

Корисна модель має відношення до мікробіологічної промисловості, до галузі виробництва біополімерів і стосується технології виробництва і штама-продуцента екзополісахариду, який є нейтральним гомополісахаридом.

Ціль корисної моделі - одержання біополімера-полісахариду, який може використовуватись в нафтовидобувній промисловості, харчовій промисловості, в медицині, ветеринарії, для виготовлення та стабілізації мазей, емульсій і т.п., а також в інших галузях народного господарства.

Відомі винаходи по одержанню запропонованого екзополісахариду з використанням живильного середовища для культивування гриба *Aureobasidium Pullmans* - продуцента Аубазидана [авторське свідоцтво №1659484А1, оп. 30.06.91р.], з використанням штаму гриба *Aureobasidium Pullulans* [авторське свідоцтво №11559718А1, оп. 15.12.94р.]. В даних винаходах екзополісахарид одержують за допомогою штама *Aureobasidium Pullulans* ВКПМ F-371 на живильному середовищі з визначеними компонентами та їх вмістом. При цьому одержують гомополісахарид з потрібними властивостями, але тривалість культивування складає 90-120 годин, що є занадто довго, значно удорожчує процес.

Найбільш близьким до запропонованого нами є "Спосіб одержання аубазидану" [патент України №10607С2, оп. 16.10.2000р.]. Даний винахід описує спосіб одержання екзополісахариду шляхом культивування гриба (аспорогенних дріжджів) *Aureobasidium pullulans*, який включає приготування середовища посівного матеріалу, стерилізацію, вирощування посівного матеріалу, засів ферментаційного середовища посівним матеріалом і ферментацію, в якому при приготуванні посівного і ферментаційного середовищ для доведення потрібного значення рН використовують молочну кислоту, процес вирощування посівного матеріалу ведуть при рН 4,8-5,0 протягом 30-36 годин, а ферментацію ведуть при рН 4,0-4,2 і температурі 28-30°C протягом перших 24 годин з наступним зниженням температури ферментації до 22-24°C впродовж 70-72 годин. Даний спосіб скорочує тривалість культивування (ферментації) на 20-50 годин, але використання молочної кислоти не оправдане, як дорога і малодоступна сировина, а процес ферментації при вищеперечислених параметрах в умовах промислового використання не дає позитивних результатів. У запропонованому способі сама культура утворює кислі метаболіти, рН в процесі поступово знижується. В даних умовах одержано більший вихід цільового продукту і меншу тривалість ферментації.

Метою даної корисної моделі є розробка способу одержання біополімеру-гомополісахариду з високим виходом цільового високомолекулярного продукту в промислових умовах, збільшенням відносної в'язкості, зниження тривалості процесу ферментації.

Поставлена задача вирішується таким чином, що біополімер-гомополісахарид одержують шляхом культивування мікроорганізму

продуцента, який передбачає приготування поживного середовища, стерилізацію, ферментацію, при цьому в якості мікроорганізму-продуцента використовують культуру *Aureobasidium pullulans* (штам *Aureobasidium pullulans* 82 Л, депонований в колекції Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером 1МВ F-100023), а культивування проводять в 2 стадії - вирощування посівного матеріалу для ферментеру в кількості 5-10% від об'єму поживного середовища в ферментері та ферментація при температурі (22-30)°С, постійному перемішуванні, аерації повітря 0,4-1,0м<sup>3</sup> на 1,0м<sup>3</sup> середовища за хвилину, на протязі 30-45 годин для посівного матеріалу та 50-70 годин для ферментації, при рН середовища початковому 4,0-7,0, на стерильному збалансованому поживному середовищі, яке містить,% мас.:

залізо сірчаноокисле (II) 7-водне	0,0010-0,015
калій фосфорнокислий	
двозаміщений	0,10-0,15
калій хлористий	0,04-0,08
магній сірчаноокислий 7-водний	0,04-0,08
натрій азотнокислий	0,20-0,40
гідролізований крохмаль з	
вмістом вільних цукрів не менше	
70% або сахароза	1,5-10,0
екстракт кукурудзяний	0,1-1,5
вода питна	решта.

При цьому в процесі ферментації одержують культуральну рідину з вмістом екзополісахариду 10-25г/л., відносною в'язкістю 2,5-3,5 умовних одиниць, середня тривалість вирощування посівного матеріалу в інокуляторі-30-45год., культивування в ферментері- 50-70год., що значно вигідніше раніше відомих способів - витрати енергоресурсів менші майже у 2 рази.

Спільними з найближчим аналогом ознаками є:

- для одержання екзополісахариду використовують аналогічні стадії -приготування поживного середовища, стерилізацію, ферментацію, поживне середовище має джерело вуглецю і необхідні для росту клітин мікроорганізму мінеральні компоненти.

