

## БИОРЕФАЙНИНГ И БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

УДК 663.18

### ПРИМЕНЕНИЕ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА СОЕВОГО МОЛОКА В БИОТЕХНОЛОГИИ КСАНТАНОВОЙ КАМЕДИ

*R.V. Asase, D.A. Seredovich, M.V. Pirogov, T.V. Glukhareva*

Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Химико-технологический институт, 620002 Екатеринбург, Россия

Оценена возможность использования окары – богатого питательными веществами отхода производства соевого молока – в качестве субстрата для производства ксантановой камеди, широко используемого полисахарида. Предложена питательная среда на основе окары и изучен процесс ферментации *X. campestris* B6720 для получения ксантана. Проведена оценка роста клеточной культуры, изменения pH, содержания остаточного сахара и белка в течение процесса культивирования, а также измерен выход ксантановой камеди, который составил 8,12 г/л.

**Ключевые слова:** ксантановая камедь, окара, утилизация отходов, устойчивая биотехнология, ферментация, циклическая экономика, производство биополимеров, валоризация отходов

### APPLICATION OF WASTE FROM SOYMILK PRODUCTION IN XANTHAN GUM BIOTECHNOLOGY

*R.V. Asase, D.A. Seredovich, M.V. Pirogov, T.V. Glukhareva*

Ural Federal University of the first President of Russia B. N. Yeltsin, Institute of Chemical Engineering, 620002 Yekaterinburg, Russia

The potential of using okara, a nutrient-rich waste product of soy milk production, as a substrate for the production of xanthan gum, a widely used polysaccharide, was evaluated. An okara-based nutrient medium was proposed, and the fermentation process of *X. campestris* B6720 to obtain xanthan was studied. The cell culture growth, pH change, residual sugar and protein content during the cultivation process were evaluated, and the xanthan gum yield was measured, which was 8.12 g/L.

**Keywords:** xanthan gum, okara, waste utilization, sustainable biotechnology, fermentation, circular economy, biopolymer production, waste valorization

Растущий спрос на устойчивые технологии и сокращение отходов в различных отраслях промышленности вызывает значительный интерес к использованию побочных продуктов и отходов. Одной из быстрорастущих отраслей пищевой промышленности является производство соевого молока, что обусловлено увеличивающейся популярностью растительных диет [1]. Отходы производства соевого молока, часто называемые окарой, богаты питательными веществами и являются перспективным сырьем для повторного использования в биотехнологических процессах. Применение окары в производстве ксантановой камеди, на наш взгляд, может не только решить проблему управления этими отходами, но и увеличить их экономическую ценность за счет повышения производства такого важного биополимера как ксантан [5].

Ксантановая камедь – полисахарид, широко используемый благодаря своим уникальным реологическим свойствам в качестве загустителя и стабилизатора в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности, также он применяется в процессах добычи нефти и газа. Традиционно ксантановую камедь получают путем ферментации *Xanthomonas campestris* [2, 4]. Однако зависимость от индивидуальных источников углеводов, таких как глюкоза или сахароза, увеличивает производственные затраты и воздействие на окружающую среду. Исследование

альтернативных, экономически эффективных субстратов для производства ксантановой камеди имеет решающее значение для ее устойчивой биотехнологии [3].

Окара, нерастворимый осадок, остающийся после извлечения соевого молока из соевых бобов. Большое количество этого отхода представляет серьезную проблему его утилизации. Окара, состоящая в основном из полисахаридов, белка и липидов, является отличным кандидатом для процессов ферментации [6]. Ее потенциал выступать субстратом для производства ксантановой камеди не только представляет устойчивое решение для утилизации окары, но и снижает зависимость технологии от традиционных источников углеводов.

Целью данного исследования является изучение возможности использования отходов соевого молока для производства ксантановой камеди. Для оценки потенциала этого отхода пищевой промышленности нами была предложена питательная среда для культивирования *Xanthomonas campestris* на основе окары, изучен рост микроорганизмов, определено изменение pH, содержания остаточного сахара и белка в течение процесса культивирования, а также измерен выход ксантановой камеди.

