

УДК 579.841:577.114

EXOPOLYSACCHARIDE ETHAPOLAN SYNTHESIS ON MOLASSES AND WASTE OIL MIXTURE

A. Voronenko, M. Ivakhniuk, T. Pirog
National University of Food Technologies

Key words:

Acinetobacter sp. IMV B-7005, exopolysaccharide ethapolan, biosynthesis, mixture of molasses and waste oil

Article history:

Received 24.10.2016
Received in revised form 28.10.2016
Accepted 8.11.2016

Corresponding author:
voronenko67@mail.ru

ABSTRACT

The possibility to replace refined sunflower oil in mixture with molasses on different types of waste one (after meat, potato, vegetables frying and mixed after cooking different types of dishes) for biosynthesis of exopolysaccharide (EPS) ethapolan was studied. The highest synthesis indices (the amount of EPS was 13—15 g/l, EPS-synthesizing ability — 3,3—4,7 g EPS/ g biomass) were observed during growth of *Acinetobacter sp.* IMV B-7005 in medium without the source of mineral nitrogen, containing molasses and mixed waste oil, with using the inoculum which was grown on the corresponding oil. Using the waste oil instead of molasses for inoculum preparation allows to exclude sterilization and hydrolysis stages from the technological process. Obtained results are the basis for the development of universal technology of ethapolan production on industrial waste mixture, independent from the type and supplier of waste oil.

СИНТЕЗ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ МЕЛЯСИ І ВІДПРАЦЬОВАНОЇ ОЛІЇ

А.А. Вороненко,
М.О. Івахнюк,
Т.П. Пирог, д-р біол. наук
Національний університет харчових технологій

У статті досліджено можливість заміни рафінованої соняшникової олії у суміші з м'ясом на різні типи відпрацьованої олії (після смаження м'яса, картоплі, овочів і змішаної після приготування різних страв) для біосинтезу мікробного екзополісахариду (ЕПС) етаполану. Одержані результати є основою для розробки універсальної технології одержання етаполану на суміші промислових відходів, незалежної від типу та постачальника відпрацьованої олії.

Ключові слова: *Acinetobacter sp.* IMV B-7005, екзополісахарид етаполан, біосинтез, суміш м'яса та відпрацьованої олії.

Постановка проблеми. З кожним роком у світі приділяється дедалі більше уваги утилізації різноманітних промислових відходів, що зумовлено такими причинами: 1) небезпечність і токсичність більшості відходів; 2) щорічне збільшен-

ня обсягів їх накопичення; 3) можливість переробки дешевих відходів у практично цінні продукти.

Одним із таких відходів є відпрацьована соняшникова олія, глобальний обсяг споживання якої у 2015—2016 рр. становив понад 14 млн тонн. Зазначимо, що переважна частина такої олії використовується для смаження. Основними постачальниками даного відходу є ресторани, заклади швидкого та громадського харчування. На жаль, нині більшість відпрацьованої олії утилізується шляхом неконтрольованого зливання в каналізацію, що, у свою чергу, призводить до ряду економічних (швидке зношування трубопроводів [6]) та екологічних (1 л відпрацьованої олії може забруднити до 500 тис. л води [6]) проблем. Власне, накопичення таких великих обсягів відпрацьованої олії, її дешевизна, а також токсичність (містить канцерогенні речовини, токсичні хімічні сполуки [3]), й зумовило необхідність пошуку ефективних способів її переробки й утилізації.

Наразі основні обсяги відпрацьованої олії застосовують для виробництва біодизелю [4] та відгодівлі худоби [6]. Токсичні сполуки з пересмаженої олії можуть через м'ясо потрапляти до організму людини [4]. Ще одним перспективним способом переробки даного відходу є його використання в біотехнології як субстрату для одержання практично цінних продуктів мікробного синтезу: поверхнево-активних речовин, полігидроксиалканоатів, органічних кислот, ферментів, вітамінів тощо [6]. У сучасній літературі наявні лише поодинокі дані щодо використання олії для одержання мікробних екзополісахаридів (ЕПС) [7]. Так, штам *Cellulomonas flavigena* UNP3 на середовищі з 1% арахісової олії синтезував 1 г/л полісахариду, якому притаманні високі емульгувальні властивості [1]. Слід зазначити, що в даних дослідженнях як субстрат використовували звичайну, а не відпрацьовану олію. В оглядах [5; 7] наведено дані про синтез ксантану *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 S4LII на середовищі зі стічними водами виробництва оливкової олії. При концентрації субстрату 20% (об'ємна частка) штам NRRL B-1459 S4LII синтезував 7 г/л полісахариду.

