

## ИНТЕНСИФИКАЦИЯ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241 НА ОТРАБОТАННОМ ПОДСОЛНЕЧНОМ МАСЛЕ

Пирог Т.П.<sup>1,2</sup>, Никитюк Л.В.<sup>1</sup>, Антонюк С.И.<sup>1</sup>,  
Шевчук Т.А.<sup>2</sup>, Иутинская Г.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный университет пищевых технологий,  
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

**Цель.** Установить условия культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 на отработанном (пережаренном) подсолнечном масле различного качества, обеспечивающие максимальные показатели синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ). **Методы.** *A. calcoaceticus* IMB B-7241 выращивали в жидкой среде, содержащей 2–6% отработанного после жарки картофеля и мяса масла, в том числе и в присутствии предшественников биосинтеза (глюкоза, органические кислоты). Количество синтезированных ПАВ определяли весовым методом после экстракции из супернатанта культуральной жидкости смесью хлороформа и метанола (2:1), эмульгирующие свойства – по индексу эмульгирования культуральной жидкости с использованием подсолнечного масла в качестве субстрата. **Результаты.** Наиболее высокие показатели синтеза ПАВ на всех исследуемых субстратах наблюдались при использовании посевного материала, выращенного на соответствующем пережаренном масле. Максимальная концентрация ПАВ ( $8,5 \pm 0,42$  и  $7,9 \pm 0,39$  г/л) достигалась при культивировании штамма IMB B-7241 на отработанном после жарки мяса (4%) и картофеля селянского (6%) масле соответственно. При внесении в среду с 2% отработанного масла предшественников биосинтеза (глюкоза, 0,1%, фумарат калия, 0,01–0,1% и цитрат калия, 0,01–0,1%) концентрация ПАВ повышалась в 2,3–3,4 раза по сравнению с показателями на среде без глюкозы и органических кислот. Добавление в среду культивирования штамма IMB B-7241 фумарата и цитрата в виде натриевых солей не сопровождалось увеличением синтеза ПАВ, что обусловлено ингибирующим влиянием катионов натрия на активность ферментов анаэробной реакции (фосфоенолпируват-(ФЕП)-карбоксилаза) и биосинтеза ПАВ (ФЕП-карбоксикиназа, НАДФ<sup>+</sup>-зависимая глутаматдегидрогеназа). **Выводы.** Повышение в два раза концентрации отработанного масла и мочевины в среде культивирования штамма IMB B-7241 (до 4% и 0,7 г/л соответственно), а также замена рафинированного масла в среде для получения инокулята на отработанное сопровождалось увеличением количества синтезированных ПАВ более, чем в 4–5 раз по сравнению с показателями на базовой среде. Использование пережаренных масел для биосинтеза ПАВ позволит не только снизить себестоимость конечного продукта, но и утилизировать токсичные отходы, выбросы которых в окружающую среду в Украине не регламентируются.

**Ключевые слова:** *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, поверхностно-активные вещества, пережаренное подсолнечное масло, предшественники биосинтеза, интенсификация биосинтеза.

Большой проблемой современности является необходимость утилизации значительных количеств так называемых пищевых отходов, которые образуются как в процессе переработки сельскохозяйственной продукции, так и в домашних хозяйствах [1]. Около 38% отходов, к которым относятся и пережаренные растительные масла, образуется в процессе обработки пищевых продуктов [2]. Одним из вариантов утилизации пищевых отходов может быть экстракция из них и повторное использование практически ценных веществ (белков, полисахаридов, пищевых волокон и т.д.) [2]. Распространенным способом утилизации отработанного масла является использование его для производства биодизеля [3, 4]. Несмотря на экологические перспективы, данная технология имеет ряд недостатков: высокая стоимость, образование значительных объемов побочного продукта (технического глицерина), короткий срок хранения биодизеля [4].

Наиболее эффективным способом утилизации отработанных масел является использование их в качестве субстратов в биотехнологических процессах, в частности, для получения микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ). В работе [5] отмечается, что в настоящее время около 50% литературных данных по биоконверсии промышленных отходов в микробные ПАВ касается биосинтеза этих продуктов на основе именно маслосодержащих субстратов.

