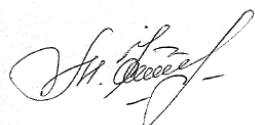


**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

ІВАХНЮК МИКОЛА ОЛЕКСАНДРОВИЧ



УДК 579.663: 577.114

**СИНТЕЗ МІКРОБНОГО ПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ НА
ОЛІЄВМІСНИХ ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДАХ**

03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук**

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор **Пирог Тетяна Павлівна**, Національний університет харчових технологій МОН України, завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, доцент **Голуб Наталія Борисівна**, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, професор кафедри екобіотехнології та біоенергетики

доктор сільськогосподарських наук, професор **Мерзлов Сергій Віталійович**, Білоцерківський національний аграрний університет МОН України, декан біолого-технологічного факультету

Захист відбудеться «11» червня 2019 р. об 11⁰⁰ год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.058.03 Національного університету харчових технологій за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 68, корпус А, аудиторія А-311.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного університету харчових технологій за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 68.

Автореферат розісланий «__» травня 2019 р.

Учений секретар спеціалізованої вченої ради



Н.М. Ющенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Незважаючи на більш як 40-річну історію вивчення, мікробні екзополісахариди (ЕПС) – високомолекулярні екзогенні продукти метаболізму мікроорганізмів вуглеводної природи – залишаються об'єктами інтенсивних досліджень (Poli et al., 2011; Mahapatra et al., 2013). Нині мікробні ЕПС завдяки здатності до змінення реологічних характеристик водних систем, емульгування, суспендування, гелеутворення широко використовуються у нафто- і гірничодобувній, харчовій, парфумерній та хімічній промисловості, сільському господарстві. ЕПС мають ряд переваг перед синтетичними та рослинними полісахаридами (Zhan et al., 2011; Apetrei et al., 2010). Так, ці біополімери є нетоксичними і біодеградабельними, стійкими до механічної та окисної деструкції, температури і низьких значень рН (Prasanna et al., 2012).

Вітчизняним полісахаридом мультифункціонального призначення є етаполан, продуцентом якого є ауксотрофний (за пантотенатом кальцію) штам *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 Пирог та ін., 2006). Особливістю етаполану є здатність його розчинів до емульгування та підвищення в'язкості за присутності одно- та двовалентних катіонів, при зниженні рН та в системі Cu^{2+} -гліцин (Пирог та ін., 2008).

Попри тривалу історію дослідження мікробних ЕПС, для їх біосинтезу до теперішнього часу використовують в основному вуглеводні субстрати (Підгорський та ін., 2010).

Однією із глобальних екологічних проблем сучасності є пошук методів утилізації або повторного використання промислових відходів. Слід зазначити, що небезпечними є не лише відходи, що містять токсичні речовини (наприклад, фенол та його похідні), а й відходи, які потрапляють у навколишнє середовище у неконтрольованій кількості, наприклад, олієвмісні (відходи оліє-жирового виробництва, пересмажена олія із закладів громадського харчування тощо). Нині у світі існує проблема утилізації відпрацьованої олії, оскільки лише в Європі її щоденно утворюється 1,85–2,65 млн дм^3 (Rafulla et al., 2012). Крім того даний відхід є надзвичайно канцерогенним (містить акролеїн – токсичний альдегід, акриламід, який здатний руйнувати ДНК, гетероциклічні аміни, що спричиняють серцеві захворювання, а також полімери жирних кислот, вільні радикали) (Bordin et al., 2013). Зазначимо, що в Україні викиди відпрацьованої олії в навколишнє середовище не регламентуються. Біотехнологічні методи дозволяють утилізувати такі відходи і отримувати біологічно активні речовини або біомасу. Для ефективної утилізації промислових відходів у практично-цінні метаболіти, концентрація таких субстратів у середовищі культивування продуцента повинна бути максимально можливою. У зв'язку з вищенаведеним, тема дисертаційної роботи є актуальною.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота включає дослідження, виконані у рамках проектів Міністерства освіти і науки України «Наукові засади створення комплексної безвідходної технології мікробних препаратів з різноманітними біологічними властивостями» (2013–2015 рр.), № державної реєстрації 0112U007799 і «Фізіологічні основи регуляції мікробного синтезу як підґрунтя для створення

біотехнологій комплексних препаратів зі стабільними поліфункціональними властивостями» (2016–2018 рр.), № державної реєстрації 0116U001530.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – дослідження інтенсифікації синтезу мікробного полісахариду етаполану на середовищі з максимально можливою концентрацією відпрацьованої олії, пошук доступних замінників дефіцитного на ринку України пантотенату кальцію для штаму-продуцента.

Для виконання роботи необхідно було виконати такі **завдання**:

- встановлення оптимальної концентрації доступних замінників пантотенату для ауксотрофного штаму-продуцента ЕПС;
- дослідження можливості використання рафінованої соняшnikової олії для утворення етаполану і пошук шляхів інтенсифікації процесу біосинтезу полісахариду на цьому субстраті;
- визначення впливу екзогенних попередників на синтез етаполану при культивуванні штаму ІМВ В-7005 на соняшnikовій олії;
- дослідження можливості заміни рафінованої соняшnikової олії на відпрацьовану олію різної якості;
- дослідження синтезу етаполану на оліях з різним співвідношенням політа мононенасичених жирних кислот;
- визначення шляхів інтенсифікації синтезу етаполану на змішаних відпрацьованих оліях;
- розроблення технології етаполану на відпрацьованій олії та розробка технологічного регламенту;
- розрахунок економічної ефективності запропонованої біотехнології.

Об'єкт дослідження – штам *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 та мікробний екзополісахарид етаполан.

Предмет дослідження – біотехнологічний процес отримання мікробного полісахариду етаполану, біоконверсія відпрацьованої олії.

Методи дослідження. Під час виконання дисертаційної роботи використовували такі методи досліджень: біотехнологічні (культивування мікроорганізмів); фізико-хімічні (визначення в'язкості, концентрації ЕПС і біомаси, рН, індексу емульгування); мікробіологічні (визначення кількості життєздатних клітин, морфолого-культуральних ознак бактерій); математичні (статистична обробка результатів досліджень в МО Excel, AutoCAD).

Наукова новизна одержаних результатів. Встановлено можливість заміни пантотенату кальцію у середовищі культивування ауксотрофного продуцента етаполану на доступний вітчизняний мультивітамінний препарат «Комплевіт». Визначено його оптимальну концентрацію (0,00085–0,00095 %, за пантотенатом), що забезпечує максимальний синтез ЕПС.

Встановлено можливість використання як субстрату для синтезу мікробного полісахариду етаполану рафінованої соняшnikової олії у високих концентраціях (4–5 %) та її заміни на відпрацьовані олії з різним вмістом поліненасичених (кукурудзяна, соняшnikова) та мононенасичених (оливкова, ріпакова) жирних кислот після смаження м'яса та картоплі.

Показано, що використання змішаної після смаження м'яса, картоплі, цибулі, сиру соняшникової олії як субстрату для отримання етаполану супроводжувалося синтезом практично такої ж концентрації полісахариду як і на відповідній рафінованій олії (12,5–13 г/дм³).

Показано, можливість підвищення концентрації етаполану (в 1,1–1,4 рази), а також збільшення в'язкості його розчинів (на 100–900 %) за присутності одновалентних катіонів та в системі Cu^{2+} -гліцин за умов внесення в середовище культивування штаму ІМВ В-7005 з рафінованою соняшниковою олією екзогенних попередників (фумарат, глюкоза, 0,05–0,1%).

Показано, що розчинам етаполану, синтезованого на відпрацьованій олії, притаманні емульгувальні властивості: індекс емульгування гексадекану, бензину та дизельного палива становив 48–52 %. Утворена емульсія залишалася стабільною при зберіганні зразків впродовж 20 діб.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено технологію мікробного полісахариду етаполану на відпрацьованій олії, основними елементами якої є: 1) використання як джерела вуглецю пересмажених олій будь-якого виду, якості та їх суміші об'ємною часткою 5 %; 2) концентрація препарату «Комплевіт» 0,00095 %, в перерахунку на пантотенат кальцію; 3) концентрація нітрату амонію 0,6 г/дм³; 4) використання 10 % інокуляту, вирощеного на відповідній рафінованій олії.