У попередніх дослідженнях показано можливість синтезу мікробного полісахариду етаполану (продуцент *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005) на рафінованій і пересмаженій соняшниковій олії, а також на суміші меляси та рафінованої олії [8; 9].

Мета дослідження: дослідити можливість заміни рафінованої олії на відпрацьовану у суміші з мелясою для синтезу етаполану.

Матеріали і методи. Як об'єкт досліджень використовували ЕПС-синтезувальний штам *Acinetobacter* sp. 12S, депонований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології Національної академії наук України за номером ІМВ В-7005.

Штам ІМВ В-7005 вирощували у рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 — 6,8; KOH — 0,9; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,4; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NH_4NO_3 — 0,2; $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ — 0,001. В одному з варіантів використовували середовище без джерела азоту.

У середовище додатково вносили 0,5% (об'ємна частка) дріжджового автолізу, ністатин і стрептоміцин у концентрації 400 мкг/мл, а також мультівітамінний комплекс «Комплевіт» у концентрації 0,00085% (масова частка в перерахунку на пантотенат).

Як джерело вуглецю та енергії використовували суміш меляси (масова частка 1,5% за вуглеводами) і соняшникової олії: рафінованої «Стожар» (компанія Кернел, м. Київ), нерафінованої, відпрацьованої після смаження картоплі та м'яса (мережа ресторанів швидкого харчування Mcdonald's, м. Київ), відпрацьованої після смаження овочів (отримано в домашніх умовах), а також змішаної відпрацьованої (після смаження м'яса, картоплі, цибулі, сиру; «Rocke Pub», м. Київ) у концентрації 1,5% (об'ємна частка).

Оскільки продуцент етаполану не асимілює сахарозу, мелясу попередньо гідролізували: до 100 г меляси додавали дистильовану воду до кінцевого об'єму 200 мл, в отриманий розчин вносили 20 мл 1 н H_2SO_4 (до рН 4,0) і стерилізували при 112 °С протягом 30 хв.

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі з моносубстратами: 0,5% рафінованої, нерафінованої та відпрацьованої соняшникової олії, а також мелясою (0,5% за вуглеводами). Концентрація інокуляту становила 10%.

Культивування штаму ІМВ В-7005 здійснювали в колбах (750 мл) із 100 мл середовища на качалці (320 об./хв) при температурі 30 °С упродовж 120 год.

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з перерахунком на абсолютно суху біомасу (АСБ) згідно з калібрувальним графіком. Кількість синтезованого етаполану визначали ваговим методом. Для цього до певного об'єму культуральної рідини (зазвичай 10—15 мл) додавали 1,5—2 об'єми ізопропанолу, осад ЕПС промивали чистим ізопропанолом і висушували при кімнатній температурі упродовж 24 год. ЕПС-синтезувальну здатність розраховували як відношення концентрації ЕПС до концентрації АСБ та виражали у г ЕПС/г АСБ.

Статистичну обробку даних проводили за Лакінім [10]. Результати досліджень згідно з t-критерієм Стьюдента виявилися статистично достовірними при 5-відсотковому рівні значимості.

Результати досліджень. На першому етапі дослідження встановлювали принципову можливість синтезу етаполану на суміші меляси та відпрацьованої олії. У даних дослідженнях концентрація мінерального джерела азоту в середовищі для одержання інокуляту й біосинтезу становила 0,2 г/л. Експерименти показали, що незалежно від типу відпрацьованої олії в суміші з мелясою концентрація синтезованого полісахариду становила 12—15,5 г/л і була дещо вищою, ніж за використання рафінованої олії (11,5 г/л) (табл. 1).

