

Міністерство освіти України  
Український державний університет харчових технологій

На правах рукопису

Задніпряна Зоя Анатоліївна

УДК 547.4; 577.1; 576.8

**Розробка та впровадження технології  
мікробного полісахариду аубазідану**

Спеціальність 05.18.19 – процеси біологічної  
переробки харчових продуктів

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

Київ 1996



AB 33. 027

Робота виконана в Українському науково-  
дослідному інституті спирту і біотехнології  
продовольчих продуктів

Наукові керівники:

Г.О. Нікітін

доктор технічних наук, професор,  
академік Міжнародної інженерної  
академії

С.Т. Олійнічук

кандидат технічних наук,  
член-кореспондент УТА

Офіційні опоненти:

А.Є. Мелетьєв

доктор технічних наук, професор

М.І. Кошель

кандидат технічних наук,  
член-кореспондент УЕА

Провідна організація:

Інститут мікробіології і вірусоло-  
гії НАН України

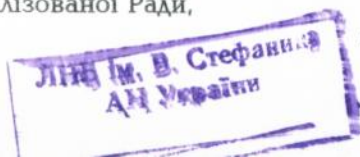
Захист відбудеться "26" червня 1996 р. о 15 годині на  
засіданні спеціалізованої Ради Д.01.15.01 Українського державного  
університету харчових технологій, аудиторія А 311.

Автореферат розісланий "24" травня 1996 р.

Запрошуємо Вас взяти участь у засіданні спеціалізованої Ради або  
надіслати відгук у двох примірниках, затверджений печаткою  
організації, за адресою: 252017, Київ – 17, вул. Володимирська, 68

Вчений секретар спеціалізованої Ради,

к.т.н., доцент



О.І. Семенова

## Загальна характеристика роботи

**Актуальність теми.** Мікробні полісахариди, які мають унікальні фізико-хімічні і функціональні властивості знаходять широке застосування в різних галузях промисловості, створюючи конкуренцію природним полімерам. Дослідження властивостей мікробних полісахаридів розширює можливості їх застосування як цінних харчових добавок. В зв'язку з цим потреба в біополімерах мікробного походження, придатних для застосування в харчовій промисловості, постійно зростає.

На протязі останніх років в Україні завершено дослідження і проводиться промислове впровадження технологій таких мікробних полімерів як ксантан, поліміксан, синусан та інші. Одним з перспективних полісахаридів для застосування в харчовій промисловості є аубазідан. Технологія цього полісахариду розроблена в Росії Санкт-Петербурзьким хіміко-фармацевтичним інститутом на основі глибинного культивування *A.pullulans*, яка дозволяє отримувати до 10 г/дм<sup>3</sup> аубазідану і потребує для цього високі сировинні, енергетичні та матеріальні затрати.

Саме тому, необхідність розробки нової технології шляхом застосування більш продуктивного штаму *A.pullulans* та оптимізації процесів біосинтезу аубазідану і післяферментаційної обробки культуральної рідини, які спрямовані на одержання полісахариду з наперед визначеними і заданими властивостями, економію матеріальних і енергетичних затрат та зниження собівартості кінцевого продукту є актуальною проблемою.

**Мета і задачі дослідження.** Мета дослідження – розробка та впровадження нової технології одержання мікробного поліса-

хариду аубазідану та визначення шляхів його використання. Ви –  
ходячи з поставленої мети в роботі були поставлені слідуючі за –  
дачі:

- провести поглиблене вивчення властивостей культури *A.pullulans* – продуцента аубазідану та відібрати високопродук –  
тивний штам по синтезу аубазідану;

- визначити оптимальні фізико – хімічні параметри біо –  
синтезу аубазідану відбіраною культурою *Aureobasidium pullulans*  
штам 4;

- підібрати і оптимізувати склад ферментаційних середо –  
вищ для росту *A.pullulans* і синтезу аубазідану;

- розробити ефективний спосіб післяферментаційної об –  
робки культуральної рідини та виділення полісахариду;

- вивчити якісну характеристику аубазідану та намітити  
перспективи і шляхи його використання;

- провести медико – біологічні дослідження напрацьованих  
зразків аубазідану.

**Наукова новизна роботи.** Шляхом направленої селекції ві –  
дбрано штам *Aureobasidium pullulans*, який в 1,4 рази перевищує  
вихідну культуру по синтезу полісахариду;

- вивчені основні технологічні параметри глибинного  
культивування *A.pullulans*, що дозволило обґрунтувати нові ас –  
пекти технологічного режиму біосинтезу полісахариду;

- отримані дані про вплив значення рН ферментаційного  
середовища і реагента титрування на вихід полісахариду та кое –  
фіцієнт конверсії вуглеводів в цільовий продукт;

– експериментально визначено, що синтез аубазідану залежить від природи джерел вуглецю та азоту, а також їх оптимального співвідношення;

– науково обґрунтовано та експериментально підтверджено спосіб концентрування розчину аубазідану ультрафільтрацією;

– теоретично обґрунтовано доцільність використання полісахариду в кондитерських, хлібобулочних виробках, молочних та м'ясних продуктах, харчових концентратах.

**Практична цінність і реалізація результатів.** Створено апаратно – технологічну схему і розроблено технологічний режим одержання мікробного полісахариду аубазідану. Розроблено і затверджено "Опытно – промышленный регламент производства низкокалорийного структурообразователя – аубазидана" та вихідні дані і техноробочий проект установки потужністю 1,0 тонна аубазідану в рік.

