

УДК 759.873.088.5:661.185

*Т. П. ПИРОГ, И. В. ПАВЛЮКОВЕЦ, Н. А. ИВАХНЮК, И. В. САВЕНКО*

**БИОТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЯМИ РОДА *ACINETOBACTER*  
ОТРАБОТАННОГО ПОДСОЛНЕЧНОГО МАСЛА  
В ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА И ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ**

*Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина, e-mail: tapirog@nuft.edu.ua*

Установлена возможность замены рафинированного подсолнечного масла для синтеза поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на дешевые и доступные субстраты (нерафинированное, отработанное после жарки картофеля и мяса масло). При использовании инокулята, выращенного на рафинированном масле, количество синтезированных на отработанном подсолнечном масле поверхностно-активных веществ и экзополисахаридов было выше, чем на очищенном (рафинированном) субстрате.

*Ключевые слова:* *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Acinetobacter* sp. IMB B-7005, поверхностно-активные вещества, экзополисахариды, отработанное подсолнечное масло, биосинтез.

*T. P. PIROG, I. V. PAVLUCOVETS, N. A. IVAHNIUK, I. V. SAVENKO*

**BIOTRANSFORMATION OF WASTE SUNFLOWER OIL BY BACTERIA GENUS *ACINETOBACTER*  
IN SURFACTANTS AND EXOPOLYSACCHARIDIES**

*National University of Food Technologies, Kiev, Ukraine, e-mail: tapirog@nuft.edu.ua*

The possibility of refined sunflower oil replacing for surfactants and exopolysaccharides synthesis by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Acinetobacter* sp. IMB B-7005, on cheaper and affordable substrates (unrefined, waste after frying potato and meat oil) was shown. The quantity of synthesized surfactants and exopolysaccharides on waste sunflower oil was higher than on purified (refined) substrate with using inoculum grown on refined oil.

*Keywords:* *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Acinetobacter* sp. IMB B-7005, surfactants, exopolysaccharidies, waste sunflower oil, biosynthesis.

**Введение.** В последние несколько десятилетий микробные поверхностно-активные вещества (ПАВ) и экзополисахариды (ЭПС) являются объектом интенсивных исследований. Интерес к этим продуктам микробного синтеза обусловлен способностью ЭПС в невысоких концентрациях изменять реологические характеристики водных систем, а также способностью ПАВ снижать межфазное и поверхностное натяжение растворов и эмульгировать различные соединения [1–3].

Ранее [4] нами были выделены штаммы бактерий, идентифицированные как *Acinetobacter* sp. 12S (IMB B-7005) и *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 (IMB B-7241), и установлена их способность к синтезу экзополисахаридов и поверхностно-активных веществ соответственно, разработаны технологии получения этих микробных продуктов на различных углеродных субстратах (этанол, глюкоза, глицерин, гексадекан и др.). Однако возможность практического использования микробных ПАВ и ЭПС зависит прежде всего от экономической эффективности их производства. Одним из способов удешевления технологии продуктов микробного синтеза является использование дешевых ростовых субстратов, например отходов других производств.

Ежегодно в мире производится около 160 млн т растительных масел, причем на долю основных четырех видов – подсолнечного, соевого, рапсового и пальмового – приходится 90 % всей мировой торговли и 75 % всего объема производства (<http://www.eurasiancommission.org>). На предприятиях, перерабатывающих растительное сырье, образуется значительное количество отходов. Однако наиболее дешевым маслосодержащим отходом является отработанное (пережаренное)

масло, накапливающееся как на пищевых предприятиях, так и в учреждениях общественного питания. Отметим, что только в Европе ежедневно образуется 1,85–2,65 млн л отработанного растительного масла [5].

Микробные ПАВ представляют собой липиды (нейтральные, глико-, amino- и фосфолипиды) [1–3]. Поэтому различные растительные масла являются подходящими субстратами для их синтеза [6, 7]. В то же время большинство микробных полисахаридов получают на основе углеводного сырья [4]. В доступной литературе нам не удалось обнаружить сведений о синтезе ЭПС, а также микробных ПАВ представителями рода *Acinetobacter* на маслосодержащих субстратах.