Найвища ЕПС-синтезувальна здатність (3—4,5 г ЕПС/г АСБ) спостерігалася у процесі культивування продуцента на суміші меляси і змішаної або відпрацьованої після смаження овочів олії, найнижча (1,8 г ЕПС/г біомаси) — у разі використання олії після смаження м'яса (табл. 1). З літератури [2] відомо, що кількість токсичних сполук у відпрацьованій олії і її якість безпосередньо залежать не тільки від способу смаження та кратності використання, але й від типу приготовленої страви.

Раніше [8] було показано, що виключення або зниження концентрації джерела мінерального азоту в середовищі для одержання інокуляту та біосинтезу етаполану під час культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші меляси

та рафінованої олії супроводжувалося збільшенням показників синтезу полісахариду. У зв'язку з цим на наступному етапі досліджували синтез етаполану на суміші м'ясяси та відпрацьованої олії за умов росту штаму ІМВ В-7005 в середовищі без мінерального джерела азотного живлення.

Таблиця 1. Вплив концентрації джерела азоту в середовищі на синтез етаполану за умов росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші м'ясяси і відпрацьованої олії

Тип соняшникової олії у суміші з м'ясясою	Концентрація джерела азоту (г/л) для одержання інокуляту та біосинтезу ЕПС	Показники синтезу	
		ЕПС, г/л	г ЕПС/ г АСБ
Рафінована	0,2	11,59±0,58	2,68±0,13
	0	11,21±0,56	3,01±0,15
Нерафінована	0,2	13,00±0,65	2,04±0,10
	0	18,78±0,94	4,78±0,24
Відпрацьована після смаження картоплі «фрі»	0,2	13,71±0,69	2,75±0,14
	0	15,95±0,80	3,95±0,20
Відпрацьована після смаження картоплі по-селянськи	0,2	15,53±0,78	2,69±0,13
	0	15,67±0,78	2,61±0,13
Відпрацьована після смаження м'яса	0,2	12,24±0,61	1,84±0,09
	0	14,19±0,71	2,96±0,15
Відпрацьована після смаження овочів	0,2	12,43±0,62	3,29±0,16
	0	11,28±0,56	2,97±0,15
Змішана відпрацьована	0,2	14,92±0,75	4,68±0,23
	0	12,90±0,56	3,28±0,16

Примітка. Посівний матеріал вирощували на м'ясясі.

Проте виключення нітрату амонію з середовища для одержання посівного матеріалу та біосинтезу ЕПС не призводило до істотного підвищення показників синтезу полісахариду на суміші м'ясяси та відпрацьованої олії (концентрація ЕПС становила 11–16 г/л, а ЕПС-синтезувальна здатність – 2,5–4 г ЕПС/ г АСБ) (табл. 1).

У подальших дослідженнях з метою додаткового зниження собівартості цільового продукту інокулянт вирощували на відповідній відпрацьованій олії. Зазначимо, що на відміну від м'ясяси, олія не потребує стерилізації та попереднього гідролізу.

Встановлено, що за використання відпрацьованої після смаження картоплі, м'ясяси, овочів олії для одержання посівного матеріалу кількість синтезованого етаполану (9–12,5 г/л) була дещо нижчою порівняно із застосуванням вирощеного на м'ясясі інокуляту (табл. 1–2). Зазначимо, що під час дослідження синтезу ЕПС на олієвмісних моносустратах також спостерігали зниження показників синтезу етаполану у разі використання інокуляту, вирощеного на відпрацьованій олії [0]. На нашу думку, це може бути спричинено інгібуванням росту та синтезу ЕПС токсичними сполуками (альдегіди, вільні радикали тощо), що містяться в пересмаженій олії [2; 3; 9].

У той же час за використання змішаної відпрацьованої олії для одержання посівного матеріалу та біосинтезу ЕПС концентрація полісахариду становила

майже 14 г/л, а ЕПС-синтезувальна здатність – 3,5 г ЕПС/г АСБ (табл. 2). Такі результати демонструють можливість створення незалежної від сировинної бази технології синтезу етаполану на суміші відпрацьованої олії та меляси.