### **Материалы и методы**

Коммерческая ксантановая камедь была приобретена у ИП Нимченко В.В. (Москва, Россия). Соя была приобретена в ООО Амальгама (Ижевск, Россия). Бактерии, штамм *X. campestris* B6720, были приобретены в Национальном биоресурсном центре Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» (Москва, Россия).

*Получение окары.* Соевые бобы взвешивали (120 г), промывали и замачивали в дистиллированной воде (в соотношении 1:10) на ночь при комнатной температуре. Воду сливали, а соевые бобы измельчали до получения мелкой кашицы и нагревали до кипения и кипятили 5 мин, после чего процеживали для извлечения соевого молока, остаток полученной окары промывали 1,2 л горячей воды (90°C). Затем окару высушивали и измельчали до порошкообразного состояния.

*Выращивание и поддержание микроорганизмов.* Лиофилизированные бактериальные клетки регидратировались в течение 15 минут в стерильной среде, содержащей 1,7 г солодового экстракта, 1,0 г пептона и 100 мл дистиллированной воды. Аликвоту объемом 1 мл регидратированной клеточной культуры высевали на пластину агаризованной питательной среды (глюкоза 2,0 г, дрожжевой экстракт 1,0 г, пептон 1,0 г, агар 1,7 г и дистиллированная вода 100 мл). Культуру инкубировали при 28 °C в течение 48 часов. Затем хранили при 4 °C и пересевали каждые две недели.

*Подготовка инокулята.* Одну бактериальную петлю 48-часовой чистой культуры *X. campestris* с агаризованной среды помещали в стандартную среду для биосинтеза, содержащую 2,0 г глюкозы, 0,3 г дрожжевого экстракта, 0,01 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,2 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 0,2 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> в 100 мл дистиллированной воды. Культуру клеток инкубировали при 28 °C и 250 об/мин в течение 24 часов с использованием орбитального шейкера-инкубатора Biosan Orbital-Incubator ES-20 (Biosan, Латвия).

*Биосинтез ксантановой камеди.* Среда для биосинтеза была приготовлена объемом 2,5 л с использованием дистиллированной воды, 100 г окары, 15 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 г K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 0,25 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. После автоклавирования при 121 °C в течение 40 минут среду охлаждали до комнатной температуры. Для начала биосинтеза было использовано 10% (об./об.) инокулята. Биосинтез протекал в 5-литровом ферментаторе Winpact Evo System FS-07 (Major Science, Тайвань) с рабочим объемом 2,5 л при 28 °C и 250 об./мин в течение 96 часов.

*Измерение оптической плотности.* Оптическую плотность (OD) культуральной жидкости (на 0, 1, 2, 3 и 4 день) определяли с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония) при λ = 600 нм.

*Измерение pH.* pH образцов измеряли при 25 °C с помощью pH-метра FiveEasy (Mettler Toledo Ltd., Виктория, Австралия).

*Определение количества сахаров.* Общее содержание растворимого сахара определяли фенол-сернокислотным методом, как описано Нильсеном [8]. Показания снимали при длине волны 487 нм с использованием раствора глюкозы в качестве стандарта в концентрациях 10–50 мг/л.

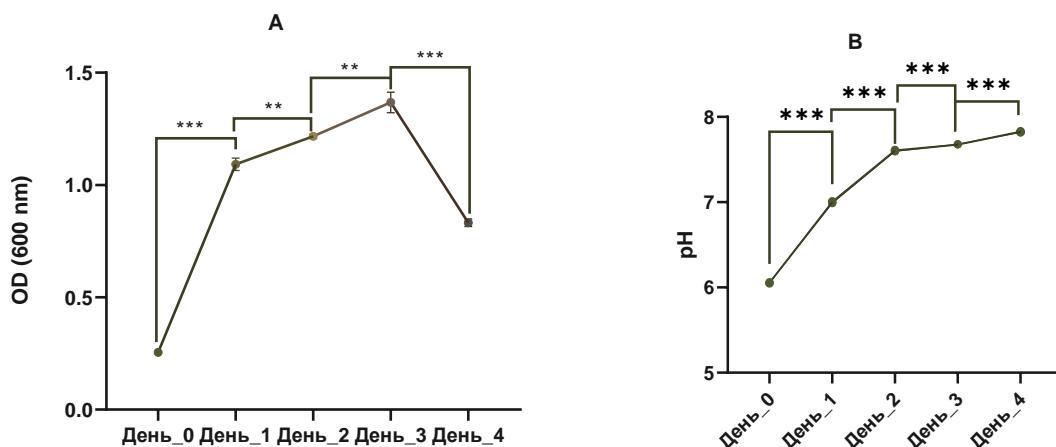
*Определение содержания белка.* Содержание белка в ферментационном бульоне определяли с помощью метода Лоури [7]. Поглощение измеряли с помощью спектрофотометра Shimadzu 1800-UV при  $\lambda = 750$  нм. После этого содержание белка рассчитывали с использованием калибровочной кривой, полученной с использованием сывороточного альбумина.