Ранее [6] нами была установлена возможность замены рафинированного подсолнечного масла на отработанное для синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241. Однако концентрация отработанного масла в среде культивирования штамма IMB B-7241 была невысокой и составляла 2%. В то же время, учитывая объемы производства подсолнечного масла в Украине (2,78 млн т/год) [www.saleprice.com.ua/ua/publications\_sunflower\_oil\_market], а следовательно, и количество образуемых в процессе его переработки и использования отходов, становится понятно, что для утилизации пережаренного масла биоконверсией в микробные ПАВ концентрация такого субстрата в среде культивирования продуцентов должна быть максимальной.

Из литературы известно, что в процессе жарки при температуре выше 180°C в маслах образуются различные токсические вещества [7, 8], которые могут быть потенциальными ингибиторами роста микроорганизмов и синтеза целевого продукта, причем состав отработанного масла зависит от типа приготовленного блюда, способа жарки и кратности использования масла.

Известно, что одним из подходов к повышению эффективности микробного синтеза является внесение в среду культивирования экзогенных предшественников биосинтеза [9]. Ранее [9–11] такой подход был использован нами для повышения показателей синтеза ПАВ *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *Nocardia vaccinii* IMB B-7241 на *n*-гексадекане, этаноле, очищенном и техническом глицерине.

В связи с изложенным выше целью работы – установить условия культивирования *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на отработанном (пережаренном) подсолнечном масле различного качества, обеспечивающие максимальные показатели синтеза ПАВ.

**Материалы и методы.** Объектом исследований являлся штамм *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, зарегистрированный в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины под номером ИМВ В-7241.

Штамм *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 выращивали в жидкой минеральной среде следующего состава (г/л):  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  – 0,35,  $\text{NaCl}$  – 1,0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 0,6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,14,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1, вода дистиллированная – до 1 л, рН 6,8–7,0. В среду также дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0,5% (по объему) и раствор микроэлементов – 0,1% (по объему), содержащий (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; ЭДТА (Трилон Б) – 0,5. В одном из вариантов концентрацию мочевины в среде повышали до 0,7–1,0 г/л.

В качестве источника углерода и энергии использовали рафинированное подсолнечное масло «Стожар» (компания Кернел, Киев), а также отработанное после жарки картофеля «Фри», картофеля селянского и мяса масло (сеть ресторанов быстрого питания McDonald's, Киев). Концентрация субстратов в среде – 2–6% (по объему).

В одном из вариантов в среду дополнительно вносили глюкозу (0,1%) в виде 40%-ного раствора, а также цитрат (0,01 и 0,1%) и фумарат (0,01 и 0,1%) в виде 10%-х растворов натриевых и калиевых солей. Внесение предшественников осуществляли в начале процесса культивирования и в конце экспоненциальной фазы роста продуцента. В одном из вариантов перед внесением органических кислот рН культуральной жидкости нейтрализовали подщелачиванием 1 н КОН.

В качестве инокулята использовали культуры в экспоненциальной фазе роста, выращенные на среде указанного выше состава, содержащей 0,5% (по объему) подсолнечного масла (рафинированного или отработанного), а также 0,5% (по углеводам) мелассы. Количество посевного материала ( $10^4$ – $10^5$  кл/мл) составляло 10% от объема питательной среды. Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 28–30°C в течение 5 сут.

Количество внеклеточных ПАВ определяли весовым методом после экстракции их смесью хлороформа и метанола (2:1) из супернатанта культуральной жидкости, как описано ранее [10, 11]. Для получения супернатанта культуральную жидкость центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин. Удаление остаточного подсолнечного масла из культуральной жидкости осуществляли путем трехкратной экстракции его петролейным эфиром (соотношение 1:1). Индекс эмульгирования разбавленной в 10 и 50 раз культуральной жидкости ( $E_{24}$ ) определяли, как описано ранее в работах [10, 11].