Спосіб одержання полісахариду етаполану з використанням препарату «Комплевіт» захищено патентом України на винахід –№ 108323, опубліковано 10.04.2015, Бюл №7.

На основі розробленої технології складено тимчасовий технологічний регламент на виробництво культуральної рідини *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 для вторинного видобутку нафти (Додаток А дисертації). Теоретичні розрахунки витрат на приготування поживних середовищ для синтезу найвідомішого ЕПС ксантану і етаполану для обробки 262 нафтових свердловин ПАТ «Охтирканафтогаз» (з розрахунком 15 м³ культуральної рідини на 1 свердловину) показали, що вартість середовища для одержання етаполану в 13 разів нижча, ніж відомого аналога.

Етаполан, одержаний згідно розробленої технології був апробований як компонент косметичного крему для рук на базі суб'єкту підприємницької діяльності «ЛПМ». Ефективність технології та достовірність отриманих результатів підтверджено Актом апробації мікробного екзополісахариду етаполану як складника косметичного крему (Додаток Б дисертації).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Дисертантом проаналізовано вітчизняну та іноземну наукову літературу з даної проблеми, проведено експериментальні дослідження, узагальнено отримані експериментальні дані, проведено порівняльний аналіз з даними літератури.

Планування експериментальних робіт, їх аналіз, підготовка публікацій за результатами досліджень проходили за безпосередньої участі наукового керівника д-ра біол. наук, проф. Пирог Т.П.

Автором особисто визначено показники росту і синтезу екзополісахариду етаполану (концентрація біомаси, кількість синтезованого ЕПС, в'язкість розчину етаполану та культуральної рідини, що містить полісахарид) при культивуванні *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 на середовищі з соняшниковою олією. Визначення показників синтезу етаполану на різних видах відпрацьованих олій, їх сумішей, а також дослідження емульгуючих властивостей ЕПС здійснювалися спільно з аспірантом кафедри біотехнології і мікробіології НУХТ Вороненком А.А., який є співавтором публікацій. Апробація етаполану як компонента косметологічних кремів для рук проводилася за участі Музиченка Л.П.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на ІХ Міжнародній науково-практичній конференції «Наука I INOWASJA–2013» (м.Пшемишль, Польща, 2013); Х Міжнародній науково-практичній конференції «EUROPEJSKA NAUKA XXI POWIEKA–2014» (м.Пшемишль, Польща, 2014); ІV Всеросійській науковій конференції «Актуальные вопросы биомедицинской инженерии», (м.Саратов, Російська Федерація, 2014); ІІІ Міжнародній науково-практичній конференції «Химия, био- и нанотехнологии, экология и экономика в пищевой и косметической промышленности» (м.Харків, Україна, 2015); ІІІ Міжнародній науково-практичній конференції «Новітні досягнення біотехнології та нанофармакології» (м.Київ, Україна, 2015); ІІІ Міжнародній науково-практичній конференції «Продовольчі ресурси: проблеми і перспективи» (м.Київ, Україна, 2015); І та ІІ Міжнародній науково-практичній інтернет-конференції «Біотехнологія: досвід, традиції та інновації» (м.Київ, Україна, 2016, 2018); ІV, V Міжнародній науковій конференції молодих вчених і студентів «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (м.Шимкент, Республіка Казахстан, 2016, 2017); VІІІ, XІ Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія ХХІ століття» (м.Київ, Україна 2014, 2017); ІV, VІ Науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології» (м.Харків, Україна, 2014, 2017); VІ Міжнародній науково-практичній конференції «Біотехнологія: звершення та надії» (м.Київ, Україна, 2017); 60-й науково-практичній конференції студентів «Студенческая наука и здоровье» (м.Семей, Казахстан, 2018); 80, 84 Міжнародній науковій конференції молодих учених, аспірантів і студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» (м.Київ, Україна, 2014, 2018); ІІ науково-практичній інтернет-конференції з міжнародною участю «Фармацевтична наука та практика: проблеми, досягнення, перспективи розвитку» (м.Харків, Україна, 2018); І Міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Науково-практичні засади загальноінженерної підготовки фахівців фармації» (м.Харків, Україна, 2018); Міжнародній науково-практичній конференції «Universum View» (м. Краматорськ, Україна, 2018); XV Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Наукові дослідження у 2018 році» (м.Краматорськ, Україна, 2018).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 35 наукових праць, із них 9 статей (5 із них – у фахових журналах наукометричної бази Index Copernicus; 3 – у іноземних журналах, з них 1 – у електронному журналі наукометричної бази Google Scholar, 2 – у журналі наукометричної бази РИНЦ; 1 – у журналі наукометричної бази Index Copernicus); 1 патент України на винахід; 2 патенти України на корисну модель, 23 тези доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Робота складається зі 133 сторінок машинописного тексту, 2 рисунків, 40 таблиць, 156 літературних джерел (із них 93 іноземних авторів). Також до дисертаційної роботи входить додаток А – Тимчасовий технологічний регламент, що складається з 33 сторінок машинописного тексту, 7 таблиць та 5 креслень формату А3; додаток Б – Акт та протокол апробації мікробного екзополісахариду етаполану як складника косметичних кремів для рук, що складається з 6 сторінок машинописного тексту, 3 таблиць; додаток В – Список публікацій здобувача, опублікованих за темою дисертації.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми дисертації, наведено зв'язок теми дисертаційної роботи з науковими програмами, сформовано мету і завдання, зазначено об'єкт та предмет та методи досліджень, вказано наукову новизну та практичне значення одержаних результатів, особистий внесок автора, а також апробацію результатів роботи та публікації за темою дисертаційної роботи.

Розділ 1 Біосинтез екзополісахаридів на промислових відходах

Наведено та проаналізовано вітчизняні та зарубіжні літературні дані останніх років щодо синтезу мікробних ЕПС на різних промислових відходах (харчової промисловості, сільськогосподарського сектору, виробництва біодизелю тощо). Використання промислових відходів для отримання екзополісахаридів дозволить вирішити не лише проблему накопичення вторинної сировини, а й зменшити витрати на біосинтез практично цінних метаболітів. Крім того, застосування деяких відходів порівняно з традиційними вуглеводними субстратами, окрім екологічних переваг має ряд технологічних: наявність ростових факторів, відсутність потреби у піногаснику та стерилізації субстрату.

Розділ 2 Об'єкти і методи досліджень

Об'єкти досліджень. Як об'єкт досліджень використовували штам *Acinetobacter* sp. – продуцент комплексного екзополісахаридного препарату етаполану, який депоновано у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером В-7005 (Пирог та ін., 2008).

Культивування бактерій. Бактерії вирощували на мінеральному середовищі (г/дм³): КН₂РО₄ – 6,8; КОН – 0,9; MgSO₄×7H₂O – 0,4; СаСl₂×2H₂O –

0,1; NH_4NO_3 – 0,4; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; рН 6,8–7,0. В одному з варіантів досліджень концентрацію NH_4NO_3 у середовищі підвищували до 0,6–0,8 г/дм³.

Як джерело вуглецю та енергії використовували наступні види олій у кількості 1–7 % (об'ємна частка):

- **рафіновані:** соняшникова (ТМ «Олейна», Україна), кукурудзяна (ТОВ «Кама» Україна); оливкова холодного віджиму (ТМ «Salvadori», Італія), ріпакова холодного віджиму (ТМ «Bio Planete», Франція);
- **нерафінована:** соняшникова (ТМ «Олейна», Україна);
- **відпрацьовані:** соняшникова після смаження м'яса та картоплі (з мережі «McDonald's» м.Київ, Україна), кукурудзяна після смаження м'яса та картоплі, оливкова і ріпакова після смаження м'яса та картоплі (отримані в домашніх умовах після трьох-кратного смаження впродовж 20 хв) та змішана соняшникова олія після смаження м'яса, картоплі, цибулі, сиру, (отримана з ресторанів швидкого харчування «RockerPub» м.Київ, Україна).

