

Автор едр.

К 44 ОДЕСЬКА ДЕРЖАВНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

КИСЕЛЬОВ СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ



УДК 663.15 : [613.292 : 664.7.002.3]

**РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ ПРИРОДНИХ
ВУГЛЕВОДОВМІСНИХ ПІДСОЛОДЖУВАЧІВ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Одеса – 1999

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Одеській державній академії харчових технологій
Міністерства освіти України.

Науковий керівник: доктор технічних наук, професор
Капрельянц Леонід Вікторович
Одеська державна академія харчових технологій
Міністерства освіти України,
завідуючий кафедрою біохімії та мікробіології

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Розанов Анатолій Якович
Одеський державний університет ім. І.І. Мечникова
Міністерства освіти України,
професор кафедри біохімії

доктор технічних наук, професор
Безусов Анатолій Тимофійович
Одеська державна академія харчових технологій
Міністерства освіти України,
завідуючий кафедрою технології консервування

Провідна установа: Український науково-дослідний інститут спирту і
біотехнології продовольчих продуктів Міністерства
агропромислового комплексу України, відділ техно-
логії продуктів бродіння та мікробного синтезу,
м.Київ

Засідання спеціалізованої вченої ради з дисципліни харчових технологій (55039) Одеської державної академії харчових технологій (55039) м. Одеса, вул. Митрополита Іларіона, 112) відбулося 13⁰⁰ години на засіданні

З дисертації вченою радою Одеської державної академії харчових технологій Міністерства освіти України.

Автоматично сформовано 13.09.2013

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради

І.І. Віннікова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. За сучасними уявленнями, від життєдіяльності мікроорганізмів товстого кишечника залежить не тільки нормальне функціонування травної системи, але й стан організму в цілому, а порушення нормального складу кишкової мікрофлори, яке зв'язують з незбалансованими за певними компонентами раціонами харчування, тривалим прийманням антибіотиків та низкою інших причин, призводить до серйозних фізіологічних порушень та може стати причиною різних захворювань.

Одним із способів корекції складу кишкової мікрофлори в бік збільшення вмісту корисних для здоров'я людини родів мікроорганізмів (зокрема, бактерій р. *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*) є приймання з їжею особливої групи речовин, які не засвоюються організмом людини та досягають товстого кишечника, де їх можуть використовувати за живильні субстрати виключно корисні мікроорганізми. У теперішній час за кордоном на основі вуглеводів, які не засвоюються організмом людини, створюють нові функціональні продукти харчування, які здатні до корекції складу кишкової мікрофлори. За своїми властивостями вони є підсолоджуючими речовинами (найчастіше у формі сиропів), які містять суміш вуглеводів, один або декілька компонентів якої є селективним живильним субстратом для одного чи кількох родів корисних мікроорганізмів. Перспективними вуглеводними підсолоджувачами з високою стимулюючою здатністю відносно кишкових біфідобактерій є вуглеводи з групи ізомальтоолігосахаридів (ІМОС), які відрізняються високою стабільністю, приємним смаком, відсутністю карієсогенності та рядом інших цінних властивостей. В основі технологій виробництва підсолоджувачів з групи ІМОС, впроваджених нині у США та Японії, лежить біоконверсія різних видів крохмалевмісної сировини під дією специфічних ферментних препаратів. Незважаючи на наявність відповідної сировинної та виробничої бази, в Україні подібні вуглеводні продукти не виробляються, що пояснюється відсутністю як вітчизняних технологій переробки крохмалевмісної сировини в ІМОС, так і ферментних препаратів для використання в подібних технологіях.

У зв'язку з вищевикладеним, дуже актуальною є розробка як вітчизняного ферментного препарату для біоконверсії вуглеводних субстратів в ІМОС, так і технології переробки вітчизняної крохмалевмісної сировини у функціональний вуглеводний підсолоджувач, який містить вуглеводи з групи ІМОС.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає тематиці міжвузівської програми науково-дослідницької роботи № 31 «Будова, склад, властивості і перетворення компонентів рослинної сировини як основи створення поліфункціональних добавок, збагачувачів і модулів для одержання продуктів з новими властивостями, які забезпечують продовольчу безпеку населення України», яку затверджено наказом Міністерства освіти України № 271 від

15.08.96, зокрема темі досліджень проблемної лабораторії Одеської державної академії харчових технологій 2/97-П «Розробка наукових основ і технологій виробництва харчових речовин та функціональних продуктів харчування на основі біотехнологічних методів переробки рослинної сировини, біомаси мікроорганізмів та екзометаболітів» (№ держреєстрації 0197016054).