Для получения бесклеточных экстрактов бактериальную суспензию, полученную после культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 в жидкой минеральной среде, центрифугировали (4000 g, 15 мин, 4°C). Осадок клеток дважды отмывали от остатков среды 0,05 М  $\text{K}^+$ -фосфатным буфером (рН 7,0), центрифугируя (4000 g, 15 мин, 4°C). Отмытые клетки ресуспендировали в 0,05 М  $\text{K}^+$ -фосфатном буфере (рН 7,0) и разрушали ультразвуком (22 кГц) 3 раза по 40 с при 4°C на аппарате УЗДН-1. Дезин-

теграт центрифугировали (12000 g, 30 мин, 4°C), осадок отбрасывали, надосадочную жидкость использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Активность глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.2.), фосфоенолпируват-(ФЕП)-синтазы (КФ 2.7.9.2), ФЕП-карбоксикиназы (КФ 4.1.1.49), ФЕП-карбоксилазы (КФ 4.1.1.31) анализировали, как описано ранее [9–11].

Содержание белка в бесклеточных экстрактах определяли по Бредфорд [12]; активность ферментов определяли при 28–30°C – температуре, оптимальной для роста *A. calcoaceticus* IMB В-7241.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, как описано в работах [10, 11]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В табл. 1 представлены показатели синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на отработанном после жарки мяса и картофеля масле с использованием посевного материала, выращенного на различных углеродных субстратах. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что независимо от природы источника углерода в среде для получения инокулята (меласса, рафинированное или соответствующее отработанное масло), концентрация ПАВ и индекс эмульгирования культуральной жидкости после выращивания *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на отработанном после жарки мяса масле были выше, чем аналогичные показатели при культивировании бактерий на отработанном масле после жарки картофеля «Фри». При использовании отработанного масла для получения посевного материала концентрация синтезированных поверхностно-активных веществ была выше, чем при применении инокулята, выращенного на мелассе или рафинированном масле (5,0–8,5 и 1,5–4,5 г/л соответственно) (табл. 1).

**Таблица 1**

**Влияние способа подготовки инокулята на синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на отработанном подсолнечном масле (4 %)**

Субстрат для получения инокулята	Отработанное масло для биосинтеза ПАВ	Концентрация ПАВ, г/л	Индекс эмульгирования разбавленной в 50 раз культуральной жидкости, %
Рафинированное масло	После жарки картофеля «Фри»	3,9±0,19	42
	После жарки мяса	4,5±0,22	54
Меласса	После жарки картофеля «Фри»	1,5±0,08	45
	После жарки мяса	2,8±0,14	49
Отработанное масло после жарки картофеля «Фри»	После жарки картофеля «Фри»	5,0±0,25	50
Отработанное масло после жарки мяса	После жарки мяса	8,5±0,42	54

**Примечания.** При определении индекса эмульгирования погрешность не превышала 5%. Концентрация мочевины в среде – 0,7 г/л.

Отметим, что при повышении концентрации отработанного масла в среде культивирования штамма *IMB B-7241* до 4% (табл. 1) наблюдали увеличение концентрации ПАВ по сравнению с показателями, полученными при выращивании бактерий в среде с 2% субстрата (1,1–1,5 г/л) [6].

На следующем этапе концентрацию рафинированного и пережаренного масла в среде культивирования *A. calcoaceticus IMB B-7241* увеличивали до 6%, а концентрацию мочевины до 1,0 г/л (табл. 2). В этих исследованиях посевной материал выращивали на соответствующем отработанном масле. Кроме того, принимая во внимание литературные данные о том, что состав пережаренного масла зависит от типа приготовленного блюда, способа жарки и кратности использования масла [8], в качестве субстрата для биосинтеза ПАВ дополнительно к используемым ранее добавили отработанное масло после жарки картофеля селянского, технология приготовления которого отличается от картофеля «Фри».

Эксперименты показали, что повышение с 4 до 6% концентрации отработанного после жарки картофеля «Фри» и мяса в среде культивирования штамма *IMB B-7241* сопровождалось снижением количества синтезированных ПАВ в 1,3 раза (табл. 1 и 2).

**Таблица 2**

**Синтез поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus IMB B-7241* на рафинированном и отработанном подсолнечном масле**

Масло	Концентрация масла в среде, %	ПАВ, г/л
Рафинированное	4	3,4±0,17
	6	3,5±0,17
Отработанное после жарки картофеля «Фри»	4	5,0±0,25
	6	3,8±0,19
Отработанное после жарки картофеля селянского	4	Н.о.
	6	7,9±0,39
Отработанное после жарки мяса	4	8,5±0,42
	6	6,5±0,32

**Примечания.** Инокулят выращивали на соответствующем масле. Н.о. – не определяли. Концентрация мочевины в среде – 1,0 г/л.