У деяких варіантах соняшкову та оливкову олії вносили в середовище у співвідношеннях: 4:1; 1:4 та 1:1. В одному з варіантів початкову концентрацію змішаної олії знижували до 1,25–2 % і надалі в процесі культивування доводили до кінцевої концентрації 5 % порціями по 1,25–1,5 %.

Так як штам ІМВ В-7005 є ауксотрофом за пантотенатом, тому в дослідженнях використовували пантотенат кальцію та такі мультивітамінні препарати: «Кангавітес» (США), «Вітрум» (США), «Велмен» (Росія) та «Комплевіт» (Україна) у концентрації 0,0006–0,00105 % (масова частка в перерахунку на пантотенат кальцію). У середовище додатково вносили 0,5 % (об'ємна частка) дріжджового автолізату.

На початку культивування, в експоненційній і стаціонарній фазі росту у середовище додатково вносили екзогенні попередники біосинтезу (глюкоза, фумарат натрію або їхня суміш у концентрації 0,05 та 0,1 %, масова частка).

Як інокулянт використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного вище складу, що містило 0,5 % (об'ємна частка) різних видів олій, а також глюкозу (0,5 %, масова частка), мелясу 0,5 % (за вуглеводами), фумарат натрію (0,5 %, масова частка). Кількість посівного матеріалу становила 10 % від об'єму поживного середовища.

Культивування штаму ІМВ В-7005 здійснювали в колбах об'ємом 750 см³ із 100 см³ середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 120 год.

Параметри росту і синтезу етаполану

Залишкову кількість олії в культуральній рідині визначали ваговим методом після трикратної екстракції гексаном або петролейним ефіром (у співвідношенні 1:1) з наступним упарюванням органічного екстракту у вакуумі при 40 °С до постійної маси.

Концентрацію біомаси визначали за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на абсолютно суху біомасу (АСБ) у відповідності з калібрувальним графіком.

Кількість синтезованого етаполану визначали ваговим методом. Для цього до 10 см³ культуральної рідини додавали 1,5–2 об'єми ізопропанолу, осад

ЕПС промивали чистим ізопропанолом і висушували при кімнатній температурі упродовж 24 год. ЕПС-синтезувальну здатність визначали як відношення концентрації ЕПС до концентрації біомаси (г ЕПС/г АСБ).

Визначення реологічних властивостей етаполану

Реологічні властивості розчинів етаполану оцінювали за зміненням їх кінематичної в'язкості за присутності 0,1 М КСl, у системі Cu^{2+} -гліцин. В'язкість розчинів етаполану вимірювали на скляному капілярному віскозиметрі Оствальда при 20 °С.

Визначення емульгувальних властивостей

До 2 см³ 0,05 % розчину культуральної рідини або розчину етаполану додавали 2 см³ субстрату для емульгування (гексадекан, бензин, дизельне паливо) та струшували упродовж 2 хв. Вимірювання індексу емульгування проводили через 24 год як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини в пробірці і виражали у відсотках.

Для перевірки стабільності утворених емульсій їх зберігали упродовж 20 діб при кімнатній температурі (Cooper et al. 1987).

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за Лакінім (1990). Достовірність результатів досліджень оцінювали згідно t-критерія Стьюдента при 5%-му рівні значущості.

Розділ 3 Закономірності синтезу етаполану на рафінованій олії

Продуцент етаполану *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 є ауксотрофом за пантотенатом кальцію (вітамін В₅) (Пирог та ін., 2008). Проте нині промислове виробництво цього вітаміну призупинилося як в Україні, так і в країнах СНД, тому актуальним є пошук препаратів, які б стали його заміною для забезпечення потреб ауксотрофного штаму ІМВ В-7005.

Під час пошуку таких вітамінних препаратів основними критеріями відбору були: високий вміст пантотенату, низька вартість та відсутність потенційних інгібіторів мікробного росту (наприклад іонів металів). Тому на першому етапі досліджень аналізували склад таких мультівітамінних препаратів як «Кангавітес» (США), «Вітрум» (США), «Велмен» (Росія) та «Комплевіт» (Україна).

Для подальшої роботи було обрано «Комплевіт», оскільки він містить найбільшу кількість пантотенату (20 мг в одній капсулі) та вартість препарату є невисокою. Крім того, в його складі концентрація металів є незначною (Fe^{3+} –1,4 мг, Zn^{2+} –1,7 мг, Cu^{2+} –0,3 мг).

На наступному етапі визначали оптимальну концентрацію пантотенату у складі «Комплевіту» для синтезу етаполану на середовищі з 1 % рафінованої соняшникової олії (таблиця 1).

Дані, наведені у таблиці 1 засвідчують, що оптимальна для синтезу етаполану концентрація пантотенату у складі «Комплевіту» становить 0,00085 % (масова частка). За такої концентрації пантотенату у середовищі культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 кількість синтезованого полісахариду була найвищою (6,3 г/дм³).

Одним з підходів до інтенсифікації технологій мікробного синтезу є внесення екзогенних попередників біосинтезу. У попередніх дослідженнях було показано, що при додаванні екзогенного фумарату калію (0,2 %), в середовище культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 з етанолом, вихід ЕПС від субстрату збільшився в 2 рази, а кількість синтезованого етаполану підвищилася на 30 % (Пирог та ін., 2006).

Таблиця 1 – Залежність синтезу етаполану на рафінованій соняшниковій олії від концентрації пантотенату

Джерело пантотенату	Концентрація пантотенату, % (масова частка)	Показники синтезу		
		АСБ, г/дм ³	ЕПС, г/дм ³	г ЕПС / г АСБ
Пантотенат кальцію	0,0006	1,98±0,10	1,0±0,05	0,5±0,03
«Комплевіт»	0,0006	3,26±0,16	4,0±0,20	1,3±0,07
	0,00075	2,27±0,11	4,7±0,23	2,1±0,10
	0,00085	0,89±0,05	6,3±0,26	3,3±0,17
	0,00095	0,69±0,03	3,6±0,20	5,2±0,30
	0,00105	0,7±0,04	2,9±0,15	4,3±0,20

Примітка. Інокулят вирощений на рафінованій соняшниковій олії.

У наших подальших експериментах як попередники використовували глюкозу (складник етаполану) та фумарат натрію (попередник глюконеогенезу). Незалежно від концентрації попередників, моменту їх внесення в середовище культивування продуцента етаполану з рафінованою соняшnikовою олією, а також способу підготовки посівного матеріалу (використання як джерела вуглецю глюкози, фумарату, соняшnikової олії), кількість синтезованого ЕПС була в 1,1–1,4 рази вищою, ніж за умов росту продуцента на середовищі без попередників.

На наступному етапі встановлювали максимальну концентрацію рафінованої соняшnikової олії в середовищі для одержання етаполану. Це було зумовлено тим, що у подальшому передбачалася заміна рафінованої олії на відпрацьовану (пересмажену), а для ефективної утилізації цього токсичного відходу його вміст в середовищі культивування повинен бути якомога вищим.

Встановлено, що підвищення концентрації соняшnikової олії у базовому середовищі культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 до 4–5 % супроводжувалося зниженням показників синтезу етаполану, що може бути зумовлене неоптимальним значенням С/Н. Подальші експерименти показали, що підвищення вмісту нітрату амонію до 0,6 г/дм³ і концентрації пантотенату до 0,00095 % дало змогу збільшити кількість етаполану, синтезованого на середовищі з 5 % рафінованої соняшnikової олії, до 12,5 г/дм³ (таблиця 2), що в 1,4 рази вище, ніж на базовому середовищі з такою самою концентрацією субстрату, але нижчою NH₄NO₃ (0,4 г/дм³) і пантотенату (0,00085 %).

Таблиця 2 – Синтез етаполану залежно від концентрації нітрату амонію і пантотенату у середовищі культивування штаму ІМВ В-7005 з соняшниковою олією

Концентрація у середовищі			ЕПС, г/дм ³
нітрату амонію, г/дм ³	пантотенату, %	соняшникової олії, %	
0,4	0,00085	4	9,1±0,46
		5	9,3±0,47
	0,00095	4	10,6±0,53
		5	12,0±0,60
0,6	0,00085	4	10,6±0,53
		5	12,1±0,61
	0,00095	4	10,4±0,52
		5	12,5±0,63

Примітка. Інокулят вирощений на рафінованій соняшниковій олії.