На базі Лужанського експериментального заводу змонтовано і освоєно дослідно – промислову установку по виробництву 1,0 тонни полісахариду в рік. Дослідно – промислова установка і розроблена технологія аубазідану здані відомчій комісії 01.12.1994 року.

Підготовлені технічні умови на полісахарид та нормативно – технічну документацію на продукти з його застосуванням.

**Апробація роботи.** Матеріали дисертації доповідались на Міжнародній науково – технічній конференції: "Розробка та впровадження нових технологій і обладнання у харчову та переробні галузі АПК" (Київ, 1993 рік) та науково – практичній конференції "Пути решения пищевого белка в Украине" (Київ, 1994 рік), симпозіумі "Протирадіаційні засоби та їх застосування

у зв'язку з аварією на ЧАЕС" (Київ, 1995 рік) та засіданнях вчепних рад УкрНДІспиртбіопрод – 1992–1995 років, використовувались в учбовому процесі УДУХТ.

**Публікації.** По матеріалах дисертаційної роботи опубліковано 13 робіт, в т.ч. отримана I заявка на видачу патента "Спосіб отримання аубаздану" (№ 94020611).

**Структура і об'єм роботи.** Дисертаційна робота викладена на 123 сторінках машинописного тексту і складається із вступу, 4 розділів, загальних висновків і додатків, містить 26 таблиць, 20 рисунків. Список використаної літератури містить 161 джерел.

**Особистий внесок автора** полягає у загальному визначенні мети та завдань дослідження, виконанні наукових експериментів, аналізів та узагальненні отриманих результатів, участі у розробці науково-технічної документації, а також у написанні наукових публікацій.

## **Основні результати роботи**

### **Сучасний стан виробництва мікробних полісахаридів**

Представлена загальна характеристика мікробних полісахаридів і шляхи їх біосинтезу. Особливу увагу приділено екзополісахаридам, які синтезує культура *Aureobasidium pullulans*. Розглянуто вплив технологічних параметрів на біосинтез мікробних полісахаридів та способи виділення їх з культуральної рідини.

Критично проаналізовані дані огляду літератури по поставленій проблемі, сформульовані задачі досліджень, які націлені на оптимізацію процесу мікробіологічного синтезу аубаздану та

створення його ефективного промислового виробництва для харчової промисловості.

### Об'єкти та методи досліджень

Об'єктами дослідження були культура *Aureobasidium pullulans* штам 4, отриманий шляхом направленої селекції, та мікробний полісахарид аубазідан – продукт синтезу досліджуваної культури.

Глибинне культивування культури *Aureobasidium pullulans* в лабораторних умовах проводили в колбах на круговій качалці (220 об/хв.) і лабораторному ферментері АКЛ–10М, а в дослідно–промислових умовах у ферментерах об'ємами – 100,0 дм<sup>3</sup> і 1,0 м<sup>3</sup>.

При підборі поживних середовищ для росту *Aureobasidium pullulans* і синтезу аубазідану використовували різні джерела вуглецю, азоту, фосфору в певних концентраціях. Контрольним середовищем служило поживне середовище Чапека–Докса.

Біосинтез аубазідану в культуральній рідині контролювали по наступних показниках: відсутність сторонньої мікрофлори, кількість біомаси (г/дм<sup>3</sup> АСР), кількість аубазідану (г/дм<sup>3</sup> АСР), значення рН, динамічна в'язкість (Спз) і відносна в'язкість культуральної рідини.

Продуктивність культури *Aureobasidium pullulans* по синтезу аубазідану оцінювали по коефіцієнту фізіологічної активності (відношення кількості аубазідану до кількості біомаси в певний момент часу), степені конверсії субстрата в полісахарид та сте–

пені утилізації вуглеводів культурою на синтез аубазідану (еконічному коефіцієнту).

Виділення полісахариду в лабораторних умовах проводили відомими методами. В дослідно-промислових умовах клітини продуцента відділяли з культуральної рідини на сепараторі ОМН-2.0 (Росія) з подальшим його концентруванням на ультрафільтраційній установці УФІ-20/30 (Німеччина).

Ідентифікацію аубазідану проводили методом високоефективної рідинної хроматографії. Для визначення функціональних груп і типів їх зв'язку в зразках полісахаридів застосовували інфрачервону спектроскопію.

Математичну обробку отриманих результатів здійснювали з використанням статичних методів планування і обробки експериментальних даних.

## **Оптимізація технології одержання мікробного полісахариду аубазідану**

### Селекція продуцента аубазідану

Культуру *Aureobasidium pullulans* штаму 4 отримали шляхом направленої селекції штаму 19, переданого з музею культур Санкт-Петербурзького хіміко-фармацевтичного інституту. Мутагенним фактором було вибране імпульсне електричне поле (напруженістю 5 кв/см та тривалістю імпульсу 30 мкс). Шляхом скрінінгу виділених колоній (табл. 1) за фізіологічно-біохімічними властивостями був відібраний штаму 4 *Aureobasidium pullulans*.