Однако концентрация ПАВ, синтезированных *A. calcoaceticus IMB B-7241* в среде, содержащей 6% отработанного после жарки картофеля селянского масла, была выше, чем при использовании аналогичной концентрации отработанного масла после жарки картофеля «Фри» и мяса (табл. 2). Дальнейшие эксперименты показали, что индекс эмульгирования как нативной, так и разбавленной в 10 и 50 раз культуральной жидкости после выращивания *A. calcoaceticus IMB B-7241* на отработанном после жарки мяса и картофеля селянского масле был несколько выше, чем на отработанном после жарки картофеля «Фри» (50–64 и 49–56% соответственно).

Следующий этап был посвящен исследованию влияния экзогенных предшественников на синтез ПАВ при выращивании *A. calcoaceticus IMB B-7241* в среде с отработанным маслом.

Установлено, что добавление 0,1% глюкозы в среду с низким содержанием масла (2%) сопровождалось повышением концентрации синтезированных ПАВ в 3,4 и 2,5 раза на отработанном после жарки картофеля и мяса масле соответственно по сравнению с выращиванием штамма ИМВ В-7241 на среде без глюкозы (табл. 3), однако при внесении этого предшественника в среду с 4% отработанного масла концентрация ПАВ не повышалась по сравнению с таковой без глюкозы.

**Таблица 3**

**Влияние глюкозы на синтез ПАВ при культивировании  
*A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на отработанном масле**

Масло после жарки	Концентрация масла в среде, %	Наличие глюкозы	ПАВ, г/л
Картофеля селянского	2	–	1,8±0,09
		+	6,1±0,30
	4	–	6,6±0,33
		+	6,4±0,32
Мяса	2	–	1,2±0,06
		+	3,0±0,15
	4	–	8,3±0,41
		+	8,2±0,41

**Примечания.** Инокулят выращивали на соответствующем отработанном масле. Глюкозу вносили в начале процесса культивирования. Концентрация мочевины в среде с 2 и 4% масла составляла 0,35 и 0,7 г/л соответственно.

При добавлении в среду культивирования штамма ИМВ В-7241 с 2 и 4% масла фумарата натрия и цитрата натрия (0,01 и 0,1%), как отдельно, так и в смеси, не наблюдали увеличения концентрации ПАВ. В то же время замена натриевых солей органических кислот на калиевые и повышение их концентрации до 0,1% сопровождалась увеличением количества синтезированных ПАВ до 4,3 г/л, что в 2,3 раза больше, чем на среде без фумарата и цитрата (табл. 4).

Дальнейшие исследования показали, что при внесении калиевых солей фумарата и цитрата (по 0,1%) в среду культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, содержащую 4% отработанного масла, концентрация синтезированных ПАВ не повышалась.

**Таблица 4**

**Синтез ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на отработанном масле (2%) в присутствии калиевых солей органических кислот**

Органические кислоты	Концентрация, %	ПАВ, г/л
Фумарат	0,01	2,0±0,11
	0,1	2,9±0,14
Цитрат	0,01	1,8±0,09
	0,1	1,9±0,09
Фумарат + Цитрат	0,01+0,01	2,5±0,12
	0,1+0,1	4,3±0,21
Без органических кислот (контроль)	0	1,9±0,09

**Примечания.** Фумарат и цитрат калия вносили в начале стационарной фазы роста. Выращивание штамма ИМВ В-7241 осуществляли на отработанном масле после жарки картофеля селянского. Концентрация мочевины в среде составляла 0,35 г/л.

На последнем этапе определяли активность ферментов анаэробных путей и биосинтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 при внесении в среду с отработанным маслом органических кислот в виде калиевых и натриевых солей (табл. 5). Установлено, что в присутствии фумарата калия и цитрата калия активность всех исследуемых ферментов была в 1,4–2 раза выше, чем при культивировании штамма IMB В-7241 в среде без предшественников. Отметим, что при использовании натриевых солей органических кислот наблюдали снижение активности ферментов биосинтеза поверхностно-активных глико- (ФЕП-синтетаза, ФЕП-карбоксикиназа) и аминокислот (НАДФ<sup>+</sup>-зависимая глутаматдегидрогеназа) по сравнению с таковой на среде без фумарата и цитрата (табл. 5).