Отже, одержані результати засвідчують можливість синтезу етаполану за умов росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на середовищі з «Комплевітом» як джерелом пантотенату та підвищеним вмістом рафінованої соняшникової олії (5 %). Ці дані є основою для розробки технології етаполану з використанням як субстрату відпрацьованої (пересмаженої) олії.

Розділ 4 Вплив екзогенних попередників на реологічні властивості розчинів етаполану, синтезованого на рафінованій соняшниковій олії

Оскільки у разі зміни умов культивування продуцента етаполану часто спостерігається і змінення фізико-хімічних властивостей цільового продукту (Пирог та ін., 2008), у наступних дослідженнях аналізували реологічні властивості розчинів ЕПС, синтезованого за внесення попередників у середовище з рафінованою соняшниковою олією.

Встановлено, що незалежно від моменту внесення глюкози у середовище культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005, її концентрації і способу підготовки інокуляту, в'язкість розчинів етаполану як за присутності КСІ, так і у системі Cu^{2+} -гліцин практично не відрізнялася від показників, визначених для етаполану, одержаного на середовищі без попередників.

У той же час додавання 0,05 % фумарату натрію як на початку культивування, так і в процесі біосинтезу, супроводжувалося утворенням етаполану, в'язкість якого за присутності КСІ та в системі Cu^{2+} -гліцин була в 3–10 разів вищою порівняно з в'язкістю ЕПС, синтезованого на середовищі без фумарату (таблиця 3).

На нашу думку це явище може бути зумовлене залученням фумарату не тільки на утворення вуглеводної частини етаполану, а й біосинтез бокових замісників (піруват, жирні кислоти, глюкуронова кислота), відповідальних за ці реологічні властивості.

Таблиця 3 – Вплив екзогенного фумарату на реологічні властивості препаратів етаполану за умов росту *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на рафінованій соняшниковій олії

Концентрація фумарату, % (масова частка)	Момент внесення фумарату (фаза росту)	Відносне збільшення кінематичної в'язкості, % від контролю	
		за присутності 0,1 М КСІ	у системі Cu^{2+} -гліцин
0,05	Лаг-фаза	208±10	208±10
	Експоненційна	215±11	220±12
	Стаціонарна	990±50	350±15
0,1	Лаг-фаза	208±10	233±13
	Експоненційна	200±10	214±11
	Стаціонарна	207±10	200±10

Примітка 1. Контроль (100 %) – в'язкість розчинів етаполану, синтезованого на середовищі без фумарату.

Примітка 2. Посівний матеріал вирощений на глюкозі.

Примітка 3. Концентрація олії у середовищі культивування – 1 %, NH_4NO_3 – 0,4 г/дм³; пантотенату – 0,00085 %.

Отже, використання фумарату натрію як попередника дає змогу підвищити не тільки показники синтезу етаполану, а й реологічні властивості його розчинів.

Розділ 5 Відпрацьовані олії як субстрат для синтезу етаполану

Проблема утилізації відпрацьованих олій як субстратів у біотехнологічних процесах полягає у наявності у їх складі потенційних інгібіторів росту та синтезу цільового продукту (Guillén et al., 2012). На теперішній час є багато інформації про використання таких олій для одержання мікробних поверхнево-активних речовин, що й зрозуміло, оскільки ці продукти мікробного синтезу за хімічною природою є ліпідами (Govindammal et al., 2013). Проте у літературі практично відсутні відомості щодо синтезу мікробних полісахаридів на відпрацьованих оліях.

У попередніх дослідженнях (див. розділ 3) встановлено можливість синтезу етаполану на середовищі з 5 % рафінованої соняшnikової олії. У подальших експериментах нерафіновану та відпрацьовану після смаження м'яса та картоплі соняшникову олію вносили в середовище культивування штаму ІМВ В-7005 у такій же концентрації.

Дані, наведені у таблиці 4, засвідчують, що заміна рафінованої олії на відпрацьовану після смаження м'яса та нерафіновану олію супроводжувалася підвищенням концентрації синтезованого полісахариду до 14,4–15,5 г/дм³. У той же час показники синтезу етаполану на відпрацьованій після смаження картоплі олії були найнижчими: концентрація ЕПС і ЕПС-синтезувальна здатність не перевищували 4,2 г/дм³ і 3,3 г ЕПС/г АСБ відповідно. Ми

припускаємо, що це явище зумовлене наявністю у складі такої олії великої кількості альдегідів, які можуть бути інгібіторами росту і синтезу ЕПС (Guillén et al., 2012).

Таблиця 4 – Синтез етаполану на різних типах соняшникової олії

Соняшникова олія в середовищі для біосинтезу ЕПС	ЕПС, г/дм ³	г ЕПС/ г АСБ
Рафінована	13,0±0,66	7,5±0,38
Нерафінована	15,0±0,78	4,9±0,25
Відпрацьована після смаження м'яса	14,4±0,72	6,3±0,32
Відпрацьована після смаження картоплі	4,2±0,21	3,3±0,17

Примітка. Концентрація олії – 5 %, нітрату амонію – 0,6 г/дм³, пантотенату – 0,00095 %, інокулят вирощений на рафінованій соняшниковій олії.

Одержані дані вказують на залежність показників синтезу цільового продукту від якості відпрацьованої олії, що необхідно враховувати при розробленні відповідних біотехнологій.

Наступні експерименти показали, що підвищення у середовищі культивування продуцента етаполану концентрації відпрацьованої олії до 6–7 %, а також нітрату амонію до 0,8 г/дм³ (з метою підтримання оптимального співвідношення С/Н) не супроводжувалося збільшенням показників синтезу ЕПС. У разі заміни рафінованої олії в середовищі для отримання інокуляту на відповідну відпрацьовану або на глюкозу чи мелясу також не спостерігали підвищення концентрації етаполану.

З літератури відомо, що наявність токсичних речовин, утворюваних в олії під час смаження, залежить від співвідношення в ній мононенасичених і поліненасичених жирних кислот (Bordin et al., 2013). У зв'язку з цим на наступному етапі досліджували синтез етаполану на різних видах відпрацьованих олій (таблиця 5).

Зазвичай у біотехнологічних процесах вирощування інокуляту і виробничий біосинтез здійснюють на середовищах однакового складу з одним і тим самим джерелом вуглецю. Проте наші експерименти показали, що використання відпрацьованих олій для вирощування інокуляту не приводило до підвищення показників синтезу етаполану на цих субстратах (таблиця 5).

Найбільша концентрація ЕПС (11–14 г/дм³) спостерігалася при вирощуванні штаму ІМВ В–7005 на відпрацьованій після смаження м'яса соняшниковій і кукурудзяній оліях, що характеризуються вищим вмістом поліненасичених жирних кислот. У той же час кількість етаполану, синтезованого в аналогічних умовах культивування *Acinetobacter* sp. ІМВ В–7005 на відпрацьованих оліях з вищою концентрацією мононенасичених жирних кислот (оливковій та ріпаковій) була дещо нижчою (9–10 г/дм³), проте ЕПС-синтезувальна здатність (10–15 г ЕПС/г АСБ) перевищувала таку на

соняшниковій та кукурудзяній олії. З літератури відомо, що оливкова і ріпакова олії характеризуються наявністю фенольних сполук (Montaño et al., 2016), які, очевидно, також впливають на накопичення біомаси та ЕПС.

Цікавими виявилися дані щодо синтезу етаполану на соняшниковій олії холостого смаження (табл. 5). При культивуванні штаму ІМВ В-7005 на такому субстраті концентрація ЕПС становила всього 3,0 г/дм³. Отримані результати підтверджують літературні дані про те, що доцільність використання відпрацьованої олії в якості субстрату зумовлена наявністю в ній поживних речовин, які переходять з їжі в процесі смаження (Bordin et al., 2013). Крім того, при холостому нагріванні олії утворюється вдвічі більше токсичних альдегідів, оскільки при смаженні продуктів ці сполуки частково видаляються разом з паром (Bordin et al., 2013).