Цель работы – изучить возможность использования отработанного подсолнечного масла для синтеза поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* IMB B-7241 и экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. IMB B-7005.

**Объекты и методы исследования.** Объекты исследования – штаммы *A. calcoaceticus* K-4 и *Acinetobacter* sp. 12S, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины под номерами IMB B-7241 IMB B-7005 соответственно.

*A. calcoaceticus* IMB B-7241 выращивали в жидкой минеральной среде следующего состава (г/л):  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  – 1,0; 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, pH 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; KI – 0,0001; ЭДТА (Трилон Б) – 0,5.

*Acinetobacter* sp. IMB B-7005 культивировали в жидкой среде, содержащей (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 6,8; KOH – 0,9;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,4;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 0,6;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001, воду дистиллированную – до 1 л, pH 6,8–7,0. В среду дополнительно вносили 0,5 % (по объему) дрожжевого автолизата и в качестве источника пантотената (витамин  $\text{B}_5$ ) мультивитаминный комплекс «Комплевит» в концентрации 0,00095 % (в пересчете на пантотенат). *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 является ауксотрофом по пантотенату.

В качестве источника углерода и энергии использовали нерафинированное и рафинированное подсолнечное масло «Олейна» (Днепропетровский масло-экстракционный завод, Украина), а также отработанное после жарки картофеля и мяса масло (сеть ресторанов быстрого питания McDonald's, Киев). Концентрация субстратов в среде – 4–5 % (по объему).

В качестве инокулята использовали культуры в экспоненциальной фазе роста, выращенные на среде указанного выше состава, содержащей 0,5 % (по объему) подсолнечного масла (рафинированного, нерафинированного или отработанного), а также 0,5 % (по углеводам) мелассы. Количество посевного материала ( $10^4$ – $10^5$  кл/мл) составляло 5–10 % 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.

Биомассу определяли по оптической плотности клеточной суспензии, которую пересчитывали на сухую биомассу по калибровочному графику.

Количество внеклеточных ПАВ определяли весовым методом после экстракции их смесью хлороформа и метанола (2:1) из супернатанта культуральной жидкости, как описано ранее [8]. 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 петролевым эфиром (соотношение 1:1) согласно [9]. Индекс эмульгирования разбавленной в 50 раз культуральной жидкости ( $E_{24}$ ) определяли, как описано ранее в работе [8].

Количество синтезированных ЭПС устанавливали весовым методом после осаждения изопропанолом [10].

Синтезирующую способность определяли как отношение количества синтезированных ПАВ (ЭПС) к биомассе и выражали в ПАВ (ЭПС) в граммах на 1 г биомассы.

Все опыты проводили в трех повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных прово-

дили, как описано ранее в работе [8]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** В предыдущих исследованиях [11] было установлено, что при культивировании *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на рафинированном подсолнечном масле максимальная концентрация ЭПС наблюдалась при концентрации субстрата 5 %. В табл. 1 представлены показатели синтеза ЭПС в среде, содержащей такое же количество нерафинированного и отработанного подсолнечного масла.

На первом этапе исследований независимо от используемого субстрата в среде для синтеза ЭПС инокулят выращивали на рафинированном масле. Эксперименты показали, что при использовании такого посевного материала концентрация синтезированных на нерафинированном и отработанном после жарки мяса масле составляла 14,4–15,5 г/л, что в 1,2 раза выше, чем при культивировании *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на рафинированном субстрате (табл. 1). В то же время показатели синтеза ЭПС на отработанном после жарки картофеля были наиболее низкими: концентрация ЭПС и ЭПС-синтезирующая способность не превышали 4,2 г/л и 2,8–3,3 г ЭПС/г биомассы соответственно. Очевидно, в процессе жарки картофеля образуются вещества, ингибирующие синтез ЭПС.

На следующем этапе с целью снижения себестоимости целевого продукта для получения посевного материала использовали такие же субстраты, как и для синтеза ЭПС (табл. 1). Исследования показали, что использование инокулята, выращенного на нерафинированном и отработанном после жарки мяса масле сопровождалось снижением показателей синтеза ЭПС на этих субстратах по сравнению с аналогичными показателями после применения посевного материала, полученного на рафинированном масле. Однако при использовании отработанного после жарки картофеля масла как для получения инокулята, так и для биосинтеза концентрация ЭПС и ЭПС-синтезирующая способность были соответственно в 2 и 1,3 раза выше, чем показатели синтеза на этом субстрате с применением посевного материала, выращенного на рафинированном масле.