**Таблица 5**

**Влияние органических кислот на активность ферментов анаэробных путей и биосинтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на отработанном масле (2 %)**

Органические кислоты	Активность, нмоль·мин <sup>-1</sup> ·мг <sup>-1</sup> белка			
	ФЕП-синтетаза	ФЕП-карбоксикиназа	НАДФ <sup>+</sup> -зависимая глутаматдегидрогеназа	ФЕП-карбоксилаза
Фумарат калия + цитрат калия	8333±415	488±24	714±35	238±12
Фумарат натрия + цитрат натрия	4454±222	119±6	238±12	119±6
Без органических кислот (контроль)	5848±292	351±17	351±17	117±6

**Примечания.** Концентрация органических кислот – 0,1%. Выращивание штамма IMB В-7241 осуществляли на отработанном масле после жарки картофеля селянского. Концентрация мочевины в среде составляла 0,35 г/л.

**Обсуждение.** Более низкие показатели синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на отработанном масле после жарки картофеля «Фри» по сравнению с таковыми на масле после жарки мяса (табл. 1) могут быть обусловлены такими причинами. Из литературы [7, 8] известно, что в процессе жарки в масле происходят химические реакции окисления, гидролиза, изомеризации и полимеризации, в результате которых образуются свободные жирные кислоты, низкомолекулярные спирты, альдегиды, кетоны, лактоны, углеводороды, моно- и диглицериды, транс-изомеры и т.д. Интересно отметить, что степень ненасыщенности жирных кислот является основным фактором, влияющим на окислительную стабильность масла [8]. Растительные масла с более высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот (подсолнечное, льняное) окисляются быстрее, чем содержащие мононенасыщенные кислоты (оливковое), и именно в процессе жарки картофеля «Фри» во фритюрнице на подсолнечном масле образуется большое количество токсичных альдегидов [13], которые могут быть ингибиторами синтеза ПАВ.

Снижение количества синтезированных ПАВ при повышении концентрации отработанного после жарки мяса и картофеля «Фри» масла в среде культивирования штамма ИМВ В-7241 с 4 до 6% (табл. 1 и 2) можно объяснить наличием более высокого содержания в составе субстрата токсичных для продуцента соединений.

Интересно, что показатели синтеза ПАВ на отработанном масле после жарки картофеля «Фри» и селянского оказались различными (табл. 2). Эти результаты подтверждают литературные данные о влиянии технологии приготовления и типа блюд на состав пережаренного масла [8] и свидетельствуют о необходимости учета «качества» отработанного масла в процессе разработки той или иной биотехнологии с использованием его в качестве субстрата. Кроме того, данные, представленные в табл. 2, показывают, что концентрация ПАВ, синтезированных штаммом ИМВ В-7241 на отработанном масле любого качества, выше, чем на рафинированном.

Отметим, что показатели синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на пережаренном масле сопоставимы с данными литературы. Так, в работе [14] исследовали синтез рамнолипидов при выращивании *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 10145 в среде с отработанными пищевыми маслами. В таких условиях культивирования штамм синтезировал 2,8–7,5 г/л ПАВ. Другие исследователи показали, что культивирование *Bacillus pumilus* ССТ2487 на пережаренном подсолнечном масле (5%) сопровождалось образованием 5,7 г/л ПАВ [15]. Zainatul с соавт. [16] исследовали влияние различных концентраций отработанного подсолнечного масла (из ресторана быстрого питания) на синтез ПАВ штаммом *P. aeruginosa* USM-AR2. При культивировании штамма в колбах на среде с 18,4 г/л масла концентрация ПАВ составляла 4,7 г/л. Повышение концентрации пережаренного масла до 27,6 г/л приводило к снижению в 1,2 раза количества синтезированных ПАВ. Однако несмотря на большое количество работ, посвященных синтезу микробных ПАВ на отработанном масле [5], в доступной литературе нам не удалось обнаружить сведений о влиянии качества масла на образование целевого продукта.

