

EXOPOLYSACCHARIDE ETHAPOLAN SYNTHESIS ON MOLASSES AND SUNFLOWER OIL MIXTURE DEPENDING ON THE METHOD OF MOLASSES PREPARATION

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

Key words:

Acinetobacter sp. IMV B-7005
Biosynthesis
Ethapolan
Pretreatment of molasses
Mixture of molasses and sunflower oil

Article history:

Received 16.05.2019
Received in revised form 29.05.2019
Accepted 20.06.2019

Corresponding author:

A. Voronenko
E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The influence of molasses preparation method (treatment with solution of sulfate acid before sterilization for decomposition of sucrose to monosaccharides, followed by neutralization after hydrolysis, or without neutralization) on exopolysaccharide ethapolan synthesis by *Acinetobacter sp. IMV B-7005* on this substrate and refined (or waste) sunflower oil mixture has been studied. The amount of synthesized ethapolan was determined gravimetrically after precipitation with isopropanol. The exopolysaccharide-synthesizing ability was calculated as the ratio of the exopolysaccharide concentration to the concentration of biomass. It has been established, that using neutralized after sterilization molasses in mixture with refined oil was accompanied by increase in amount of synthesized exopolysaccharide in 1.15—1.25 times, compared to using simple hydrolyzed molasses. In the case of refined oil replacing in a mixture with molasses on a various batches of mixed waste oil (after frying potatoes, meat, vegetables and mixed, from “Rocker-Pub”, Kyiv) the ethapolan synthesis rates did not differ from those on a mixture of molasses and refined substrate. The highest amount of synthesized polysaccharide (15.3—16.0 g/l) was observed at 3.0% concentration of neutralized molasses and mixed waste oil in mixture with using inoculum, which was grown on the corresponding oil. At the same time the highest exopolysaccharide-synthesizing ability (3.6 g exopolysaccharide/g biomass) was observed at lower (1.5%) monosubstrates concentrations in mixture and with using non-neutralized after hydrolysis molasses. The obtained results confirm the possibility of universal technology development for obtaining microbial exopolysaccharide ethapolan on a mixture of molasses and waste (fried) sunflower oil.

СИНТЕЗ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА СУМІШІ МЕЛЯСИ ТА СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ ЗАЛЕЖНО ВІД СПОСОБУ ПІДГОТОВКИ МЕЛЯСИ

А. А. Вороненко, М. О. Івахнюк, Т. П. Пирог
Національний університет харчових технологій

У статті досліджено вплив способу підготовки м'яса (обробка розчином сульфатної кислоти перед стерилізацією для розкладання сахарози до моносахаридів з подальшою нейтралізацією після гідролізу або без нейтралізації) на синтез екзополісахариду етаполану штамом *Acinetobacter sp. IMB B-7005* на суміші цього субстрату та рафінованої (або змішаної відпрацьованої соняшникової олії). Концентрацію етаполану визначали ваговим методом після осадження ізопропанолом. Екзополісахарид-синтезувальну здатність розраховували як відношення концентрації полісахариду до концентрації біомаси.

Встановлено, що використання нейтралізованої після стерилізації м'яса в суміші з рафінованою олією супроводжувалося підвищенням кількості синтезованого етаполану у 1,15—1,25 рази порівняно із застосуванням звичайної гідролізованої м'яса. При заміні рафінованої олії на різні партії змішаної відпрацьованої (після смаження м'яса, картоплі, цибулі, сиру; «Rocker Rib», Київ) показники синтезу етаполану практично не відрізнялися від таких на суміші м'яса та рафінованого субстрату. Найвища концентрація синтезованого полісахариду (15,3—16,0 г/л) досягалася за концентрації нейтралізованої м'яса та змішаної відпрацьованої олії у суміші 3,0 % та використанні інокуляту, вирощеного на відповідній олії. Водночас найвища екзополісахарид-синтезувальна здатність (3,6 г екзополісахариду/г біомаси) спостерігалася за нижчої (1,5%) концентрації монособстратів у суміші та використанні не нейтралізованої після гідролізу м'яса. Отримані результати підтверджують можливість розробки універсальної технології одержання етаполану на суміші м'яса та змішаної відпрацьованої (пересмаженої) соняшникової олії.