Зазвичай у закладах громадського харчування і на підприємствах з переробки рослинної сировини олії різного виду та якості перед утилізацією змішують. Тому на наступному етапі досліджували синтез етаполану на суміші різних пересмажених олій.

Експерименти показали, що незалежно від виду олії в середовищі для отримання інокуляту (оливкова чи соняшникова), показники синтезу етаполану на суміші відпрацьованих соняшnikової та оливкової олій (у співвідношенні 1:4; 4:1; 1:1) були дещо нижчими, ніж за умов росту продуцента на рафінованій соняшниковій олії, але при цьому спостерігали підвищення ЕПС-синтезувальної здатності на 14–41 %. Використання змішаної після смаження м'яса, картоплі, цибулі, сиру соняшnikової олії як субстрату для отримання етаполану супроводжувалося синтезом такої ж концентрації полісахариду, як і на рафінованій олії.

Одним з підходів до інтенсифікації синтезу цільового продукту є дробне внесення субстрату. Раніше (Пирог та ін., 2006) було показано, що дробне внесення фумарату калію (порціями по 0,2 %) дало змогу підвищити кількість синтезованого ЕПС в 4–5 разів і вихід ЕПС від спожитого субстрату (етанол+фумарат) досягав 60–80 %. Наші дослідження показали, що зниження початкової концентрації змішаної соняшnikової олії до 1,25–2 % з наступним дробним внесенням порціями по 1,25–1,5 % у процесі культивування до кінцевої концентрації 5 % супроводжувалося підвищенням концентрації етаполану на 15–20 % порівняно з одноразовим внесенням 5 % субстрату.

Розчини етаполану, синтезованого при дробному внесенні субстрату, у концентрації 0,05 % емульгували гексадекан, бензин, дизельне паливо (індекс емульгування 48–52 %), причому утворена емульсія залишалася стабільною упродовж 20 діб. З літератури відомо, що сформовані емульсії гексадекану з емульсаном (в концентрації 1 мг/см³) зберігалася впродовж всього лише 4 діб, а ЕПС, синтезовані *Enterobacter cloacae*, в концентрації 1 мг/см³ формували емульсії з широким набором гідрофобних субстратів, яка залишалася стабільною впродовж 10 діб (Iyer et al., 2006). Отже, етаполан має ряд переваг порівняно з іншими ЕПС, що робить перспективним його використання в різних технологіях.

Таблиця 5 – Синтез етаполану на рослинних оліях з високим вмістом поліненасичених жирних кислот

Олія	Олія в середовищі для		г ЕПС/ г АСБ
	Одержання інокуляту	Біосинтезу ЕПС	
Соняшникова	Рафінована	Рафінована	7,5±0,38
		Після смаження м'яса	6,3±0,32
	Після смаження картоплі	Після смаження картоплі	4,2±0,21
		Після смаження м'яса	5,9±0,29
		Після смаження картоплі	4,3±0,2
Кукурудзяна	Рафінована	Рафінована	7,6±0,38
		Після смаження м'яса	6,3±0,32
	Після смаження картоплі	Після смаження картоплі	Н.в.
		Після смаження м'яса	7,4±0,37
		Після смаження картоплі	7,8±0,39
Соняшникова	Холостого смаження	Холостого смаження	6,5±0,33

Примітка. Н.в. – не визначали, концентрація олії 5 %, NH₄NO₃ – 0,6 г/дм³; пантотенату – 0,00095 %.

Таким чином, одержані результати засвідчують можливість створення універсальної технології одержання мікробного екзополісахариду етаполану на відпрацьованих оліях різного виду та якості, незалежної від регіону та постачальника цього субстрату.

Розділ 6 Технологія постферментаційної культуральної рідини *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 – продуцента екзополісахариду етаполану

На основі одержаних експериментальних даних розроблено технологію етаполану на відпрацьованій соняшниковій олії (5 %, об'ємна частка) для його використання у вторинному нафтовидобуванні на ПАТ «Охтирканафтогаз». Проведено розрахунок потужності виробництва етаполану (для 262 свердловин за умов їх 4-х разового оброблення в рік розчином ЕПС (у кількості 15 м³) концентрацією 0,05 %): річна потреба продукту (909,7 м³), кількість продукту, отриманого за цикл ферментації (5,1 м³), кількість стадій отримання посівного матеріалу (4 стадії).

Теоретичні розрахунки витрат на приготування поживного середовища для отримання постферментаційної культуральної рідини *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 згідно розробленої технології для вторинного нафтовидобування становлять 3535,6 грн, що в 1,3–5,4 рази менше порівняно з іншими технологіями етаполану та в 13 разів (44928 грн) – порівняно з технологією найвідомішого полісахариду ксантану (продуцент *Xanthomonas campestris*) за умов видобування аналогічної кількості нафти.

На базі даних техніко-економічного обґрунтування розроблено тимчасовий технологічний регламент на виробництво культуральної рідини *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 для вторинного видобутку нафти (додаток А). Технологічний процес складається із допоміжних (санітарна підготовка виробництва, підготовка стерильного технологічного повітря та поживного середовища) і основних (вирощування посівного матеріалу на 0,5 % рафінованої соняшниковій олії, біосинтез ЕПС на 5 % відпрацьованої соняшnikової олії) робіт, а також стадій пакування та маркування. До складу розробленого тимчасового регламенту входять наступні розділи: характеристика кінцевого продукту виробництва, характеристика сировини і матеріалів, опис технологічного процесу, матеріальний баланс виробництва, технологічна і апаратурна схеми процесу та карта постадійного контролю виробничого процесу.

ВИСНОВКИ

В дисертаційній роботі встановлено можливість синтезу мікробного полісахариду етаполану на різних видах відпрацьованих олій різної якості, в тому числі і змішаній олії, що дає змогу вирішити наступні питання: 1) утилізація токсичного відходу; 2) підвищення ефективності біотехнології ЕПС за рахунок використання як субстрату промислового відходу; 3) зниження

собівартості цільового продукту; 4) реалізація технології незалежної від виду і постачальника відпрацьованої олії.

1. Встановлено, що оптимальною концентрацією мультивітамінного комплексу «Комплевіт» (у перерахунку на пантотенат), що забезпечує максимальні показники синтезу етаполану на середовищі з різною концентрацією соняшникової олії є 0,00085–0,00095 %.

2. Підвищення концентрації NH_4NO_3 з 0,4 г/дм³ до 0,6 г/дм³, пантотенату до 0,00095 %, дало змогу реалізувати процес синтезу етаполану (концентрація ЕПС 12,5 г/дм³) на середовищі з 5 % рафінованої соняшникової олії.

3. Внесення екзогенної глюкози (складник етаполану) і фумарату (попередник глюконеогенезу) у концентрації 0,05 % в середовище культивування штаму ІМВ В-7005 з рафінованою соняшниковою олією дало змогу підвищити кількість синтезованого етаполану в 1,1–1,4 разів, а також збільшити в'язкість його розчинів у 2–9,9 разів порівняно з показниками без попередників.

4. Встановлено, що максимальна концентрація етаполану (14,4 г/дм³) на відпрацьованій після смаження м'яса соняшникової олії досягалася за використання інокуляту вирощеного на відповідній рафінованій олії.

5. Встановлено можливість використання як субстрату для синтезу етаполану відпрацьованих олій різного виду. Максимальна концентрація ЕПС (11–14 г/дм³) спостерігалася на відпрацьованій після смаження м'яса соняшниковій і кукурудзяній оліях, що характеризуються високим вмістом поліненасичених жирних кислот. Кількість етаполану, синтезованого на відпрацьованій оливковій та ріпаковій оліях була нижча, проте ЕПС-синтезувальна здатність перевищувала таку за використання кукурудзяної та соняшникової олій у 1,6–2,4 рази.

6. Використання змішаної після смаження м'яса, картоплі, цибулі, сиру соняшникової олії як субстрату для отримання етаполану супроводжувалося синтезом такої ж концентрації ЕПС, як і на рафінованій олії. Зниження початкової концентрації змішаної соняшникової олії до 1,25–2 % з наступним дробним внесенням порціями по 1,25–1,5 % у процесі культивування до кінцевої концентрації 5 % супроводжувалося підвищенням концентрації етаполану на 15–20 % порівняно з одноразовим внесенням 5 % субстрату.