Виділений штаму 4 *Aureobasidium pullulans* відрізнявся від вихідного штаму 19 наступним:

Таблиця 1. – Продуктивність різних штамів по синтезу аубазідану

Номер виділеного штаму	Морфо – логічний тип штаму	Показники культуральної рідини на 96 годину ферментації					
		pH	Біомаса, г/дм <sup>3</sup> АСР	Аубазідан, г/дм <sup>3</sup> АСР	Коефіцієнт фізіологічної активності	Степінь кон – версії	Максимальна питома швид – кість росту, год <sup>-1</sup> $\mu_{max}$
3	III	4,3	4,6±0,21	9,2±0,20	2,00	19,6	0,059
4	I	4,0	5,0±0,14	13,6±0,21	2,70	27,2	0,061
5	II	4,2	3,9±0,24	10,3±0,33	2,54	20,4	0,052
6	III	4,1	4,2±0,27	9,0±0,40	2,14	18,0	0,058
7	I	4,0	4,7±0,14	11,8±0,18	2,51	23,6	0,059
8	II	4,1	3,9±0,16	9,6±0,14	2,40	19,2	0,050
Вихідна культура 19	II	4,0	4,1±0,19	10,0±0,27	2,43	20,0	0,050

– збільшенням продуктивності по синтезу аубазідану в 1,4 рази;

– затримкою утворення чорної пігментації на колонії *Au – geobasidium pullulans* з 7 до 20 – 22 діб, що має суттєвий вплив на колір і якість кінцевого продукту;

– скороченням періоду вирощування посівного матеріалу на скошеному сусло – агарі від 7 до 3 – 4 діб, що дозволяє скоротити цикл біосинтезу аубазідану з 19 до 9 – 10 діб і цим значно знизити собівартість кінцевого продукту.

### Вплив фізико – хімічних факторів на біосинтез аубазідану Кількість і якість посівного матеріалу

Експериментально встановлено, що для запобігання втрат поживних компонентів середовища в процесі ферментації і для

накопичення максимальної кількості полісахариду доцільно використовувати 36-годинний інокулюм в об'ємі 7,0 % від об'єму ферментаційного середовища, що забезпечує скорочення тривалості ферментації при періодичному культивуванні *Aureobasidium pullulans* на 24 години.

Важливим резервом підвищення продуктивності і економічності процесу є наближення синтезу полісахариду до початку процесу, тобто ближче до часу досягнення максимальної швидкості росту продуцента. Виконані дослідження (рис. 1) дають підставу стверджувати, що багатоциклічне культивування *Aureobasidium pullulans* штаму 4 забезпечує зміщення фази синтезу аубазидану в бік фази росту продуцента.

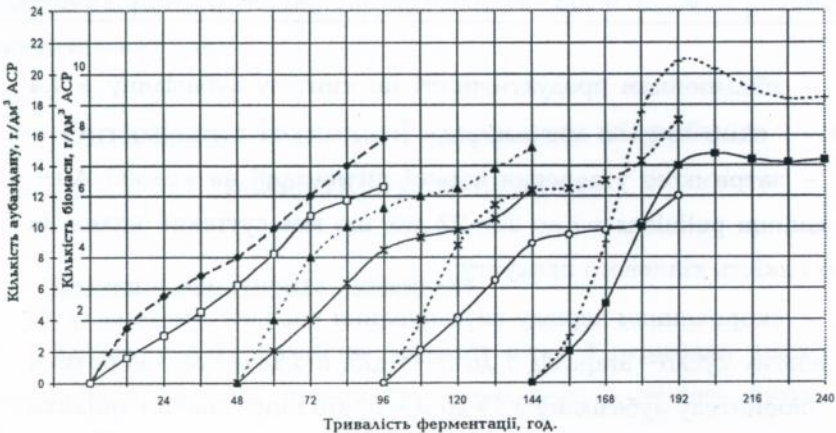


Рис. 1. Кінетика накопичення біомаси і синтезу аубазидану при багатоциклічному культивуванні

- — кількість біомаси, г/дм<sup>3</sup> АСР  
 ..... — кількість аубазидану, г/дм<sup>3</sup> АСР

Використання частини культуральної рідини на стадії експоненціального росту культури в кількості 7,0% об'ємних ферментаційного середовища в наступному циклі забезпечує високу інтенсивність синтезу аубазідану, зменшує кількість субстрата на вирощування посівного матеріалу, скорочує на 48 годин тривалість процесу, економить матеріальні і енергетичні затрати.

### Температура культивування

Експериментально встановлено, що біосинтез аубазідану двофазний процес, де I – фаза інтенсивного росту культури *Au-geobasidium pullulans*, II – фаза активного синтезу полісахариду. Для оптимізації біосинтезу аубазідану з метою одержання максимальної кількості полісахариду необхідно процес ферментації проводити в наступному режимі: на протязі перших 24 годин при температурі 28°C, в подальші години – при температурі 24°C.

### Концентрація іонів водню середовища

Вибір оптимальних значень рН ферментаційного середовища є фактор підвищення продуктивності мікробного синтезу полісахариду. В процесі біосинтезу аубазідану відбувається зниження величини рН культуральної рідини від 6,8–6,4 до 4,2–3,9. Це викликано тим, що в процесі ферментації поряд з полімером утворюється ряд органічних кислот таких, як молочна, яблучна, янтарна, цис-аконітова,  $\alpha$ -кетоглутарова, концентрація яких змінюється в залежності від фази росту культури та синтезу аубазідану. Серед органічних кислот превалує синтез молочної,

максимальна кількість якої утворюється на 48 годину ферментації в період інтенсивного синтезу полісахариду.