Ключові слова: *Acinetobacter sp. IMB B-7005*, біосинтез, етаполан, обробка м'яса, суміш м'яса та соняшникової олії.

Постановка проблеми. Мікробні екзополісахариди (ЕПС) — це високомолекулярні полімери вуглеводної природи, які завдяки своїм фізико-хімічним властивостям набули широкого використання в різних галузях промисловості [12]. Нині більшість даних практично цінних сполук отримують на основі вуглеводної сировини, яку в деяких випадках замінюють на більш дешеві промислові відходи [5]. Нещодавно в літературі почали з'являтися поодинокі повідомлення про біосинтез ЕПС на олієвмісних субстратах, проте до теперішнього часу інформація про їх синтез на відпрацьованих оліях відсутня [5]. Обмеженою залишається інформація й про одержання мікробних ЕПС на суміші субстратів.

У нашій попередній статті [6] показано можливість синтезу мікробного ЕПС етаполану (продуцент *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005) на суміші меляси (побічний продукт цукрового виробництва) та соняшникової олії. Подальші дослідження дали змогу замінити рафіновану олію у змішаному субстраті на різні типи відпрацьованої (після смаження картоплі, м'яса, овочів та змішану). Встановлено, що найвищі показники синтезу полісахариду (концентрація ЕПС 14 г/л, а ЕПС-синтезувальна здатність 3,5 г ЕПС/г біомаси) спостерігалися за використання змішаної відпрацьованої олії як для одержання посівного матеріалу, так і біосинтезу ЕПС.

Зазначимо, що у дослідженнях використовували гідролізовану мелясу, що зумовлено низькою активністю у штаму ІМВ В-7005 ферментних систем, які здійснюють розкладання сахарози [11; 12], вміст якої в мелясі, зазвичай, становить 45—55% [10]. У той же час використання такої меляси, рН якої після гідролізу становить 4,0—4,5, призводить до зниження початкового значення рН середовища культивування до 5,8—6,0, що є неоптимальним для росту продуцента і синтезу ЕПС.

Раніше було показано, що використання нейтралізованої після гідролізу меляси у суміші з С₂-субстратами (етанол, ацетат) дало змогу не лише уникнути зниження початкового значення рН, а й супроводжувалося підвищенням показників синтезу етаполану [11].

У зв'язку з викладеним вище **метою статті** є дослідження впливу способу підготовки меляси на синтез етаполану на суміші цього субстрату та соняшникової олії (рафінованої та змішаної відпрацьованої).

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень був продуцент екзополісахариду етаполану штаму *Acinetobacter* sp., 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): КН₂РО₄ — 6,8; КОН — 0,9; МgSO₄ • 7 Н₂О — 0,4; СаСl₂ • 2Н₂О — 0,1; NH₄NO₃ — 0 (у середовищі для біосинтезу) та 0,2 (у середовищі для одержання інокуляту); FeSO₄ • 7 Н₂О — 0,001.

У середовище додатково вносили 0,5% (об'ємна частка) дріжджового автолізу, а також мультівітамінний комплекс «Комплевіт» в концентрації 0,00085 % (масова частка в перерахунку на пантотенат). Штам ІМВ В-7005 є ауксотрофом за пантотенатом.

Як джерело вуглецю та енергії використовували суміш меляси (масовою часткою 1,5—4,0% за вуглеводами) та соняшникової олії (об'ємною часткою 1,5—4,0%). В одному з варіантів рафіновану олію замінювали на різні партії змішаної відпрацьованої олії (після смаження м'яса, картоплі, цибулі, сиру; «Rocker Pub», Київ). Відбір олії проводився тричі через кожні два місяці.

Гідроліз меляси здійснювали так: до 100 г меляси додавали дистильовану воду до кінцевого об'єму 200 мл, отриманий розчин підкислювали 1 н Н₂SO₄ до рН 4,0 і стерилізували при 112°C упродовж 30 хв. В одному з варіантів використовували мелясу, яку після стерилізації нейтралізували (рН 6,5—7,0) стерильним 10% розчином КОН.

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту (18—24 год), вирощену на середовищі, що містило як джерело вуглецю та енергії рафіновану (0,5%) або змішану відпрацьовану соняшникову олію (0,5%). Концентрація посівного матеріалу становила 10% від загального об'єму середовища.