7. Розроблено технологію та тимчасовий технологічний регламент одержання культуральної рідини *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на основі відпрацьованої соняшникової олії для вторинного видобутку нафти.

8. Теоретичні розрахунки витрат на приготування поживного середовища для отримання культуральної рідини *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005, необхідної для підвищення вторинного нафтовидобутку на свердловинах «Охтирканафтогаз» (262 шт.) становлять 3535,6 грн, у той час як для одержання відомого ЕПС ксантану (в кількості, що забезпечить видобуток еквівалентної кількості нафти) – 44928 грн.

СПИСОК ОСНОВНИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях

1. Ivahniuk, M.O.; Pirog, T.P. Intensification of Microbial Exopolysaccharide Ethapolan Synthesis under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 Cultivation on Sunflower Oil. *Ukrainian Food Journal* **2014**, 3 (2), pp 257–262. (Журнал входить до затвердженого МОН Переліку наукових фахових видань України з технічних наук; міжнародна індексація *Index Copernicus*).

Особистий внесок дисертанта: дослідження можливості використання високих концентрацій рафінованої соняшникової олії для синтезу ЕПС етаполану.

2. Івахнюк, М.О.; Гриценко, Н.А. Вплив Умов Культивування на Синтез Мікробних Екзополісахаридів. *Наукові Праці Національного Університету Харчових Технологій* **2014**, 20 (6), с 27–34. (Журнал входить до затвердженого МОН Переліку наукових фахових видань України з технічних наук; міжнародна індексація *Index Copernicus*).

Особистий внесок дисертанта: аналіз умов культивування продуцентів ЕПС на кількість та якість синтезованого продукту.

3. Івахнюк, М.О.; Пирог, Т.П. Вплив Способу Підготовки Посівного Матеріалу на Синтез Полісахариду Етаполану на Олієвмісних Субстратах. *Наукові Праці Національного Університету Харчових Технологій* **2015**, 21 (5), с 17–21. (Журнал входить до затвердженого МОН Переліку наукових фахових видань України з технічних наук; міжнародна індексація *Index Copernicus*).

*Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу якості інокуляту на показники синтезу *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 на відпрацьованій соняшниковій олії.*

4. Ivakhniuk, M.; Voronenko, A.; Pirog, T. Peculiarities of Microbial Exopolysaccharide Ethapolan Synthesis on Mixed Waste Oils. *Ukrainian Food Journal* **2018**, 7 (1), pp 96–104. (Журнал входить до затвердженого МОН Переліку наукових фахових видань України з технічних наук; міжнародна індексація *Index Copernicus*).

Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу етаполану на середовищі з сумішшю олій у різному співвідношенні.

5. Ivakhniuk, M.; Pirog, T. Comparative Characteristics of Ethapolan and Xanthan Exopolysaccharides as Agents for the Increasing Secondary Oil Extraction. *Ukrainian Journal of Food Science* **2018**, 6 (1), pp 62–71. (Журнал входить до затвердженого МОН Переліку наукових фахових видань України з технічних наук; міжнародна індексація *Index Copernicus*).

Особистий внесок дисертанта: встановлення економічної доцільності розробленої технології.

Патент на винахід

6. Пирог, Т.П.; Гриценко, Н.А.; Івахнюк, М.О. (Національний Університет Харчових Технологій). Спосіб Одержання Екзополісахариду. Патент України

на Винахід 108323, Квіт 10, 2015.

Особистий внесок дисертанта: встановлення можливості використання мультівітамінного препарату «Комплевіт» як замітника пантотенату.

Патенти на корисну модель

7. Пирог, Т.П.; Гриценко, Н.А.; Ивахнюк, М.О. (Національний Університет Харчових Технологій). Спосіб Одержання Екзополісахариду. Патент України на Корисну Модель 92015, Лип 25, 2014.

Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу екзогенної глюкози на синтез мікробного полісахариду етаполану.

8. Пирог, Т.П.; Гриценко, Н.А.; Ивахнюк, М.О. (Національний Університет Харчових Технологій). Спосіб Одержання Екзополісахариду. Патент України на Корисну Модель 92017, Лип 25, 2014.

Особистий внесок дисертанта: дослідження впливу екзогенного фумарату на синтез мікробного полісахариду етаполану.

Статті у інших наукових журналах

9. Ivahniuk, M.; Pirog, T.; Penchuk, Yu. Synthesis of Exopolysaccharide Ethapolan During Cultivation of Auxotroph *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 in the Medium with Sunflower Oil. *Apriori. Серія Естествознание и Технические Науки* [Online]; **2014**, 5, с 1–10. <http://www.apriori-journal.ru/journal-estesvennie-nauki/id/403> (дата звернення Жов 3, 2018). (Електронний журнал індексується наукометричною базою *Google Scholar*).

Особистий внесок дисертанта: встановлення оптимальних умов культивування продуцента етаполану на середовищі з рафінованою соняшниковою олією.

10. Пирог, Т.П.; Павлюковец, И.Ю.; Ивахнюк, Н.А.; Савенко, И.В. Биотрансформация Бактерии Рода *Acinetobacter* Отработанного Подсолнечного Масла в Поверхностно-Активные Вещества и Экзополисахариды. *Известия Национальной Академии Наук Беларуси. Серия Биологических Наук* **2015**, 4, с 116–121. (Науковий журнал включений в наукометричну базу РИНЦ).

Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу етаполану на високих концентраціях відпрацьованої соняшникової олії.

11. Pirog, T.P.; Ivakhniuk, M.O.; Voronenko, A.A. Exopolysaccharides Synthesis on Industrial Waste. *Biotechnologia acta* **2016**, 9 (2), pp 7–18. (Науковий журнал індексується наукометричною базою *Index Copernicus*).

Особистий внесок дисертанта: аналіз літератури останніх років щодо синтезу мікробних полісахаридів на різних відходах, узагальнено отримані дані, проведено порівняння літературних даних з результатами власних досліджень.

12. Пирог, Т.П.; Ивахнюк, Н.А.; Вороненко, А.А. Микробный Синтез Экзополисахариды Этаполана на Различных Видах Отработанных Растительных Масел. *Известия Национальной Академии Наук Беларуси. Серия Биологических Наук* **2017**, 2, с 87–93. (Науковий журнал включений в наукометричну базу РИНЦ).

Особистий внесок дисертанта: дослідження синтезу мікробного ЕПС етаполану на різних видах відпрацьованих олій.

Публікації у матеріалах наукових конференцій

13. Івахнюк, М.О.; Гриценко, Н.А.; Пирог, Т.П. «Комплевіт» як Замінник Пантотенату Кальцію при Культивуванні Продуцента Етаполану *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005. *Nauka i Inowascja–2013*, Materiały X Międzynarodowej Naukowi-praktycznej Konferencji, Pszemyzhl, Polska, Październik 07-15, 2013; *Nauka i studia: Pszemyzhl*, 2013; s 29–31.

14. Івахнюк, М.О. «Комплевіт» як Замінник Пантотенату для Культивування Ауксотрофного Продуцента Полісахариду Етаполану. *Наукові Здобутки Молоді - Вирішенню Проблем Харчуванню Людства у XXI Столітті*, Матеріали 80 Міжнародної Наукової Конференції Молодих Учених, Аспірантів і Студентів, Київ, Україна, Квітень 10-11, 2014; НУХТ: Київ, 2014; с 605–606.

15. Івахнюк, М.О. Мультивітамінний Препарат як Замінник Пантотенату для *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 – Продуцента Екзополісахариду Етаполану. *Біотехнологія XXI Століття*, Тези Доповідей VIII Всеукраїнської Науково-практичної Конференції, Київ, Україна, Квітень 25, 2014; НТУУ “КПІ”: Київ, 2014; с 118.

16. Івахнюк, М.О.; Пирог, Т.П. Соняшникова Олія як Субстрат для Синтезу Мікробного Екзополісахариду Етаполану. *Europejska Nauka XXI Powieką – 2014*, Materiały X Międzynarodowej Naukowi-praktycznej Konferencji, Pszemyzhl, Polska, Maj 07-15, 2014; *Nauka i studia: Pszemyzhl*, 2014; s 8–11.