Учитывая химический состав ПАВ, синтезированных *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 (комплекс нейтральных, amino- и гликолипидов), и тот факт, что основным компонентом комплекса являются гликолипиды, в качестве предшественников биосинтеза использовали глюкозу, фумарат (предшественник глюконеогенеза), а также цитрат (регулятор синтеза липидов) [9].

Ранее нами было установлено, что при одновременном внесении фумарата (0,01%) и цитрата (0,01%) в среду с очищенным глицерином или этанолом наблюдали увеличение на 100–200% количества синтезированных *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 ПАВ [10, 17, 18]. Результаты, представленные в данной работе, показали, что, в отличие от культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на этих гидрофильных субстратах, при выращивании бактерий на подсолнечном масле (2%)



повышение синтеза ПАВ наблюдали при использовании fumarата и цитрата в более высокой концентрации – 0,1% (табл. 4). Увеличение концентрации ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 при замене натриевых солей органических кислот на калиевые можно объяснить тем, что, согласно нашим предыдущим исследованиям [17], катионы натрия являются ингибиторами активности ферментов биосинтеза поверхностно-активных глико- и аминоклипидов у этого штамма. Кроме того, поскольку соли органических кислот лучше транспортируются в клетки бактерий при нейтральном значении pH [19], перед внесением предшественников pH культуральной жидкости доводили до нейтрального значения раствором КОН.

Результаты энзиматических исследований (табл. 5) согласуются с полученными ранее данными [17] об ингибировании катионами натрия активности ферментов биосинтеза ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241, а также подтверждают данные ростовых экспериментов о том, что добавление fumarата натрия и цитрата натрия в среду с отработанным маслом не сопровождается повышением концентрации поверхностно-активных веществ.

Отсутствие положительного влияния экзогенной глюкозы, fumarата и цитрата на синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в среде с 4% отработанного масла (табл. 3 и 4) может быть объяснено ингибированием транспорта этих предшественников в клетки бактерий токсичными соединениями, содержащимися в отработанном подсолнечном масле, концентрация которого в среде достаточно высокая.

Ранее [11] нами было показано, что при выращивании штамма IMB В-7241 в среде с 2% технического глицерина эффекта от внесения экзогенных органических кислот не наблюдали. Более того, в этом случае концентрация ПАВ даже снижалась на 20–25% по сравнению с показателями на среде без fumarата и цитрата. В работе [11] мы также предположили, что это может быть обусловлено ингибированием компонентами технического глицерина транспорта экзогенных органических кислот в клетки *A. calcoaceticus* IMB В-7241.

Отметим, что концентрация ПАВ, синтезируемых при выращивании *A. calcoaceticus* IMB В-7241 в среде с 4% отработанного масла, является достаточно высокой (до 8,5 г/л, табл. 1) и без дополнительного внесения в среду предшественников биосинтеза.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что повышение в два раза концентрации отработанного масла и мочевины в среде культивирования штамма IMB В-7241 (до 4% и 0,7 г/л соответственно), а также замена рафинированного масла в среде для получения инокулята на отработанное сопровождалось увеличением количества синтезированных ПАВ более, чем в 4–5 раз по сравнению с показателями на базовой среде. Использование отработанных масел для биосинтеза ПАВ позволит не только снизить себестоимость целевого продукта, но и утилизировать токсичные отходы, выбросы которых в окружающую среду в Украине не регламентируются.

# ІНТЕНСИФІКАЦІЯ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241 НА ВІДПРАЦЬОВАНІЙ СОНЯШНИКОВІЙ ОЛІЇ

Пирог Т.П.<sup>1,2</sup>, Никитюк Л.В.<sup>1</sup>, Антонюк С.І.<sup>1</sup>,  
Шевчук Т.А.<sup>2</sup>, Іутинська Г.О.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Національний університет харчових технологій,  
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна  
e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