Культивування штаму ІМВ В-7005 здійснювали в колбах (750 мл) із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при температурі 30°C упродовж 120 год. Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з подальшим перерахунком на суху біомасу відповідно до калібрувального графіка.

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 сухої біомаси та виражали у г ЕПС / г біомаси.

Статистичну обробку даних проводили за Лакіним [9]. Результати досліджень згідно з *t*-критерієм Стьюдента виявилися статистично достовірними при 5-відсотковому рівні значимості.

Результати і обговорення. На першому етапі досліджували вплив способу підготовки меляси на синтез етаполану при культивуванні штаму ІМВ В-7005 на суміші цього субстрату та рафінованої олії.

Як видно з наведених у табл. 1 даних, незалежно від вмісту нейтралізованої меляси й олії у суміші (1,5—4,0%) кількість синтезованого полісахариду була у 1,15—1,25 раза вищою, ніж за використання звичайної гідролізованої меляси. Найвища концентрація етаполану (16,3 г/л) спостерігалася за концентрації монособстратів у суміші 3,0%. Зазначимо, що під час культивування продуценту етаполану на суміші нейтралізованої меляси та олії спостерігали підвищення рівня не тільки полісахариду, а й біомаси, що, у свою чергу, супроводжувалося зниженням ЕПС-синтезувальної здатності (див. табл. 1).

Таблиця 1. Синтез етаполану на суміші меляси та рафінованої олії залежно від способу підготовки меляси

Концентрація меляси та олії у суміші, %	Спосіб підготовки меляси	pH _{кін}	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС / г біомаси
Меляса, 1,5 + олія, 1,5	Нейтралізація	7,0	12,15±0,61	2,25±0,11
	Без нейтралізації	6,9	10,09±0,50	3,60±0,18
Меляса, 2,0 + олія, 2,0	Нейтралізація	7,0	14,45±0,72	2,59±0,13
	Без нейтралізації	6,9	11,54±0,58	3,02±0,15
Меляса, 3,0 + олія, 3,0	Нейтралізація	7,3	16,25±0,81	1,95±0,10
	Без нейтралізації	6,8	13,09±0,65	3,11±0,16
Меляса, 4,0 + олія, 4,0	Нейтралізація	7,3	12,33±0,62	1,68±0,08
	Без нейтралізації	6,7	10,67±0,53	2,83±0,14

Примітка. Посівний матеріал вирощували на рафінованій олії.

У попередніх дослідженнях [6] було встановлено, що найвищі показники синтезу етаполану досягалися у разі використання в суміші з мелясою змішаної (після смаження м'яса, картоплі, цибулі, сиру) пересмаженої олії. У той же час відомо, що відпрацьована олія є субстратом непостійного складу, і її якість значною мірою залежить від режиму смаження, кратності й типу приготованих страв [8].

У зв'язку з цим на наступному етапі досліджували синтез етаполану на суміші нейтралізованої меляси та різних партій змішаної пересмаженої олії.

Результати показали, що незалежно від партії змішаної відпрацьованої олії концентрація синтезованого етаполану практично не змінювалася для однієї і тієї ж концентрації моносубстратів у суміші (табл. 2). Незначне зниження показників синтезу порівняно з використанням рафінованого субстрату (табл. 1) може бути зумовлене наявністю у пересмаженій олії токсичних сполук (альдегіди, вільні радикали тощо) [8].

Таблиця 2. Вплив партії змішаної відпрацьованої олії у суміші з нейтралізованою мелясою на синтез етаполану

Концентрація нейтралізованої меляси та змішаної відпрацьованої олії* у суміші, %	pH _{кін}	ЕПС, г/л	ЕПС-синтезувальна здатність, г ЕПС/ г біомаси
Меляса, 1,5 + олія (1), 1,5	7,0	11,28±0,56	1,43±0,07
Меляса, 1,5 + олія (2), 1,5	7,2	11,73±0,59	2,16±0,11
Меляса, 1,5 + олія (3), 1,5	7,2	10,28±0,51	1,17±0,06
Меляса, 2,0 + олія (1), 2,0	7,1	12,23±0,61	1,29±0,06
Меляса, 2,0 + олія (2), 2,0	7,2	12,93±0,65	1,78±0,09
Меляса, 2,0 + олія (3), 2,0	7,3	13,51±0,68	1,39±0,07
Меляса, 3,0 + олія (1), 3,0	7,4	16,02±0,80	1,96±0,10
Меляса, 3,0 + олія (2), 3,0	7,6	15,28±0,76	1,47±0,07
Меляса, 3,0 + олія (3), 3,0	7,4	15,28±0,76	1,50±0,08

Примітка. * — У дужках наведено номер партії пересмаженої олії («Rocker Pub», Київ). Посівний матеріал вирощували на відповідній змішаній пересмаженій олії.