Таблиця 2. Синтез етаполану на суміші меляси і відпрацьованої олії з використанням вирощеного на відповідній олії інокуляту

Тип відпрацьованої олії в суміші з мелясою	Показники синтезу	
	ЕПС, г/л	г ЕПС/ г АСБ
Після смаження картоплі «фрі»	11,06±0,55	2,61±0,13
Після смаження картоплі по-селянськи	10,53±0,53	2,07±0,10
Після смаження м'яса	12,41±0,62	3,42±0,17
Після смаження овочів	9,29±0,46	2,95±0,15
Змішана	13,92±0,70	3,49±0,17

Примітка. Концентрація NH_4NO_3 в середовищі для одержання інокуляту становила 0,2 г/л, в середовищі для біосинтезу джерело мінерального азоту відсутнє.

Висновки. У результаті проведеного дослідження доведена можливість заміни рафінованої олії на різні типи відпрацьованої у суміші з мелясою для синтезу етаполану. Виключення джерела мінерального азоту з середовища для одержання інокуляту, а також використання змішаної відпрацьованої олії для вирощування посівного матеріалу та біосинтезу ЕПС дає змогу суттєво знизити собівартість цільового продукту і розробити високоефективну технологію отримання етаполану, незалежну від типу та постачальника відпрацьованої олії.

ЛІТЕРАТУРА

1. 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, № 6. — P. 1415—1422.
2. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: A review / Q. Zhang, A.S. Saleh, J. Chen, Q. Shen // Chem. Phys. Lipids. — 2012. — Vol. 165, № 6. — P. 662—681.
3. Guillén, M.D. Aldehydes contained in edible oils of a very different nature after prolonged heating at frying temperature: Presence of toxic oxygenated α,β unsaturated aldehydes / M.D. Guillén, P.S. Uriarte // Food Chemistry. — 2012. — Vol. 131, № 3. — P. 915—926.
4. Mangesh, G.K. Waste cooking oils an economical source for biodiesel: A review / G.K. Mangesh, K.D. Ajay // Ind. Eng. Chem. Res. — 2006. — Vol. 45, № 9. — P. 2901—2913.
5. Öner, E.T. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. In: Pretreatment techniques for biofuels and biorefineries / E.T. Öner. — B.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. — 457 p.
6. Panadare, D.C. Applications of waste cooking oil other than biodiesel: A review / D.C. Panadare, V.K. Rathod // Iran. J. Chem. Eng. — 2015. — Vol. 12, № 3. — P. 55—76.
7. Pirog, T.P. Exopolysaccharides synthesis on industrial waste / T.P. Pirog, M.O. Ivakhniuk, A.A. Voronenko // Biotechnologia Acta. — 2016. — Vol. 9, № 2. — P. 7—18.
8. Voronenko, A.A. The biosynthesis of microbial exopolysaccharide ethapolan under *Acinetobacter sp.* IMV B-7005 cultivation on molasses and sunflower oil mixture / A.A. Voronenko, M.O. Ivakhniuk // Materials of the XII International scientific and practical conference, «Science without borders». — 2016. — P. 31—34.

9. Івахнюк, М.О. Вплив способу підготовки посівного матеріалу на синтез полісахариду етаполану на олієвмісних субстратах / М.О. Івахнюк, Т.П. Пирог // Наукові праці НУХТ. — 2015. — Т. 21, № 5. — С. 17—21.

10. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: «Высшая школа», 1990. — 352 с.

СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА ЭТАПОЛАНА НА СМЕСИ МЕЛАССЫ И ОТРАБОТАННОГО МАСЛА

А.А. Вороненко, Н.А. Ивахнюк, Т.П. Пирог

Национальный университет пищевых технологий

В статье исследована возможность замены рафинированного подсолнечного масла в смеси с мелассой на различные типы отработанного масла (после жарки мяса, картофеля, овощей и смешанного после приготовления различных блюд) для биосинтеза микробного экзополисахарида (ЭПС) этаполана. Полученные результаты являются основой для разработки универсальной технологии получения этаполана на смеси промышленных отходов, независимой от типа и поставщика отработанного масла.

Ключевые слова: *Acinetobacter sp. ИМВ В-7005, экзополисахарид этаполан, биосинтез, смесь мелассы и отработанного масла.*