## Резюме

**Мета.** Встановити умови культивування *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 на відпрацьованій (пересмаженій) соняшниковій олії різної якості, що забезпечують максимальні показники синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР). **Методи.** *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 вирощували в рідкому середовищі, що містило 2 – 6 % відпрацьованої після смаження картоплі і м'яса олії, у тому числі й за наявності попередників біосинтезу (глюкоза, органічні кислоти). Кількість синтезованих ПАР визначали ваговим методом після екстракції з супернатанту культуральної рідини сумішшю хлороформу і метанолу (2:1), емульгувальні властивості – за індексом емульгування культуральної рідини з використанням соняшnikової олії як субстрату. **Результати.** Найвищі показники синтезу ПАР на всіх досліджуваних субстратах спостерігалися у разі використання посівного матеріалу, вирощеного на відповідній пересмаженій олії. Максимальна концентрація ПАР ( $8,5 \pm 0,42$  і  $7,9 \pm 0,39$  г/л) досягалася під час культивування штаму ІМВ В-7241 на відпрацьованій після смаження м'яса (4%) і картоплі селянської (6%) олії відповідно. За внесення у середовище з 2% відпрацьованої олії попередників біосинтезу (глюкоза, 0,1%, фумарат калію, 0,01–0,1% і цитрат калію, 0,01–0,1%) концентрація ПАР підвищувалася у 2,3–3,4 рази порівняно з показниками на середовищі без глюкози і органічних кислот. Додавання в середовище культивування штаму ІМВ В-7241 фумарату і цитрату у вигляді натрієвих солей не супроводжувалося збільшенням синтезу ПАР, що зумовлено інгібуючим впливом катіонів натрію на активність ферментів анаплеротичної реакції (фосфоенолпіруват-(ФЕП)-карбоксилаза) і біосинтезу ПАР (ФЕП-карбоксикіназа, НАДФ<sup>+</sup>-залежна глутаматдегідрогеназа). **Висновки.** Підвищення в два рази концентрації відпрацьованої олії і сечовини в середовищі культивування штаму ІМВ В-7241 (до 4% і 0,7 г/л відповідно), а також заміна рафінованої олії в середовищі для отримання інокуляту на відпрацьовану супроводжувалося збільшенням кількості синтезованих ПАР більш, ніж у 4–5 разів порівняно з показниками на базовому середовищі. Використання пересмажених олій для біосинтезу ПАР дасть змогу не тільки знизити собівартість цільового продукту, а й утилізувати токсичні відходи, викиди яких в навколишнє середовище в Україні не регламентуються.

**Ключові слова:** *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, поверхнево-активні речовини, пересмажена соняшnikова олія, попередники біосинтезу, інтенсифікація біосинтезу

# INTENSIFICATION OF *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241 SURFACTANTS SYNTHESIS ON WASTE SUNFLOWER OIL

**Pirog T.P.**<sup>1,2</sup>, **Nikituk L.V.**<sup>1</sup>, **Antonuk S.I.**<sup>1</sup>, **Shevchuk T.A.**<sup>2</sup>,  
**Iutynskaya G.A.**<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National University of Food Technologies,  
68 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine  
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine  
e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

## Summary

**Aim.** To establish cultivation conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 on waste (refried) sunflower oil of various quality, which provide the maximal indicators of surfactants synthesis. **Methods.** *A. calcoaceticus* IMV B-7241 was grown in liquid medium containing 2 – 6 % oil after frying the potato and meat including in the presence of biosynthesis precursors (glucose, organic acids). The amount of synthesized surfactants was determined by the weight method after extraction from the supernatant of culture liquid with a mixture of chloroform and methanol (2:1), emulsifying properties according to emulsification index of culture liquid using sunflower oil as a substrate. **Results.** The highest indices of surfactant synthesis on all substrates were observed with using the inoculum grown on the corresponding fried oil. The maximum concentration of surfactants (8.5±0.42 and 7.9±0.39 g/l) was achieved under cultivation of IMV B-7241 strain on oil after frying meat (4%) and potato selyanski (6%) respectively. When the biosynthesis precursors (glucose, 0.1%, potassium fumarate, 0.01–0.1% and potassium citrate, 0.01–0.1%) were added into medium with 2% of the fried oil, the surfactants concentration was increased by 2.3–3.4 times in comparison with the indices on medium without glucose and organic acids. Addition of fumarate and citrate in form of sodium salts into the medium of IMB B-7241 strain cultivation was not accompanied by increasing surfactants synthesis due to inhibitory effect of sodium cations on activity of enzymes of anaplerotic reaction (phosphoenolpyruvate-(PEP)-carboxylase) and surfactants biosynthesis (PEP-carboxykinase, NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase). **Conclusions.** A doubling of waste oil and urea concentration in cultivation medium of IMV B-7241 strain (up to 4% and 0.7 g/l, respectively) and replacing refined oil in medium for inoculum obtaining by waste was accompanied by increasing amount of synthesized surfactants in 4–5 folds in comparison with those on the base medium. The using fried oils for surfactants biosynthesis will allow not only to reduce the cost of final product, but also to utilize toxic waste, emissions of which into the environment in Ukraine are not regulated.

