. 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. V. 45. № 3. P. 272-278.
 7. 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 Bioprod. Proces. 2013. V. 91. № 2. P. 149-157.
 8. Подгорский В.С., Иутинская Г.О., Пирог Т.П. Интенсификация технологий микробного синтеза. Киев: Наук. думка, 2010. 327 с.
 9. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа.1990, 352 с.
 10. Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Яцук Д.В., Боровик О.О. Вплив умов культивування на синтез поверхнево-активних речовин *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на гліцерині // Наукові праці НУХТ. 2012. № 44. С. 17-21.
 11. Soniyamby A.R, Praveesh B.V, Vimalin-Hena J., Kavithakumari P., Lalitha S., Palaniswamy M. Enhanced production of biosurfactant from isolated *Pseudomonas* sp growing on used edible oil // J. Am. Sci. 2011. V. 3. № 1. P. 50-52.
 12. Pratap A., Wadekar S., Kale S. et ect. Non-traditional oils as newer feedstock for rhamnolipidsp production by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) // J. Am. Oil Chem. Soc. 2011. V. 88. № 1. P. 1935-1943.