Відмінними ознаками є:

- використання удосконаленого штаму *Aureobasidium pullulans* 82 Л, який має підвищену здатність синтезувати екзогомopolісахарид; більш швидким циклом росту;

- значним зниженням трудових і матеріальних витрат на виробництво препарату в зв'язку із скороченням циклу виробництва препарату (майже у 2 рази), зменшенням витрат кислоти на доведення рН поживного середовища;

- одержання більш стабільного при зберіганні препарату за рахунок удосконалення технології корективи рН при культивуванні;

- використання нешкідливої, недорогої та доступної ортофосфорної кислоти (або інших мінеральних кислот, наприклад соляної, сірчаної).

- широкий діапазон вибору кількості і взаємозаміни компонентів поживного середовища.

Штам *Aureobasidium pullulans* 82 Л, депонований в колекції Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером 1МВ F-100023 11.11.2002р., раніше депонований в колекції ВКПМ як штам *Aureobasidium pullulans*-8 (ВНІІГенетика, ВКПМ F-355), одержаний методом направленої селекції за ознакою більш високого синтезу екзополісахариду.

Штам зберігають на сусло-агарі під вазеліновим маслом при температурі (4-8)°С або на регламентованому поживному середовищі при температурі (4-8)°С протягом 1 року.

Запропонований штам має такі культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні ознаки:

Культурально-морфологічні ознаки: дріжджеподібні клітини, які пупкуються, овальної форми від 2,3×3,5мкм до 8×15мкм і у вигляді слабозвинутого септированого міцелію товщиною 3÷8мкм, з утворенням артроспор. Конідії гладкі, коричневого кольору, еліпсоїдальні 11-18×7-10мкм. Утворює меланіноподібний пігмент. Через 2 доби росту на агаризованих середовищах утворює гладенькі, блискучі світлі колонії з діаметром 2-3мм, з віком колонії збільшуються в розмірі, стають щільніші, темніші. На сусло-агарі через 7 діб колонії стають діаметром 17-23мм бежевого кольору, через 14-20 діб колір колоній варіює від темно-коричневого до вугільночорного. Поверхня колонії морщинна, блискуча. Центр припіднятий, складчатий, у вигляді кратера.

Фізіолого-біохімічні ознаки: Аероб, мезофіл. Використовує нітратний і амонійний азот. Штам засвоює глюкозу, сахарозу, фруктозу, крохмаль, мальтозу, менше - лактозу. Прототроф, не підлягає мутагенним впливам. Непатогенний. Ріст можливий при температурі від плюс 20°С до плюс 40°С, оптимальний ріст при температурі плюс (22-30)°С. Помітний ріст та біосинтез гомополісахариду можливий при рН 4,0-8,0, оптимальні умови рН 5,0-7,0

Отримання гомополісахариду з використанням штаму *Aureobasidium pullulans* 82 Л (*Aureobasidium pullulans*-8) відбувається наступним чином:

Культуру вирощують на середовищі, яке містить джерело вуглецю, азоту та мікроелементи (крохмаль кукурудзяний або сахароза, натрій азотнокислий, калій фосфорнокислий двозаміщений, магній сірчаноокислий, калій хлористий, залізо сірчаноокисле). В якості вихідного матеріалу використовують 4-7-й добу культуру, що виросла на повноцінному середовищі з вищевказаними компонентами при температурі (26±1)°С. Розмноження культури проводять у 750мл колбах з 150мл середовища (за складом, аналогічним ферментаційному середовищу) при (26±1)°С в умовах аерації на качалках (220-240)об/хв протягом 96-120 годин. Посівний матеріал асептично вносять в посівний апарат зі стерильним поживним середовищем для вирощування посівного матеріалу для ферментеру в кількості 5-10% від об'єму поживного середовища в ферментері, із посівного апарату посівний матеріал стерильно передають в ферментер зі стерильним поживним середовищем для одержання культуральної рідини з вмістом біополімеру-екзополісахариду.

Параметри культивування: температура (22-30)°С, постійне перемішування, аерація 0,4-1,0м<sup>3</sup> повітря на 1,0м<sup>3</sup> середовища за хвилину, на протязі 30-45 годин для посівного матеріалу та 50-70 годин для ферментації, при рН початковому 4,0-7,0 на стерильному збалансованому поживному середовищі, яке містить, г/л:

залізо сірчаноокисле	0,010- 0,015
калій фосфорнокислий двозаміщений	1,0-1,5
калій хлористий	0,4-0,8
магній сірчаноокислий	0,4-0,8
натрій азотнокислий	2,0-4,0
гідролізований крохмаль кукурудзяний з вмістом вільних цукрів 70-75% або сахароза	15,0-100,0
екстракт кукурудзяний	1,0-15,0
вода питна	решта.