Таблиця 2. – Вплив початкового значення рН ферментаційного середовища на біосинтез аубазідану (Показники культуральної рідини на 72 годину ферментації)

Початкове значення рН ферментаційного середовища	Реагент титрування, кислота	рН	Кількість біомаси, г/дм <sup>3</sup> АСП	Кількість аубазідану, г/дм <sup>3</sup> АСП	Степінь конверсії, %	Коефіцієнт фізіологічної активності
4,0	молочна, 40%	3,9	5,9±0,14	15,6±0,13	31,2	2,6
	соляна, 1,0N	3,8	5,6±0,30	14,1±0,31	28,2	2,5
5,0	молочна, 50%	3,9	6,0±0,12	15,0±0,16	30,0	2,5
	соляна, 1,0N	3,8	5,7±0,14	13,4±0,34	26,8	2,4
6,0	молочна, 40%	3,9	6,1±0,15	14,4±0,15	28,8	2,4
	соляна, 1,0N	3,9	6,2±0,18	13,0±0,17	26,0	2,2
7,0	молочна, 40%	4,2	5,6±0,10	13,4±0,20	26,8	2,3
	соляна, 1,0N	4,1	5,8±0,31	12,6±0,17	25,2	2,2

Виходячи з експериментальних даних (табл. 2), зниження початкового значення рН ферментаційного середовища до 4,0 шляхом внесення в нього молочної кислоти забезпечує зменшення втрат цукру на утворення проміжних метаболітів та підвищує вихід кінцевого продукту на 19,3 %.

### Джерела вуглецю

Удосконалення культивування мікробного полісахариду аубазідану вимагає визначення економічно виправданого джерела вуглецю, який би забезпечував інтенсивне накопичення високо-

якісного полісахариду в культуральній рідині. Для вирішення поставленої задачі як джерело вуглецю використовували не-фільтроване сусло із пшениці, ячменю, кукурудзи, зернової суміші (пшениця : ячмінь = 1:1), фільтроване сусло із кукурудзи, гідролізований картопляний крохмаль, неохмелене пивне сусло, глюкозний сироп, сахарозу. Присутність нерозчинних компонентів в поживному середовищі на основі нефільтрованого сусла із зернових культур утруднюють процес виділення аубазідану і значно погіршують його якісні характеристики.

Аналіз кінетики біосинтезу аубазідану в ферментаційних середовищах з використанням різних джерел вуглецю (табл. 3) свідчать, що саме присутність глюкозного сиропу або сахарози в поживному середовищі забезпечують найбільшу степінь конверсії вуглеводів в полісахарид при активному його синтезі культурою *Aureobasidium pullulans*.

Таблиця 3. – Вплив джерел вуглецю на біосинтез аубазідану

№ пп	Джерело вуглецевого живлення	Початкова кількість сахарів в середовищі, г/дм <sup>3</sup>	Показники культуральної рідини на 72 год. ферментації					
			pH, од.	Кількість біомаси, г/дм <sup>3</sup> АСР	Кількість аубазідану, г/дм <sup>3</sup> АСР	Степінь конверсії, %	Відносна в'язкість, од.	Коефіцієнт фізіологічної активності
1.	Фільтроване кукурудзяне сусло	50,0	4,8	5,8±0,23	14,1±0,15	28,3	6,6±0,4	2,4
2.	Гідролізований картопляний крохмаль	50,0	5,3	8,2±0,40	14,7±0,31	29,5	6,8±0,2	1,8
3.	Неохмелене пивне сусло	50,0	4,2	5,2±0,18	12,5±0,26	25,0	7,3±0,3	2,4
4.	Глюкозний сироп	50,0	4,2	7,8±0,27	19,6±0,32	40,0	7,6±0,2	2,5
5.	Сахароза	50,0	4,0	6,4±0,25	16,0±0,32	32,5	7,2±0,2	2,5

### Джерело азоту

Направлений підбір умов біосинтезу аубазідану, який забезпечував би високий вихід полісахариду, значною мірою залежить від природи джерела азоту. Шляхом скрінінгу азотвмісних джерел живлення визначили їх вплив на ріст культури *Augeo-basidium pullulans* і синтез аубазідану. Представлені результати дослідження (рис. 2) вказують, що присутність в поживному середовищі амонійних солей, як джерел азоту, лімітують ріст продуцента і синтез полісахариду.

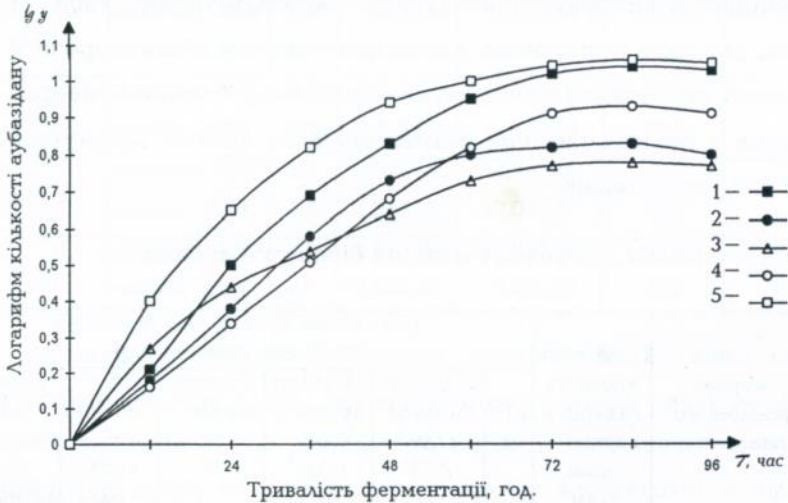


Рис. 2. Криві росту аубазідану на середовищах з різними джерелами азоту: 1 — сечовина (0,21 %); 2 — азотнокислий амоній (0,24 %); 3 — хлористий амоній (0,19 %); 4 — сірчанокислий амоній (0,24 %); 5 — азотнокислий натрій (0,3 %).