**Keywords:** *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, surfactants, fried sunflower oil, precursors of biosynthesis, intensification of biosynthesis

1. Pleissner D, Lin C. Valorisation of food waste in biotechnological processes. Sustainable Chem. Proces. 2013; 1:21. doi:10.1186/2043-7129-1-21.
2. Baiano A. Recovery of biomolecules from food wastes – a review. Molecules. 2014; 19(9): 14821–42. doi: 10.3390/molecules190914821.
3. Hossain A, AlEissa M. Biodiesel fuel production from palm, sunflower waste cooking oil and fish byproduct waste as renewable energy and environmental recycling process. British Biotechnol. J. 2016; 10(4). doi: 10.9734/BBJ/2016/22338.

4. Panadare DC, Rathod VK. Applications of waste cooking oil other than biodiesel: a review. *IJChE*. 2015; 12(3): 55–76.
5. Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R, Nyayanit NV. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front. Microbiol.* 2014; 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00697.
6. Pirog TP, Sofilkanich AP, Pokora KA, Shevchuk TA, Iutinskaya GA. [Synthesis of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 on industrial waste]. *Microbiol. Zh.* 2014; 76(2): 18–24. Russian.
7. Bordin K, Kunitake MT, Aracava KK, Trindade CS. Changes in food caused by deep fat frying – a review. *Arch. Latinoam. Nutr.* 2013; 63(1): 5–13.
8. Zhang Q, Saleh AS, Chen J, Shen Q. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: a review. *Chem. Phys. Lipids.* 2012; 165(6): 662–81.
9. Pidhorskyy V, Iutinska G, Pirog T. Intensification of microbial synthesis technologies. K.: Nauk. Dumka, 2010. 327 p. Ukrainian.
10. Pirog TP, Shevchuk TA, Konon AD, Dolotenko EYu. Production of surfactants by *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 grown on ethanol with organic acids. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2012; 48(6): 569–76. doi:10.1134/S0003683812040102.
11. 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 production. *Food Bioprod. Proces.* 2015; 93(1): 11–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.09.003>.
12. Bradford M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(3): 248–54.
13. Guillén MD, Uriarte PS. Aldehydes contained in edible oils of a very different nature after prolonged heating at frying temperature: Presence of toxic oxygenated  $\alpha,\beta$  unsaturated aldehydes. *Food Chem.* 2012; 131(3): 915–26.
14. Wadekar SD, Kale SB, Lali AM, Bhowmick DN, Pratap AP. Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2012; 42(4): 249–66.
15. Oliveira JG, Cruz CHG. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2013; 56(1): 155–60.
16. Zainatul AS, Yusof SZ, Asshifa MS. Fed-batch production of valuable biosurfactant, rhamnolipid, from waste cooking oil by indigenously isolate *Pseudomonas aeruginosa* USM-AR2. *Adv. Environ. Biol.* 2014; 8(14): 33–8.
17. Pirog TP, Antonyuk SI, Konon AD, Shevchuk TA, Parfenyuk SA. [Influence of pH on synthesis of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 biosurfactants]. *Microbiol. Zh.* 2013; 75(3): 40–8. Russian.
18. Pirog TP, Konon AD. Improvement of the technology for surfactant synthesis by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241. *Biotechnologia acta.* 2015; 8(5): 27–38. doi: 10.15407/biotech8.05.027.
19. Ivanovskiy RN. Bioenergy and transport of substrates in bacteria. M.: MAKSPress, 2001, 46. Russian.

Отримано 20.04.2017