Т а б л и ц а 1. Синтез экзополисахаридов при культивировании *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на различных маслосодержащих субстратах

Источник углерода в среде для получения инокулята	Масло в среде для биосинтеза ЭПС, 5 %	ЭПС, г/л	ЭПС (в граммах)/г биомассы
Нерафинированное масло	Нерафинированное	10,7 ± 0,54	4,8 ± 0,19
Отработанное после жарки мяса масло	Отработанное после жарки мяса	9,7 ± 0,49	5,9 ± 0,29
Отработанное после жарки картофеля масло	Отработанное после жарки картофеля	8,1 ± 0,41	4,3 ± 0,22
Рафинированное масло	Рафинированное	13,1 ± 0,66	7,5 ± 0,38
	Нерафинированное	15,5 ± 0,78	4,9 ± 0,25
	Отработанное после жарки мяса	14,4 ± 0,72	6,3 ± 0,32
	Отработанное после жарки картофеля	4,2 ± 0,21	3,3 ± 0,17
Меласса	Рафинированное	8,4 ± 0,42	4,0 ± 0,29
	Нерафинированное	7,1 ± 0,36	3,7 ± 0,28
	Отработанное после жарки мяса	2,5 ± 0,13	1,6 ± 0,08
	Отработанное после жарки картофеля	3,7 ± 0,19	3,1 ± 0,21

В последующих экспериментах посевной материал выращивали на мелассе. Это было обусловлено тем, что углеводы мелассы, внесенные вместе с инокулятом в среду культивирования, могут являться предшественниками синтеза ЭПС и непосредственно включаться в его состав. Однако результаты показали, что по сравнению с применением посевного материала, выращенного на маслосодержащих субстратах, использование такого инокулята сопровождалось снижением показателей синтеза ЭПС (табл. 1). Мы предполагаем, что это явление может быть обусловлено, во-первых, увеличением длительности лаг-фазы вследствие адаптации продуцента к новому источнику углерода, во-вторых, наличием в составе мелассы потенциальных ингибиторов роста и синтеза ЭПС (бетаин), в-третьих, изменением соотношения C/N, поскольку меласса содержит органический азот. Выяснению этих вопросов будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Отметим, что большинство микробных экзополисахаридов получают на основе углеводов. При промышленном производстве ЭПС в качестве субстратов обычно используют продукты, получаемые из сахарной свеклы (меласса, сахарный сироп, сахароза) либо из кукурузы (крахмал, гидролизированный крахмал, глюкозный сироп, глюкоза, мальтоза) [4]. Однако в последнее время в литературе появляется информация об использовании других промышленных отходов для получения микробных ЭПС [12–16]. Так, *Pseudomonas oleovorans* NRRLB-14682 синтезирует около 12 г/л на отходах производства биодизеля [12]. *Acinetobacter* sp. DR1 при культивировании в среде с моторным маслом (2 %) образует 5 г ЭПС/г биомассы [13]. В обзорах [14, 15] сообщается о синтезе микробных полисахаридов из растительной биомассы (отходы агропромышленного комплекса: свекловичный жом, виноградный жмых, картофельные очистки и др.). В работе [15] имеется информация о синтезе микробных полисахаридов в среде, содержащей сточные воды производств по переработке оливок. На сегодняшний день известен штамм *Cellulomonas flavigena* UNP3, синтезирующий в среде с 1 % арахисового масла 1 г/л полисахарида [16]. При замене арахисового масла на кокосовое, оливковое, касторовое, кунжутное, горчичное или хлопковое показатели синтеза ЭПС снижались. Отметим, что в данных исследованиях использовали рафинированные, а не отработанные растительные масла.

Таким образом, наши данные, представленные в настоящей работе, являются одними из первых, касающихся образования микробных ЭПС на отработанном (пережаренном) подсолнечном масле.

В табл. 2 представлены показатели синтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на различных маслосодержащих субстратах.