17. Івахнюк, М.О.; Пирог, Т.П. Синтез Екзополісахариду Етаполану *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 за Використання Мультивітамінного Препарату «Комплевіт» як Джерела Факторів Росту. *Сучасні Досягнення Фармацевтичної Технології та Біотехнології*, Матеріали IV Науково-практичної Конференції з Міжнародною Учасстю, Харків, Україна, Жовтень 16-17, 2014; НФаУ, Харків, 2014; с 123.

18. Івахнюк, Н.А. Особенности Синтеза Мікробного Екзополісахарида Етаполана на Различных Маслосодержащих Субстратах. *Актуальные Вопросы Биомедицинской Инженерии*, Сборник Материалов IV Всероссийской Научной Конференции для Молодых Ученых, Студентов и Школьников, Саратов, Россия, Октябрь 20-Декабрь 15, 2014; Издательский Центр “Наука”: Саратов, 2014; с 73–75.

19. Івахнюк, М.О.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Синтез Мікробного Полісахариду Етаполану на Олієвмісних Відходах. *Химия, Био- и Нанотехнологии, Экология и Экономика в Пищевой и Косметической Промышленности*, Сборник Материалов III Международной Научно-практической Конференции, Харків, Україна; Октябрь 15-16, 2015; НТУ “ХПИ”: Харьков, 2015; с 126–129.

20. Павлюковец, І.Ю.; Івахнюк, Н.А.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Биоконверсия Отработанного Подсолнечного Масла в Поверхностно-Активные Вещества *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 и Экзополісахариды *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005. *Новітні Досягнення Біотехнології та*

Нанофармакології, Тези Доповідей III Міжнародної Науково-практичної Конференції, Київ, Україна, Жовтень 22-23, 2015; Мегапринт: Київ, 2015; с 86–87.

21. Павлюковец, І.Ю.; Никитюк, Л.В.; Ивахнюк, Н.А. Биоконверсия Отходов Пищевой Промышленности в Практически Ценные Микробные Метаболиты. *Продовольчі Ресурси: Проблеми і Перспективи*, Збірник Наукових Праць за Матеріалами III Міжнародної Науково-практичної Конференції, Київ, Україна, Листопад 4, 2015; ННЦ ІАЕ: Київ, 2015; с 54–56.

22. Ивахнюк, Н.А.; Вороненко, А.А. Влияние Качества Отработанного Растительного Масла на Синтез Микробного Полисахарида Этаполана. *Перспективы Развития Биологии, Медицины и Фармации*, Материалы IV Международной Научной Конференции Молодых Ученых и Студентов, Шымкент, Казахстан, Декабрь 9-10, 2016; Серпилис: Шымкент, 2016; с 21–22.

23. Ивахнюк, М.О.; Вороненко, А.А. Синтез Микробного Полисахарида Этаполану на Олієвмісних Промислових Відходах. *Біотехнологія: Досвід, Традиції та Інновації*, Збірник Наукових Праць I Міжнародної Науково-практичної Інтернет-конференції, Київ, Україна, Грудень 14-15, 2016; НУХТ: Київ, 2016; с 247–253.

24. Ивахнюк, М.О.; Вороненко, А.А.; Блонська, А.А. Вплив Якості Відпрацьованої Рослинної Олії на Синтез Микробного Полисахарида Этаполану. *Біотехнологія XXI Століття*, Матеріали XI Всеукраїнської Науково-практичної Конференції, Київ, Україна, Квітень 21, 2017; Політехніка: Київ, 2017; с 117.

25. Ивахнюк, М.О.; Вороненко, А.А.; Блонська, А.А.; Пирог, Т.П. Особливості Синтезу Екзополісахарида Этаполану на Різних Видах Відпрацьованої Рослинної Олії. *Сучасні Досягнення Фармацевтичної Технології і Біотехнології*, Збірник Наукових Праць VI Науково-практичної Конференції з Міжнародною Учасстю, Харків, Україна, Жовтень 13, 2017; НФаУ: Харків, 2017; с 123–125.

26. Ивахнюк, М.О.; Вороненко, А.А.; Пирог, Т.П. Використання Відпрацьованих Олій для Синтезу Екзополісахарида Этаполану. *Біотехнологія: Звершення та Надії*, Збірник Тез VI Міжнародної Науково-практичної Конференції, Присвяченої до 120-річчя НУБіП, Київ, Україна, Листопад 14-16, 2017; КОМПРИНТ: Київ, 2017; с 194–196.

27. Ивахнюк, Н.А.; Вороненко, А.А. Инновационный Способ Утилизации Отработанного Растительного Масла. *Перспективы Развития Биологии, Медицины и Фармации*, Материалы V Международной Научной Конференции Молодых Ученых и Студентов, Шымкент, Казахстан, Декабрь 8-9, 2017; Серпилис: Шымкент, 2017; с 8–9.

28. Voronenko, A.A.; Ivakhniuk, M.O. Influence of Exogenous Precursors on the Rheological Properties of Exopolysaccharide Ethapolan. *Студенческая Наука и Здоровье*, Сборник Тезисов 60-й Научно-практической Конференции Студентов, Семей, Казахстан, Март 13-14, 2018; SMU: Семей, 2018; с 48.

29. Ивахнюк, М.О.; Вороненко, А.А. Використання Змішаних Відпрацьованих Олій як Субстрату для Синтезу Микробного Полисахарида

Етаполану. *Наукові Здобутки Молоді – Вирішенню Проблем Харчування Людства у XXI Столітті*, Матеріали 84 Міжнародної Наукової Конференції Молодих Учених, Аспірантів і Студентів, Київ, Україна, Квітень 23-24, 2018; НУХТ: Київ, 2018; с 480.

30. Ivakhniuk, M.; Olefirenko, Y. Rheological Properties Regulation of Microbial Exopolysaccharide Ethapolan. *Наукові Здобутки Молоді – Вирішенню Проблем Харчування Людства у XXI Столітті*, Матеріали 84 Міжнародної Наукової Конференції Молодих Учених, Аспірантів і Студентів, Київ, Україна, Квітень 23-24, 2018; НУХТ: Київ, 2018; с 481.

31. Ivakhniuk, M.O. Rheological Properties Regulation of Exopolysaccharide Ethapolan. *Фармацевтична Наука та Практика: Проблеми, Досягнення, Перспективи Розвитку*, Матеріали II Науково-практичної Інтернет-конференції з Міжнародною Учасстю, Харків, Україна, Квітень 27, 2018; НФаУ: Харків, 2018; с 38.

32. Ivakhniuk, M.O.; Voronenko, A.A. Peculiarities of Microbial Exopolysaccharide Ethapolan Synthesis on Mixture of Waste Oils. *Universum View*, Збірник Матеріалів Міжнародної Науково-практичної Конференції, Краматорськ, Україна, Вересень 28, 2018; Нілан-ЛТД: Вінниця, 2018; с 10–11.

33. Івахнюк, М.О.; Пирог, Т.П. Синтез Мікробного Полісахариду Етаполану на Суміші Відпрацьованих Олій. *Науково-практичні Засади Загальноінженерної Підготовки Фахівців Фармації*, Збірник Наукових Праць I Міжнародної Науково-практичної Інтернет-конференції, Харків, Україна, Жовтень 25-26, 2018; НФаУ: Харків, 2018; с 118–120.

34. Івахнюк, М.; Пирог, Т.; Вороненко, А. Використання Суміші Відпрацьованих Олій як Субстрату для Синтезу Етаполану. *Біотехнологія: Досвід, Традиції та Інновації*, Збірник Наукових Праць II Міжнародної Науково-практичної Інтернет Конференції, Київ, Україна, Листопад 15, 2018; НУХТ: Київ, 2018; с 66.

35. Івахнюк, М.О.; Вороненко, А.А. Синтез Екзополісахариду Етаполану на Олієвмісних Відходах Харчової Промисловості. *Наукові Дослідження у 2018 Році*, Матеріали XV Міжнародної Науково-практичної Конференції Студентів та Молодих Вчених, Краматорськ, Україна, Лютий 9, 2018; ТОВ Нілан-ЛТД: Вінниця, 2018; с 59–61.