При внесенні сечовини або азотнокислого натрію в ферментаційне середовище спостерігається висока питома швидкість

росту клітин ( $\mu_{1\max} = 0,089 \text{ год}^{-1}$ ;  $\mu_{5\max} = 0,086 \text{ год}^{-1}$  (відповідно)) в експоненціальній фазі росту, що забезпечує високий вихід аубазідану на початку стаціонарної фази росту культури.

### Джерело фосфору

Присутність в поживному середовищі різних джерел фосфору неоднозначно впливає на біосинтез аубазідану.

Використання в середовищі однозаміщених фосфорних солей калію і натрію, як джерел фосфорного живлення, не стимулюють ні ріст культури, ні синтез полісахариду. Внесення діамонію фосфату в середовище, яке вже містить як основне джерело азоту – азотнокислий натрій, викликає діауксію, яка характеризується подовженням періоду лаг-фази і відсуває по часу досягнення максимальної швидкості синтезу полісахариду.

Найбільш сприятливим джерелом фосфору для біосинтезу аубазідану є двозаміщений фосфорнокислий калій, який забезпечує інтенсивний ріст культури *Aureobasidium pullulans* ( $\mu_{\max} = 0,090 \text{ год}^{-1}$ ) і максимальне накопичення полісахариду на 72 годину ферментації.

### Оптимізація складу ферментаційного середовища

Методом математичного планування експерименту оптимізували склад ферментаційного середовища для росту *Aureobasidium pullulans* і синтезу аубазідану. Критерієм оптимізації був вибраний економічний коефіцієнт трансформації вуглецю в полісахарид. Вхідними факторами служили: сахароза,

як джерело вуглецю з діапазоном виміру  $2,0 \leq X_1 \leq 10,0$  %; азотно-кислий натрій, як джерело азоту, з діапазоном виміру  $0,1 \leq X_2 \leq 1,0$  %; двозаміщений фосфорнокислий калій, як джерело фосфору, з діапазоном виміру  $0,10 \leq X_3 \leq 0,30$  %.

Після реалізації дослідів у відповідності з матрицею ротабельного планування трифакторного експерименту, розрахунку коефіцієнтів пошукової моделі і оцінки їх значимості по градієнту отримано рівняння регресії, яке описує даний процес:

$$y = 35,221 - 9,582X_1 - 1,909X_2 + 4,923X_3 - 5,390X_1^2 + 1,270X_1X_2 - 3,385X_1X_3 + 2,857X_2^2 - 1,557X_2X_3 + 0,861X_3^2.$$

Економічний коефіцієнт досягає максимуму при наступному співвідношенні компонентів поживного середовища, %:

сахароза	– 4,0
азотнокислий натрій	– 0,84
двозаміщений фосфорнокислий калій	– 0,2
сірчаноокислий магній	– 0,05
хлористий калій	– 0,05
сірчаноокисле залізо	– 0,001,

при цьому вихід аубазідану на 72 годину ферментації становить  $17,8 \pm 0,34$  г/дм<sup>3</sup> АСР, при степені конверсії сахарози в аубазідан – 44,5 %. Аналіз складу отриманого ферментаційного середовища вказує, що оптимальним для синтезу аубазідану є співвідношення N:C = 1:12.

Враховуючи отримані результати дослідження по впливу різних джерел вуглецю і азоту на біосинтез аубазідану, було встановлено взаємозамінність сахарози глюкозним сиропом, азотнокислого натрію – сечовиною. Це дало можливість створити ще 3 нових ферментаційних середовища для росту *Augeo* –

*basidium pullulans* і синтезу полісахариду, на яких було досягнуто накопичення полісахариду в 1,7–1,8 рази більше, ніж на вихідному середовищі Чапека – Докса.

Удосконалення процесу біосинтезу аубазідану шляхом відбору високопродуктивного по синтезу аубазідану штама 4 Au – *geobasidium pullulans*, оптимізації умов культивування продуцента і складу поживних середовищ значно підвищує продуктивність процесу, що підтверджується збільшенням виходу аубазідану з 10,0 до 18,5 г/дм<sup>3</sup> АСР при зростанні активності продуцента синтезувати полісахарид з 2,5 до 2,7; скороченням тривалості ферментації з 96 до 72 годин; збільшенням степені конверсії джерела вуглецю в полісахарид з 21,0 до 46,3 %.

### **Післяферментаційна обробка культуральної рідини і виділення аубазідану**

Підвищені вимоги щодо чистоти аубазідану, як харчової добавки, пред'являють відповідні вимоги до схеми його виділення.

Дослідження процесів виділення клітинної біомаси з культуральної рідини свідчать, що повне її відділення клітин від полісахариду досягається на мікрофільтраційній установці в режимі діафільтрації з використанням мембран типу МіФІЛ з діаметром пор 0,8 мкм. В зв'язку з низькою продуктивністю мікрофільтраційного процесу в промислових умовах для виділення біомаси з культуральної рідини необхідно використовувати сепаратор. Незалежно від способу виділення клітинної біомаси культуральна рідина розбавляється водою у співвідношенні 1:4 – 1:6.