Т а б л и ц а 2. Синтез ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в среде с подсолнечным маслом (4 %)

Источник углерода в среде для получения инокулята	Подсолнечное масло для биосинтеза ПАВ	ПАВ, г/л	E <sub>24</sub> , %
Меласса	Рафинированное	4,0 ± 0,20	56 ± 2,8
	Нерафинированное	2,3 ± 0,12	50 ± 2,5
	Отработанное после жарки картофеля	1,5 ± 0,08	49 ± 2,5
	Отработанное после жарки мяса	2,8 ± 0,14	54 ± 2,7
Рафинированное подсолнечное масло	Рафинированное	3,4 ± 0,17	51 ± 2,5
	Нерафинированное	3,3 ± 0,16	47 ± 2,3
	Отработанное после жарки картофеля	3,9 ± 0,19	52 ± 2,6
	Отработанное после жарки мяса	4,3 ± 0,21	54 ± 2,7

В данных исследованиях концентрация субстратов составляла 4 %, поскольку ранее [17] было установлено, что максимальное количество ПАВ наблюдалось при культивировании *A. calcoaceticus* IMB B-7241 в среде с таким содержанием рафинированного подсолнечного масла.

Эксперименты показали, что использование посевного материала, выращенного на мелассе, сопровождалось снижением в 1,7–2,7 раза количества синтезированных на нерафинированном и отработанном подсолнечном масле ПАВ по сравнению с показателями на очищенном (рафинированном) субстрате (табл. 2). При этом индекс эмульгирования разбавленной в 50 раз культуральной жидкости изменялся незначительно. Однако при замене мелассы в среде для получения посевного материала на рафинированное подсолнечное масло наблюдали повышение синтеза микробных ПАВ на отработанном и нерафинированном масле по сравнению с очищенным субстратом. Отметим, что при использовании посевного материала, выращенного на мелассе и подсолнечном масле, не отмечалось существенного изменения показателя индекса эмульгирования (табл. 2).

В литературе содержится достаточно много информации об использовании маслосодержащих субстратов для синтеза микробных ПАВ [6, 7, 18, 19]. Однако в большинстве работ культивирование продуцентов ПАВ осуществляют в основном на очищенных растительных маслах либо отходах масло-жировых производств (фузы). Получению микробных ПАВ на основе отработанных (пережаренных) масел посвящено не так много работ. В частности, показано, что *Pseudomonas fluorescence* MFS03 при выращивании в среде, содержащей 2 % отработанного растительного масла, синтезирует 4,2 г/л ПАВ [18]. Культивирование *Pseudomonas aeruginosa* PB3A на отрабо-

танном растительном масле (1 %) сопровождалось образованием 0,3–0,6 г/л ПАВ [19]. Полученные нами результаты по синтезу ПАВ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на отработанном подсолнечном масле сопоставимы с данными литературы, а в некоторых случаях даже превосходят их.

**Заключение.** Таким образом, в результате проведенной работы показана возможность замены рафинированного подсолнечного масла для синтеза экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. IMB В-7005 и поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* IMB В-7241 на более дешевые и доступные субстраты (нерафинированное, отработанное после жарки картофеля и мяса масло). Установлена зависимость показателей синтеза ЭПС и ПАВ на отработанном масле от способа подготовки посевного материала (в частности, природы источника углерода в среде для получения инокулята). Максимальные показатели синтеза ЭПС и ПАВ на отработанном масле наблюдались при использовании посевного материала, выращенного на рафинированном субстрате.

Преимуществом отработанных растительных масел как субстратов для получения практически ценных микробных продуктов по сравнению с другими промышленными отходами является то, что они не требуют предварительной обработки (в отличие, например, от лигноцеллюлозных, молочной сыворотки, технического глицерина) и стерилизации, а также содержат дополнительные питательные вещества. Кроме того, такие субстраты являются чрезвычайно дешевыми и доступными в больших количествах для использования в микробных технологиях. Отметим, что во многих странах (в том числе и в Украине) выбросы отработанного растительного масла в окружающую среду не регламентируются.

Замена традиционных субстратов для биосинтеза ПАВ и ЭПС отходами промышленных производств позволит снизить себестоимость технологии в несколько раз, а также утилизировать ненужные отходы и снять с предприятий проблему хранения или обезвреживания значительной массы отходов, на что расходуется огромное количество энергии и средств.