АНОТАЦІЯ

Івахнюк М.О. Синтез мікробного полісахариду етаполану на олієвмісних промислових відходах. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний університет харчових технологій МОН України, Київ, 2019.

Дисертаційна робота присвячена розробці технології синтезу мікробного екзополісахариду етаполану штамом *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на відпрацьованих (пересмажених) оліях з різним вмістом полі- та мононенасичених жирних кислот.

Максимальна концентрація етаполану (14–15 г/дм³) досягалася за концентрації відпрацьованої соняшникової олії 5 % (об'ємна частка), нітрату амонію 0,6 г/дм³ і використання інокуляту, вирощеного на відповідній рафінованій олії. Дробне внесення субстрату в процесі культивування штаму ІМВ В-7005 дало змогу підвищити кількість екзополісахариду на 20 %.

Завдяки високій емульгувальній активності розчину етаполану ($E_{24}=48-52\%$), одержаного згідно розробленої технології, екзополісахарид штаму ІМВ В-7005 може бути використаний як складник косметичних кремів для рук.

Розроблено тимчасовий технологічний регламент на виробництво культуральної рідини *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на основі відпрацьованої соняшникової олії для вторинного видобутку нафти

Ключові слова: *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005, екзополісахариди, етаполан, ауксотроф, біоконверсія, відпрацьовані олії, реологічні властивості, екзогенні попередники.

АННОТАЦІЯ

Ивахнюк Н.А. Синтез микробного полисахарида этаполана на маслосодержащих промышленных отходах. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности – 03.00.20. Национальный университет пищевых технологий МОН Украины, Киев, 2019.

Диссертационная работа посвящена разработке технологии синтеза микробного экзополисахарида этаполана штаммом *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на отработанных (пережаренных) маслах с различным содержанием поли- и мононенасыщенных жирных кислот.

Максимальная концентрация этаполана (14–15 г/дм³) достигалась при концентрации отработанного подсолнечного масла 5 % (по объему), нитрата аммония 0,6 г/дм³ и использовании инокулята, выращенного на соответствующем рафинированном масле. Дробное внесение субстрата в процессе культивирования штамма ІМВ В-7005 позволило повысить количество экзополисахаридов на 20 %.

Благодаря высокой эмульгирующей активности раствора этаполана ($E_{24} = 48-52\%$), полученного согласно разработанной технологии, экзополисахарид штамма ІМВ В-7005 может быть использован как составляющий компонент косметических кремов для рук.

Разработан временный технологический регламент на производство культуральной жидкости *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на основе отработанного подсолнечного масла для вторичной нефтедобычи

Ключевые слова: *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005, экзополисахариды, этаполан, ауксотроф, биоконверсия, отработанные масла, реологические свойства, экзогенные предшественники.

SUMMARY

Ivakhniuk M.O. Synthesis of microbial polysaccharide ethapolan on oil-containing industrial waste. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Technical Sciences in speciality 03.00.20 – Biotechnology. – National University of Food Technologies the MES of Ukraine, Kyiv, 2019.

Dissertational work is devoted to the development of technology for the microbial exopolysaccharide (EPS) ethapolan synthesis by *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 on waste oils with different contents of poly- and monounsaturated fatty acids.

Today, microbial EPS are the subject of intense theoretical and applied researches. One of the most promising EPS is ethapolan. The producer of ethapolan is auxotroph for calcium pantothenate, industrial production of which is absent in Ukraine. A market research of multivitamin drugs that could be a source of pantothenate was conducted. Among the considered drugs the most promising for us was multivitamin complex "Complevit". The optimal concentration of "Complevit" (in recount on pantothenate), which provides maximum ethapolan synthesis in a medium with different concentrations of sunflower oil, is 0.00085–0.00095 %.

As in further work is planning to replace the refined oil on the waste, at the next stage the synthesis of ethapolan was investigated in a medium with the maximum possible concentration of refined sunflower oil.

Increasing of sunflower oil concentration in basic medium for *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation to 4–5 % was accompanied by decrease of ethapolan synthesis compared with those in the medium containing lower (2–3 %) substrate concentration. Increasing ammonium nitrate content to 0.6 g/cm³ and/or pantothenate concentration to 0.00095 % in a medium with 5% sunflower oil allowed to increase the amount of ethapolan synthesized up to 12.5 g/dm³, that is in 1.3–1.4 times higher than in the basic medium with the same concentration of the substrate but lower NH₄NO₃ (0.4 g/dm³) and pantothenate (0.00085 %).

One of the approaches to the intensification of microbial synthesis technologies is adding of exogenous precursors of biosynthesis. Adding of exogenous glucose (a component of ethapolan) and fumarate (precursor of gluconeogenesis) at a concentration of 0.05 % in the cultivation medium of the strain IMV B-7005 with refined sunflower oil made it possible to increase the amount of synthesized ethapolan in 1.1–1.4 times, as well as to increase the viscosity of its solutions in 2–9.9 times compared with the indicators without predecessors.

The possibility to replace refined oil on waste after meat and potato frying and unrefined oil for biosynthesis of ethapolan was studied. It is established that using inoculum grown on refined oil is accompanied by the synthesis of 14.4–15.5 g/dm³ of ethapolan on the waste oil after frying meat and unrefined sunflower oils (5 %). The indices of ethapolan synthesis in the medium containing waste oil after frying potato were increased from 4.2 g/dm³ to 8.1 g/dm³ with using inoculum grown on the same substrate.

Synthesis of exopolysaccharide ethapolan on waste oils of various qualities (with different ratios of mono- and polyunsaturated fatty acids) was investigated as

the generation of one or another waste depends on the region where the production is concentrated and the type of manufactured oil. It was established that the highest ethapolan concentration (11–14 g/dm³) was observed under *Acinetobacter* sp. IMV B-7005 cultivation on waste after frying meat sunflower and corn oils (that characterized by higher content of polyunsaturated fatty acids) at concentration 5 %, with using inoculum grown on refined oils. Replacing these oils in the cultivation medium on olive and rapeseed (with higher content of monounsaturated fatty acids) accompanied by some decrease in EPS concentrations (to 9–10 g/dm³), but the EPS-synthesizing ability was higher in several times (6.3–7.6 g EPS/ g biomass).

Also we have shown that regardless of the oil type in the inoculum obtaining medium (olive or sunflower), the ethapolan synthesis indexes on the mixture of waste sunflower and olive oils (in the ratio of 1:4; 4:1; 1:1) were slightly lower than in conditions of the producer growth on refined sunflower oil, but at the same time increasing of the EPS-synthesizing ability on 14–41 % was observed. Using mixed after frying meat, potatoes, onions and cheese sunflower oil as a substrate for the ethapolan production accompanied by the synthesis of the same polysaccharide concentration, as well as on refined oil. Reduction of the initial quantity of mixed sunflower oil to 1.25–2 % with followed fractional adding in portions of 1.25–1.5 % in the cultivation process to the final amount of 5% was accompanied by increase of ethapolan concentration on 15–20 % compared to a one-time addition of 5 % substrate. Solutions of the synthesized under such conditions polysaccharide at concentration of 0.05 % emulsified hexadecane, gasoline, diesel fuel (emulsification index 48–52 %), and the formed emulsion was stable for 20 days.

Temporary technological regulation for the *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 culture fluid obtaining from waste oil for secondary oil production was developed.

Theoretical calculations of the cost for the nutrient medium preparing for *Acinetobacter* sp. IMB B-7005 culture fluid obtaining needed to increase secondary oil production at “OkhtyrkaNaftogaz” (262 units) is 3535.6 UAH, while for the production of the well-known EPS, xanthan (in the amount that will provide an equivalent amount of oil) – 44928 UAH.

Due to the high emulsifying activity of the ethapolan solution, obtained according to the developed technology, the strain IMV B-7005 EPS can be used as a component of hand cosmetic creams.

Keywords: *Acinetobacter* sp. IMV B-7005, exopolysaccharides, ethapolan, auxotroph, bioconversion, waste oils, rheological properties, exogenous precursors.