*Осаждение и количественное определение ксантановой камеди.* Культуральную жидкость центрифugировали при 5000 об/мин в течение 20 мин при 4 °C для удаления клеток (биомассы) и остатков окары. Камедь, содержащуюся в супернатанте, осаждали с использованием изопропанола в соотношении 1: 2 (об./об.), затем выдерживали при 4 °C в течение 24 часов и отделяли центрифугированием. Осадок (камедь) высушивали при 50 °C в течение 24 часов в термостате и взвешивали.

*Статистический анализ.* Все статистические анализы выполняли с использованием статистического программного пакета GraphPad Prism 8. Полученные данные анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), а для сравнения средних значений использовали критерий множественного сравнения Тьюки.

### Обсуждение результатов

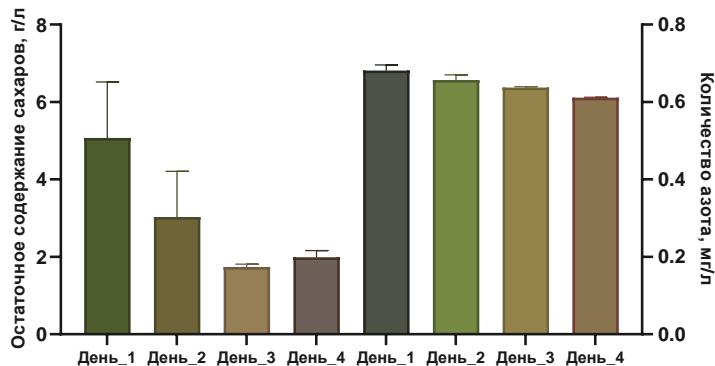
На рисунке 1 (А) представлено изменение оптической плотности культуральной жидкости (OD) при 600 нм в течение четырех дней, отражающее рост микробной культуры во время ферментации. Результаты показывают, что окара может эффективно поддерживать рост *X. campestris*, при этом значительное накопление биомассы наблюдается в течение первых суток. Однако для максимизации выхода ксантана крайне важно устраниć факторы, приводящие к снижению биомассы на 4 сутки. Выявление этих факторов и оптимизация процесса ферментации может помочь в поддержании роста и повышении общей производительности процесса.



**Рис. 1.** Изменение оптической плотности, OD (А) и pH (В) культуральной жидкости в течение ферментации. Точки – средние значения ( $n=3$ ), \*\* достоверное отличие ( $p < 0.0002$ ) \*\*\* достоверное отличие ( $p < 0.0001$ ).

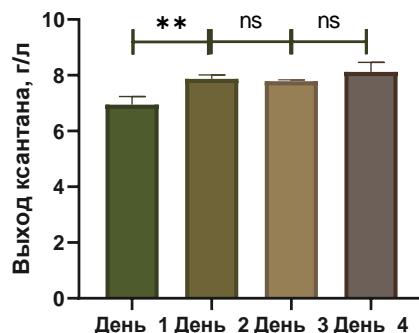
На рис. 1 (В) представлены изменения pH в течение четырех дней процесса ферментации. Значения pH указывают на кислотно-щелочной баланс в среде, который может влиять на микробную активность и общую эффективность ферментации. Наблюдаемые изменения pH в процессе ферментации подчеркивают динамическую природу микробной активности и использования субстрата. Мониторинг и поддержание pH в оптимальном диапазоне имеют важное значение для максимизации выхода продукта и обеспечения успешного процесса ферментации. На начальном этапе наблюдается значительное увеличение pH, что коррелирует с активным ростом клеточной массы. Однако со 2-го дня существенных изменений pH не происходит, возможно это связано с достижением критических значений для роста культуры, а также с нейтрализацией среды ксантаном, содержащим кислотные группировки.