### Список использованной литературы

1. Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production / I. Finoreet [et al.] // *Mar. Drugs*. – 2014. – Vol. 12, N 5. – P. 3005–3024. – doi: 10.3390/md12053005.
2. Exopolysaccharides and antimicrobial biosurfactants produced by *Paenibacillus macerans* TKU029 / T. W. Liang [et al.] // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 172, N 2. – P. 933–950.
3. Surfactants tailored by the class *Actinobacteria* / J. H. Kügler [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – doi: 10.3389/fmicb.2015.00212.
4. Подгорский, В. С. Интенсификация технологий микробного синтеза / В. С. Подгорский, Г. О. Иутинская, Т. П. Пирог. – К.: Наук. думка, 2010. – 327 с.
5. Biodiesel production from waste cooking oil using sulfuric acid and microwave irradiation processes / P. D. Patil [et al.] // *J. Environ. Protection*. – 2012. – Vol. 3. – P. 107–113. – doi.org/10.4236/jep.2012.31013.
6. Bhardwaj, G. Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production / G. Bhardwaj, S. S. Cameotra, H. K. Chopra // *AMB Express*. – 2013. – Vol. 3. – doi: 10.1186/2191-0855-3-68.
7. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production / I. M. Banat [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2014. – Vol. 5. – doi: 10.3389/fmicb.2014.00697.
8. The influence of conditions of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis / T. P. Pirog [et al.] // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2009. – Vol. 45, N 3. – P. 272–278.
9. Raza, Z. A. Evaluation of distant carbon sources in biosurfactant production by a gamma ray-induced *Pseudomonas putida* mutant / Z. A. Raza, M. S. Khan, Z. M. Khalid // *Proc. Biochem.* – 2007. – Vol. 42, N 4. – P. 686–692.
10. Williams, A. G. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in continuous culture / A. G. Williams, W. T. Wimpenny // *J. Gen. Microbiol.* – 1978. – Vol. 104, N 1. – P. 47–57.
11. Ivahniuk, M. O. Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan synthesis under *Acinetobacter* sp. IMV В-7005 cultivation on sunflower oil / M. O. Ivahniuk, T. P. Pirog // *Ukr. Food J.* – 2014. – Vol. 3, N 2. – P. 257–262.
12. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol / F. Freitas [et al.] // *Proc. Biochem.* – 2010. – Vol. 45, N 3. – P. 297–305.
13. Kang, Y. S. Protection against diesel oil toxicity by sodium chloride-induced exopolysaccharides in *Acinetobacter* sp. strain DR1 / Y. S. Kang, W. Park // *J. Biosci. Bioeng.* – 2010. – Vol. 109, N 2. – P. 118–123.
14. Schmid, J. Scleroglucan: biosynthesis, production and application of a versatile hydrocolloid / J. Schmid, V. Meyer, V. Sieber // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 91, N 4. – P. 937–947.
15. Öner, E. T. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. In: Pretreatment techniques for biofuels and biorefineries / E. T. Öner; ed. Z. Fang. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. – 457 p.

16. Arli, S. D. Curdlan-like exopolysaccharide production by *Cellulomonas flavigena* UNP3 during growth on hydrocarbon substrates / S. D. Arli, U. B. Trivedi, K. C. Patel // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 27, N 6. – P. 1415–1422.
17. Павлюковец, И. Биоконверсия подсолнечного масла в поверхностно-активные вещества *Nocardia vaccinii* IMB В-7405 и *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 / И. Павлюковец [и др.] // Пищевая промышленность. – 2014. – № 16. – С. 23–27.
18. Govindammal, M. Production and characterization of biosurfactant using renewable substrates by *Pseudomonas fluorescence* isolated from mangrove ecosystem / M. Govindammal, R. Parthasarathi // J. Appl. Chem. – 2013. – Vol. 2, N 1. – P. 55–62.
19. Saravanan, V. Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* PB3A using agro-industrial wastes as a carbon source / V. Saravanan, V. Subramaniyan // Malays. J. Microbiol. – 2014. – Vol. 10, N 1. – P. 57–62.

Поступила в редакцию 30.04.2015