Концентрування безклітинного розчину аубазідану доцільно вести методом ультрафільтрації з використанням мембран типу

МФФК–1 з діаметром пор 0,15 мкм. Досліджений в лабораторних і апробований в промислових умовах режим виділення полісахариду (табл. 4) дає можливість сконцентрувати розчин аубазідану до рівня, який відповідає початковій концентрації полісахариду у вихідній культуральній рідині. При цьому об'ємний коефіцієнт концентрування складає 4,0–4,1, в'язкість розчину зменшується з підвищенням його температури до 53°C, а продуктивність збільшується на 30 %.

Таблиця 4. – Показники концентрування розчину аубазідану ультрафільтрацією

Тривалість роботи установки, хв.	Температура, °C	Тиск вхід/вихід, МПа	Продуктивність установки, $\text{дм}^3/\text{м}^2$	Концентрація полісахариду, $\text{г}/\text{дм}^3$ АСП	
				концентрат	перміат
1	2	3	4	5	6
0	35	–	–	3,0±0,17	0,0
15	38	0,05/0	150	4,3±0,24	0,0
30	39	0,05/0	150	4,8±0,30	0,0
45	41	0,05/0	150	5,4±0,18	0,0
60	43	0,05/0	150	7,5±0,14	0,0
75	45	0,1/0	180	9,0±0,21	0,0
90	48	0,1/0	200	10,7±0,16	0,0
105	50	0,1/0	210	12,4±0,41	0,0
120	52	0,1/0	200	13,8±0,34	0,0

Отримані результати досліджень покладені в основу схеми виділення аубазідану.

Відпрацювання та впровадження технології аубазідану в дослідно-промислових умовах

Технологічний режим культивування *Aureobasidium pullulans* штам 4 на оптимізованому середовищі відпрацьований на дослідно-промисловій установці (рис. 3) потужністю 1,0 тонна аубазідану в рік.

Посівним матеріалом, який виростили в лабораторних умовах, засівали посівне середовище в інокуляторі об'ємом 100,0 дм<sup>3</sup>. Біосинтез полісахариду проводили в ферментері об'ємом 1,0 м<sup>3</sup>. По закінченні процесу ферментації з метою інактивізації клітин *Aureobasidium pullulans* культуральну рідину нагрівали до температури 90°C і витримували її на протязі 30 хвилин в режимі працюючої мішалки. З метою уникнення гідролізу полісахариду при підвищенні температури попередньо підвищували значення рН культуральної рідини до 6,8–7,0. Для повного відділення клітинної біомаси від розчину аубазідану культуральну рідину розбавляли водою декілька разів до одержання її в'язкості не більше 10 Спз, а потім подавали на сепаратор ОМН–2. Отриманий розчин полісахариду концентрували на мікрофільтраційній установці УФІ–20/30 з модулем розділення, який оснащений мембранами типу МФФК–2. Внесення в концентрований розчин аубазідану хлористого калію до отримання 1,0 % його розчину перед осадженням етиловим спиртом дозволяє значно скоротити затрати спирту, необхідного для осадження біополімеру, крім того, це сприяє утворенню аубазідану міцної структури.

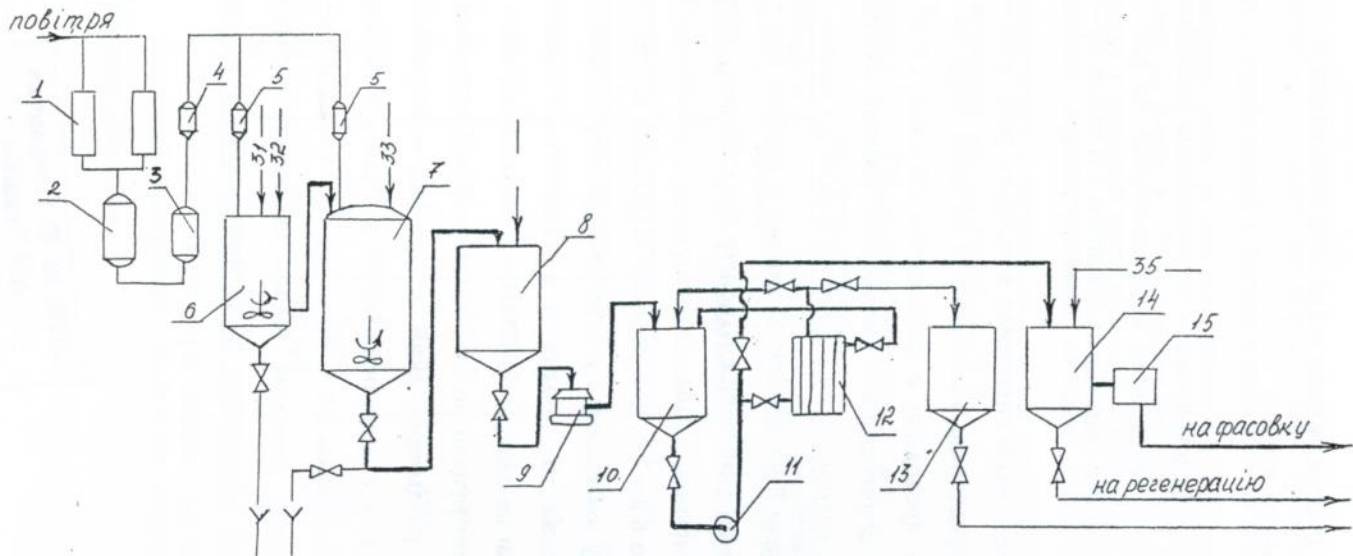


Рис. 3. Апаратурно-технологічна схема дослідно-промислової установки по виробництву аубазидану

1 — компресор; 2 — вологоуловлювач; 3 — головний фільтр; 4 — фільтр тонкої очистки; 5 — індивідуальний фільтр; 6 — посівний апарат; 7 — ферментер; 8 — ємкість для попередньої обробки культуральної рідини; 9 — сепаратор; 10 — збірник розчину аубазидану; 11 — насос; 12 — ультрафільтраційна установка; 13 — збірник перміату; 14 — збірник осадження аубазидану; 15 — сушарка.