Содержание сахара (г/л) и белка (мг/л) в культуральной жидкости в течение четырехдневного периода (с 1-го по 4-й день) в процессе ферментации показаны на рис. 2.



**Рис. 2.** Остаточный сахар (г/л) и содержание белка (мг/л). Столбики – средние значения ( $n=3$ ), а планки погрешностей – стандартное отклонение средних значений.

Содержание остаточного сахара указывает на количество углеводов, оставшихся в среде, в то время как содержание белка отражает доступность азота, необходимого питательного вещества для роста микроорганизмов. Результаты показывают, что бактерии эффективно использовали сахар в процессе ферментации, с заметным снижением, наблюдаемым к 3-му дню. Количество азота слабо изменилось за последние три дня, поскольку замедлился рост микроорганизмов. Для оптимизации процесса культивирования в дальнейшем необходимо оптимизировать соотношение источников углерода и азота в питательной среде, чтобы максимизировать выход продукта.



**Рис. 3.** Выход ксантановой камеди. Столбцы – средние значения ( $n = 3$ ), а планки погрешностей – стандартное отклонение средних значений, где \*\* – достоверное отличие ( $p = 0,003$ ), а ns – отсутствие достоверного отличия ( $p < 0,05$ ).

На рис. 3 показано изменение количества ксантановой камеди (г/л) в процессе ферментации. Значительное увеличение с 1-го по 2-ой день, за которым следуют лишь незначительные изменения, свидетельствует, что максимальная скорость производства ксантана достигается на ранней стадии процесса ферментации. Со 2 дня и далее значительного увеличения выхода ксантана не наблюдается. Эти результаты подчеркивают важность оптимизации условий ферментации для достижения высоких выходов ксантановой камеди.

### Заключение

Таким образом, в ходе исследования показана возможность получения ксантановой камеди культивированием *X. campestris* B6720 в среде на основе окары с выходом 8.12 г/л. В дальнейшем для увеличения выхода ксантана планируется оптимизировать состав питательной среды и условия культивирования.

**Благодарность.** Исследования выполнены за счет совместного гранта Российского научного фонда и Правительства Свердловской области № 24-16-20054, <https://rscf.ru/project/24-16-20054/>.

**Библиографический список**

1. Asase R.V., Seredovich D., Selezneva I., Glukhareva T. Xanthan gum production using *Xanthomonas campestris* B6720: Fermentation process and application in fermented soymilk // BIO Web of Conferences. 2024. Vol. 121. 01005.
2. Asase R. V., Glukhareva T. V. Production and application of xanthan gum—prospects in the dairy and plant-based milk food industry: a review // Food Science and Biotechnology. 2024. Vol. 4, № 33. P. 749–767.
3. Felicia Katherine R., Muthukumaran C., Sharmila G., Manoj Kumar N., Tamilarasan K., Jaiganesh R. Xanthan gum production using jackfruit-seed-powder-based medium: optimization and characterization // 3 Biotech. 2017. Vol. 4, № 7. P. 248.
4. Kang Y., Li P., Zeng X., Chen X., Xie Y., Zeng Y., Zhang Y., Xie T. Biosynthesis, structure and antioxidant activities of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* with additional furfural // Carbohydrate Polymers. 2019. Vol. 216. P. 369–375.
5. Li B., Qiao M., Lu F. Composition, Nutrition, and Utilization of Okara (Soybean Residue) // Food Reviews International. 2012. Vol. 3, № 28. P. 231–252.
6. Lin D., Long X., Huang Y., Yang Y. Effects of microbial fermentation and microwave treatment on the composition, structural characteristics, and functional properties of modified okara dietary fiber // LWT. 2020. Vol. 123. 109059.
7. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A. L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // Journal of Biological Chemistry. 1951. Vol. 1, № 193. P. 265–275.
8. Nielsen S. S. Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates // Food Analysis Laboratory Manual, Food Science Texts Series, Springer Science+Business Media, LLC 2010. P. 47–53.