При цьому в процесі культивування одержують культуральну рідину з вмістом екзополісахариду типу Аубазідан 10-25г/л по СР (сухий речовині), відносно в'язкістю 2,5-3,5у.од.

Гомополісахарид із культуральної рідини осаджують етанолом. Після висушування гомополісахарид має вигляд легкого пухнастого порошку жовтуватого відтінку, який легко розчиняється у воді, утворюючи в'язкі розчини. Препарат має розгалужену будову, основу його складає ланцюг β-1,3 - зв'язаних глюкопіранозних залишків, молекулярна маса -2÷10×10<sup>6</sup>Da (Дальтон). Гомополісахарид в малій концентрації в кислому середовищі підвищує в'язкість розчинів і утворює гелеподібні системи. Препарат може бути використаний при нафтовидобутку, в перспективі як допоміжна речовина для виробництва різних лікарських форм, в інших галузях промисловості та народного господарства.

Приклад 1

Культуру продуцента-штам *Aureobasidium pullulans* 82 Л, яка вирощена при 26°С протягом 7 діб на повноцінному середовищі, г/л:

калій фосфорнокислий двозаміщений	2,0
магній сірчаноокислий	0,1
натрій сірчаноокислий	1,0
глюкоза	20,0

дріжджовий екстракт	5,0
агар мікробіологічний	20,0
pH 6,5, вносять в колби об'ємом 750мл з 150мл середовища наступного складу г/л:	
залізо сірчаноокисле	0,010
калій фосфорнокислий двозаміщений	1,0
калій хлористий	0,5
магній сірчаноокислий	0,5
натрій азотноокислий	3,0
сахароза	50,0
вода питна	решта.

Культивування проводять на качалці з обертами (220об/хв), при температурі 26°C протягом 96 годин. Вирощеним і перевіреном на чистоту посівним матеріалом засівають стерильне поживне середовище об'ємом 400л (вміст аналогічний середовищу у колбах) в інокуляторі (посівному апараті), і вирощують 40 годин при температурі 26°C, аерації і постійній роботі мішалки. Одержаний посівний матеріал засівають в ферментер із стерильним поживним середовищем у кількості 5000л з наступним складом компонентів, г/л:

залізо сірчаноокисле	0,010
калій фосфорнокислий двозаміщений	1,0
калій хлористий	0,4
магній сірчаноокислий	0,4
натрій азотноокислий	3,0
сахароза	30,0
екстракт кукурудзяний	4,0
вода питна	решта.
pH 5,0 (коригування ортофосфорною кислотою).	

Культивування ведуть при температурі 26-28°C, аерації і постійній роботі мішалки впродовж 57 годин. Після закінчення процесу культивування в культуральній рідині визначають вміст гомополісахариду та відносну в'язкість - вони дорівнюють відповідно 12,1г/л та 2,9ум.од., що є підтвердженням якісного продукту.

#### Приклад 2

Готують посівний матеріал і одержують культуральну рідину, як описано вище (приклад 1), але вміст компонентів і pH в поживному середовищі в кількості 5000л в ферментері наступний, г/л:

залізо сірчаноокисле	0,015
калій фосфорнокислий двозаміщений	1,5
калій хлористий	0,8
магній сірчаноокислий	0,8
натрій азотноокислий	4,0
крохмаль кукурудзяний гідролізований	
до вмісту вільних цукрів 75%	100,0
екстракт кукурудзяний	15,0
вода питна	решта.
pH 7,0 (коригування ортофосфорною кислотою).	

Культивування ведуть при температурі 22°C, аерації і постійній роботі мішалки впродовж 68 годин. Після закінчення процесу культивування в культуральній рідині визначають вміст гомополісахариду та відносну в'язкість - вони дорівнюють відповідно 15,3г/л та 3,2ум.од., що є підтвердженням якісного продукту. Вихід ГПС визначають ваговим методом в г/л. В'язкість к.р. визначають віскозиметром капілярного типу (ВПЖ-2).

Результати по рівню накопичення ГПС та в'язкості в культуральній рідині наведено в таблиці:

Таблиці

Показники	Спосіб-прототип	Запропонований спосіб	
		Приклад 1	Приклад 2
Накопичення гомополісахариду на стадії біосинтезу, г/л (культивування в ферментері)	8,3	12,1	15,3
Тривалість процесу культивування, год.	82	57	68
Ефективна в'язкість культуральної рідини, сСт	2,5	2,9	3,2
Оптимальна температура, °C	28±1	26±1	22±1
pH вихідного середовища	4,1	5,0	7,0

Вказані приклади показують, що запропонований спосіб перевищує по виходу ГПС відомий спосіб-прототип (на 25-30%). При цьому ефективна в'язкість культуральної рідини на 20-30% вища, ніж у прототипу, а тривалість культивування менша на 14-20 годин, що значно вигідніше для промислового використання.