Умовні позначення: -1- - вода; -3- - повітря; -31- - поживне середовище; -32- - інокулюм; -33- - ферментаційне середовище; -35- - етиловий спирт.

Якісний високомолекулярний полісахарид отримували при осадженні і зневодженні аубазідану трьома об'ємами етилового спирту на об'єм розчину полісахариду. Щільний зневоджений осад аубазідану сушили в сушарці при температурі 40–45°C до залишкової вогкості полісахариду – 10–12 %. Вихід кінцевого продукту становить 13,8 г/дм<sup>3</sup> АСР.

В результаті проведених досліджень відселекціоновано високопродуктивний по синтезу аубазідану штамп 4 *Aureobasidium pullulans*, підібрано основні технологічні параметри мікробного синтезу та виділення полісахариду.

На основі постадійного відпрацювання технологічного режиму розроблено "Опытно-промышленный регламент производства низкокалорийного структурообразователя – аубазидана". Розроблена технологія пройшла виробничі і відомчі випробування на Лужанському експериментальному заводі. Сукупність технологічних рішень, викладених в дисертаційній роботі, дали можливість створити високопродуктивну технологію з річним економічним ефектом від її реалізації – 1011,5 млн. крб.

Дослідженнями Українського наукового центру радіаційної медицини АМН України виявлено властивість аубазідану, як ефективного протектора радіоактивних елементів для організму людини. Проведені медико-біологічні дослідження зразків аубазідану підтвердили доцільність його застосування в харчових продуктах.

Враховуючи фізико-хімічні та функціональні властивості аубазідану, розроблено нові види харчових продуктів з його застосуванням: харчові концентрати, кондитерські вироби, молочні та м'ясні продукти.

## В и с н о в к и

1. Шляхом направленої селекції отримано високопродуктивний по біосинтезу аубазідану з уповільненою спороутворюючою властивістю штаму 4 *Aureobasidium pullulans*.
2. Встановлено оптимальні технологічні параметри глибинного культивування *A.pullulans*, які забезпечують зміщення синтезу полісахариду до початку ферментаційного процесу, в зв'язку з чим скорочується його тривалість з 96 до 72 годин і збільшується вихід аубазідану з 10,0 до 18,0 г/дм<sup>3</sup> АСР.
3. Проведено скрінінг джерел вуглецю і встановлено, що найбільш сприятливим по виходу аубазідану і економічності процесу є глюкозний сироп і сахароза.
4. Їз вивчених джерел азоту найбільшу швидкість росту культури *A.pullulans* і високий вихід полісахариду забезпечують азотнокислий натрій і сечовина.
5. Вивчено вплив джерела фосфору і його концентрації в поживному середовищі на синтез полісахариду. Встановлено, що найвища продуктивність культури по синтезу аубазідану забезпечується при застосуванні двозаміщеного фосфорнокислого калію.
6. Методом математичного планування експерименту розроблені і оптимізовані склад 4 ферментаційних середовищ для росту *A.pullulans* і синтезу аубазідану. При цьому оптимальним співвідношенням вуглець: азот в середовищі є 12:1.
7. Вивчено і розроблено технологічний режим концентрування розчину аубазідану на основі мембранної технології. Показано, що ступінь концентрування лімітується в'язкістю розчину і

- припиняється при значенні відносної в'язкості не нижче – 3,0.
8. Створено і введено в експлуатацію дослідно – промислову установку по виробництву аубазідану потужністю 1,0 тонна полісахариду в рік на базі Лужанського експериментального заводу.
  9. Розроблено і затверджено "Опытно – промышленный регламент производства низкокалорийного структурообразователя – аубазидана".
  10. Фізико – хімічні, органолептичні, мікробіологічні показники і структурний аналіз зразків полісахаридів, які отримали по технології УкрНДІспиртбіопрод підтверджують, що культура *Aureobasidium pullulans* штам 4 синтезує при вибраних вище умовах істинний аубазідан.
  11. Вивчені і визначені перспективи використання аубазідану в харчовій та мікробіологічній промисловостях.
  12. Медико – біологічні дослідження зразків аубазідану підтвердили доцільність його використання в харчовій промисловості.

#### **Публікації по темі дисертації:**

1. Олійничук С.Т., Задніпряна З.А., Шевченко В.І. Перспективний полісахарид // Харчова і переробна промисловість. – 1993. – №9. – с. 10.
2. Олійничук С.Т., Задніпряна З.А., Шевченко В.І. Концентрування розчину аубазідану мікрофільтрацією // Харчова і переробна промисловість. – 1996. – №3. – с. 28.

3. Заявка на видачу патента № 94020611. Спосіб одержання аубазідану / С.Т. Олійнічук, З.А. Задніпряна, В.І. Шевченко, К.О. Коваль. – Опубл. 08.07.93.