Значимо, що різні способи обробки меляси широко використовуються для підвищення показників синтезу ЕПС на цьому субстраті [1; 3; 4; 7].

Відомо, що меляса містить у своєму складі воду, сахарозу (45—55%), органічні кислоти, амінокислоти, вітаміни, а також мінеральні речовини, які являють собою карбонати, нітрати, хлориди і фосфати катіонів цинку, заліза, калію, магнію, алюмінію, нікелю тощо [10]. Більшість цих сполук сприяє росту мікроорганізмів та синтезу цільового продукту, але, з іншого боку, наявність у середовищі культивування важких металів може зумовлювати певні проблеми під час біосинтезу. Зокрема, вони здатні інгібувати ріст мікроорганізмів, впливати на рН субстрату та призводити до інактивації ферментів, які беруть участь у синтезі цільового продукту [1; 7]. У той же час такі інгібітори можуть бути частково вилучені в результаті попередньої обробки меляси кислотою, активованим вугіллям, кальцій фосфатом тощо.

Roukas [7] припускає, що підвищення показників синтезу пулулану штамом *Aureobasidium pullulans* P56 пов'язано з видаленням важких металів унаслідок

док обробки бурякової меляси сульфатною кислотою (рН після гідролізу доводили до 5,5). Концентрація полісахариду при цьому була на 61,8; 26,5; 31,2 та 30,6% вищою, ніж за обробки субстрату катіонообмінною смолою, кальцій фосфатом, фероціанідом калію та ЕДТА відповідно. За оптимальних умов культивування (концентрація меляси 70 г/л за вуглеводами, рН 6,5—7,5) кількість синтезованого полісахариду досягала 32 г/л.

Аналогічні результати були отримані і Аі зі співавт. [1]. Показано, що при культивуванні *Alcaligenes* sp. ATCC31555 на мелясі з цукрової тростини (78,9 г/л за вуглеводами), обробленої сульфатною кислотою (рН після гідролізу доводили до 7,0—7,2), отримано на 24,8 і 33,7% більше велану, порівняно з використанням обробленого активованим вугіллям та необробленим субстратом.

Зазначимо, що в цих дослідженнях відсутні відомості про вплив різних способів обробки меляси на кількісний вміст катіонів важких металів, а перевага обробки сульфатною кислотою пояснюється утворенням з ними нерозчинних сульфатів.

Вигідно в цьому плані відрізняються дослідження, проведені Кіçүкашiк із співавт [4]. Ці автори вивчали вплив різних способів обробки (кларифікація, обробка сульфатною кислотою, активованим вугіллям, кальцій фосфатом та їх комбінації) бурякової та крохмальної меляси (побічний продукт виробництва декстрози з крохмалевмісної сировини) на синтез левану помірно галофільними бактеріями *Halomonas* sp. AAD6. Експерименти показали, що кларифікація та обробка кислотою не впливають на концентрацію катіонів важких металів (Fe, Zn, Ni) в обох субстратах. У той же час кальцій фосфат виявився ефективною сполукою для селективного видалення з меляси катіонів Fe (70—80%) та Zn (до 70%), а обробка активованим вугіллям забезпечувала адсорбцію 20—40% Ni з досліджуваних зразків. При цьому найвищі показники синтезу ЕПС (12,4 г/л і 4,38 г/л) спостерігалися за послідовної комплексної обробки, відповідно, бурякової та крохмальної меляси (30 г/л) кальцій фосфатом, сульфатною кислотою, активованим вугіллям з подальшим доведенням рН субстрату до 7,0.