4. Заднепрыйный Ю.В., Заднепрыйная З.А., Овчинников В.В., Белушкина И.А., Шульга С.М., Немирович А.П. Мембранно – диффузионный газообменник для пищевой биотехнологии // Мембранная техника в медицине и биологии (Москва, октябрь 1991г.): Тезисы докладов Всесоюзной конференции. – с. 13 – 14.

5. Олійнічук С.Т., Задніпряна З.А., Коваль К.О., Процан Н.В. Вплив кількості та якості посівного матеріалу на біосинтез аубазідану // Розробка та впровадження нових технологій і обладнання у харчову та переробну галузі АПК (Київ, 19–21 жовтня 1993р.): Тези доповідей Міжнародної науково – технічної конференції. – с. 214 – 215.

6. Олійнічук С.Т., Задніпряна З.А., Коваль К.О., Процан Н.В. Вплив температури культивування на біосинтез аубазідану // Розробка та впровадження нових технологій і обладнання у харчову та переробну галузі АПК (Київ, 19–21 жовтня 1993р.): Тези доповідей Міжнародної науково – технічної конференції. – с. 212 – 213.

7. Олійнічук С.Т., Задніпряна З.А., Коваль К.О., Процан Н.В. Залежність виходу аубазідану від джерела азоту на синтетичному середовищі // Розробка та впровадження нових технологій і обладнання у харчову та переробну галузі АПК (Київ, 19–21 жовтня 1993 р.): Тези доповідей Міжнародної науково – технічної конференції. – с. 243 – 244.

8. Патюков С.Д., Заднепрыйная З.А., Нури И.А., Солецкая А.Д. Применение аубазидана с целью экономии мясных ресурсов // Пути решения проблемы пищевого белка в Украине (Киев,

9. Азарова Н.Г., Марсель М'бемба, Ени А.И., Заднепрная З.А. Совершенствование процесса холодильной обработки мяса // Пути решения проблемы пищевого белка в Украине (Киев, 1994г.): Тезисы докладов Международной научно – практической конференции. – с. 117.

10. Семикоз О.М., Віннікова Л.Г., Задніпрна З.А., Олійничук С.Т. Використання мікробного полісахариду аубазідану в м'ясній промисловості // Розробка та впровадження прогресивних технологій та обладнання у харчову та переробну промисловість (Київ, 1995р.): Тези доповідей Міжнародної науково – технічної конференції. – с. 281.

11. Зеленюх З.В., Олійничук С.М., Заднепрная З.А., Вовнянко Е.К., Осовик А.Н., Корзун В.Н. Новые виды пищевых концентратов с радиозащитными свойствами // Протирадіаційні засоби та їх застосування у зв'язку з аварією на ЧАЕС (Київ, 28 – 29 вересня 1995р.): Матеріали симпозіуму. – с. 21.

12. Олійничук С.Т., Заднепрная З.А., Корзун В.Н., Сагло В.И. Исследование физико – химических и функциональных свойств аубазидана // Протирадіаційні засоби та їх застосування у зв'язку з аварією на ЧАЕС (Київ, 28 – 29 вересня 1995р.): Матеріали симпозіуму. – с. 48.

13. Олійничук С.Т., Заднепрная З.А. Технология аубазидана и его использование в пищевых продуктах // Україна – в світових земельних, продовольчих, кормових ресурсах і економічних відносинах (Вінниця, 11 – 14 грудня 1995р.): Тези доповідей Міжнародної конференції. – с. 74.

Заднепряная З.А.

Разработка и внедрение технологии микробного полисахарида аубазидана. Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.18.19 – Процессы биотехнологической переработки пищевых продуктов.

Украинский государственный университет пищевых технологий, Киев, 1996 г.

Защищается диссертационная работа, которая содержит исследования, направленные на создание новой технологии микробного полисахарида аубазидана. Путем направленной селекции отобран высокопродуктивный штам *Aureobasidium pullulans*. Определены основные технологические параметры его глубинного культивирования. Оптимизирован состав питательной среды. Разработан эффективный способ обработки культуральной жидкости и выделения полисахарида. Доказана целесообразность использования полученного аубазидана в качестве пищевой добавки. Разработан и утвержден "Опытно – промышленный регламент низкокалорийного структурообразователя – аубазидана". Создана и внедрена опытно – промышленная установка по производству аубазидана мощностью 1,0 тонна полисахарида в год.

Ключевые слова: культура *Aureobasidium pullulans*, аубазидан, микробный биосинтез, культуральная жидкость, выделение полисахарида.

Zoya A. Zadnepryana

Elaboration and embedding of microbial polysaccharide aubazidana technology.

The work competing for Scientific Degree, specialty 05.18.19 – Processes of biotechnology utilization of food products. Ukrainian State University of food technology. Kiev, 1996.

Author defense scientific work, which contains research directed onto creation of a new technology of microbial polysaccharide aubasidan.

Highly protective *Aureobasidium pullulans*–4 was picked out by directed selection method. It's basic technological parameters of deep cultivating were defined. The composition of nutrient medium was optimized. The effective method of cultural liquid treatment and polysaccharide isolation was elaborated. The advisability of utilizing obtained aubazidana as food addition was proved. "Model – industrial regulation of low calorie structure – former aubazidana" was developed and affirmed. The model – industrial plant for producing aubazidan with output 1,0 tone per year was created and embedded.

The Key words: culture *Aureobasidium pullulans*,  
aubazidan, microbial biosynthesis,  
cultural liquid, polysaccharide isolation.

*Zoya*

**AB 35.027**