У [3] Свіјовiс із співавт. також показали, що обробка сульфатною кислотою не впливає на кількісний Fe, Ni, Cu та Zn. У той же час встановлено, що комплексна обробка кислотою (субстрат після гідролізу нейтралізовано КОН до рН 7,0) та активованим вугіллям дають змогу знизити вміст кальцію на 35%. При цьому кількість левану, синтезованого штамом *Bacillus licheniformis* NS032, на обробленій таким чином мелясі (100—200 г/л за вуглеводами) була у 4—5 разів нижчою, ніж за використання 200 г/л сахарози (концентрація ЕПС 51,6 г/л). Подальші дослідження показали, що для оптимального синтезу полісахариду (53,2 г/л) необхідним є додавання до обробленої меляси (125,2 г/л) сахарози (74,8 г/л).

Інші дослідники [2] повідомляють, що культивування штаму *Zyotomonas mobilis* ATCC 31821 на очищеній центрифугуванням мелясі з цукрової тростини (250 г/л за вуглеводами) призводить до накопичення значно нижчої концентрації левану (2,53 г/л), ніж за використання сахарози (21,7 г/л).

Висновки

Отже, у результаті проведеного дослідження доведено доцільність нейтралізації гідролізованої після стерилізації меляси для синтезу екзополісахариду етаполану на суміші цього субстрату та рафінованої (або змішаної відпрацьованої) соняшникової олії. Встановлено залежність синтезу етаполану від концентрації нейтралізованої меляси та олії у суміші, проте зміна партії відпрацьованої олії не супроводжувалася зниженням концентрації полісахариду. Найвища кількість синтезованих ЕПС (15,3—16,0 г/л) спостерігалася за концентрації нейтралізованої меляси та змішаної відпрацьованої олії у суміші 3,0% та використанні інокуляту, вирощеного на відповідній олії.

Отримані результати засвідчують можливість розробки універсальної технології одержання етаполану на суміші меляси та змішаної відпрацьованої (пересмаженої) соняшникової олії.

Література

1. Ai H., Liu M., Yu P., Zhang S., Suo Y., Luo P., Li S., Wang J. Improved welan gum production by *Alcaligenes* sp. ATCC31555 from pretreated cane molasses. *Carbohydr. Polym.* 2015. Vol. 129. P. 35—43.
2. de Oliveira M.R., da Silva R.S.S.F., Buzato J.B., Celligoi M.A.P.C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochem. Eng. J.* 2007. Vol. 37, № 2. P. 177—183.
3. Gojic-Cvijovic G. D., Jakovljevic D. M., Loncarevic B. D., Todorovic N. M., Pergal M. V., Ciric J., Loos K., Beskoski V. P., Vrvic M. M. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 121. P. 142—151.
4. Küçükaşık F., Kazak H., Güney D., Finore I., Poli A., Yenigün O., Nicolaus B., Oner E. T. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. Vol. 89, № 6. P. 1729—1740.
5. Pirog T. P., Ivakhniuk M. O., Voronenko A. A. Exopolysaccharides synthesis on industrial waste. *Biotechnol. acta.* 2016. Vol. 9, No. 2. P. 7—18.
6. Pirog T. P., Voronenko A. A., Ivakhniuk M. O. Intensification of microbial exopolysaccharide ethapolan biosynthesis on mixture of molasses and sunflower oil. *Biotechnol. acta.* 2017. Vol. 10, No. 4. P. 25—33.
7. Roukas T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. *Process Biochem.* 1998. Vol. 33, No. 8. P. 805—810.
8. Zhang Q., Saleh A.S., Chen J., Shen Q. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: a review. *Chem. Phys. Lipids.* 2012. Vol. 165, No. 6. P. 662—681.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. Москва, 1990. 352 с.
10. Маринченко В. О., Домарецький В. А., Шиян П. Л., Швець В. М., Циганков П. С., Жолнер І. Д. Технологія спирту. Вінниця, 2003. 496 с.
11. Пирог Т. П., Лашук Н. В., Зборовська Б. М. Синтез екзополісахариду етаполану в умовах міксотрофного росту *Acinetobacter* sp. УКМ В-7005 на суміші С₂-сполук і меляси. *Харчова промисловість.* 2007. № 5. С. 26—29.
12. Підгорський В. С., Іутинська Г. О., Пирог Т. П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. Київ, 2010. 327 с.