Мета і задачі досліджень. Метою даної роботи була розробка біотехнології одержання вуглеводного підсолоджувача, збагаченого ІМОС, з крохмалевмісної сировини. Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі задачі:

- розробити метод отримання ферментного препарату зі специфічною трансглікозилазною активністю, призначеного для біоконверсії вуглеводного субстрату в суміш вуглеводів, яка містить ІМОС, вивчити властивості нового препарату;
- обґрунтувати вибір крохмалевмісної сировини та розробити технологію оцукрення крохмалю сировини з метою одержання вуглеводних сиропів, які призначені для використання за субстрат трансглікозилювання;
- з використанням розробленого ферментного препарату отримати вуглеводні сиропи, збагачені ІМОС, з субстратів, які було отримано; дослідити біохімічний склад, фізико-хімічні властивості одержаних продуктів;
- дослідити *in vivo* біологічну активність вуглеводних сиропів, збагачених ІМОС;
- розробити технологію виробництва мультівуглеводних сиропів, збагачених ІМОС, провести її промислову апробацію; розробити проект нормативно-технічної документації на виробництво досліджуваних продуктів та розрахувати їх собівартість.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше отримано вітчизняний ферментний препарат з трансглікозилазною активністю на основі інтактних клітин мікроорганізму *Aureobasidium pullulans*, встановлено склад суміші продуктів трансглікозилювання чистого мальтозного субстрату та рідких мальтозних сиропів з зернової сировини під дією нового препарату.

Обґрунтовано можливість використання кукурузного борошна 90%-ного виходу, пшеничного борошна II гатунку та борошенця пшеничного для одержання мальтозних сиропів – субстратів трансглікозилювання. Охарактеризовано склад вуглеводних сиропів з зернової сировини, в експерименті *in vivo* встановлено наявність у мультівуглеводного сиропу, збагаченого ІМОС, промоторної активності відносно кишкових біфідобактерій та лактобацил.

Розроблено оригінальну технологію одержання мультівуглеводних сиропів, збагачених ІМОС, з зернової сировини, охарактеризовано їх біохімічний склад та властивості.

Практичне значення одержаних результатів. На підставі експериментальних та теоретичних досліджень, які було проведено, розроблено технологію вироб-

ництва мультівуглеводних сиропів, збагачених ізомальтоолігосахаридами, з зернової крохмалевмісної сировини. Технологію апробовано на Одеському виробничому хіміко-фармацевтичному об'єднанні «Біостимулятор». Отримані дані використано для розробки проектів нормативно-технічної документації на виробництво мультівуглеводних сиропів «Мальтоізин-1» і «Мальтоізин-2».

Результати медико-біологічних досліджень, проведених Центральною санітарно-епідеміологічною станцією водного транспорту України спільно з кафедрою біохімії та мікробіології Одеської державної академії харчових технологій, дозволяють рекомендувати мультівуглеводні сиропи, збагачені ІМОС, для корекції складу кишкової мікрофлори з метою підвищення вмісту корисних для здоров'я родів мікроорганізмів.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок полягає в забезпеченні методичного оформлення роботи, участі у виконанні аналітичної та експериментальної роботи, аналізі та узагальненні отриманих даних, формуванні висновків та рекомендацій, підготовці матеріалів досліджень до публікації, розробці нормативно-технічної документації, промисловій апробації розробленої технології. Особистий внесок здобувача підтверджено поданими документами та науковими публікаціями.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідалися на другій національній науково-практичній конференції «Хлібопродукти-97» (Одеса, 1997 р.); міжнародній науковій конференції «Экология человека и проблемы воспитания молодых учёных» (Одеса, 1997 р.); наукових конференціях Одеської державної академії харчових технологій (Одеса, 1997 р., 1998 р., 1999 р.); засіданні Одеського біохімічного товариства (Одеса, 1998 р.); електронній конференції на сайті Американської Асоціації Хімії Зерна (American Association of Cereal Chemists, <http://www.scisoc.org/aacc>) (1999 р.).

Публікації. Результати дисертації опубліковано в 6 друкованих роботах: одна стаття в науковому журналі, п'ять статей - в збірниках наукових праць.

Структура та обсяг роботи. Дисертаційна робота складається із вступу, 5 розділів, висновку, списку літератури та додатків. Зміст роботи викладено на 194 сторінках, включаючи 34 ілюстрації (16 сторінок), 28 таблиць (22 сторінки), 6 додатків (32 сторінки). Список використаних джерел містить 159 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність теми досліджень, визначено наукову новизну та практичну цінність, сформульовано загальну мету та спрямованість роботи.

У першому розділі на базі аналізу літературних джерел розглянуто питання, пов'язані з процесами мікробної ферментації у товстому кишечнику, визначено зв'язок родового складу кишкової мікрофлори людини з нормальним

функціонуванням травної системи та загальним станом організму, наведено дані про роль біфідобактерій в процесах у кишечнику та їх позитивний вплив на здоров'я людини. Обґрунтовано необхідність корекції родового складу кишкової мікрофлори з метою підвищення вмісту корисних для здоров'я людини родів мікроорганізмів та переваги приймання з їжею речовин, здатних до селективного стимулювання корисної мікрофлори (пребіотиків та промоторів) над прийманням життєздатних клітинних мікроорганізмів (пробіотиків), охарактеризовано основні групи пребіотиків, їх властивості та шляхи одержання. Детально розглянуто промотори з групи ізомальтоолігосахаридів (ІМОС), наведено дані про їх фізико-хімічні властивості, стимулюючу активність відносно корисних родів кишкових бактерій та біотехнологічні методи їх отримання у лабораторних та виробничих умовах. Грунтуючись на даних аналізу літератури, зроблено висновок про високу пребіотичну активність ІМОС та високу ефективність їх одержання у формі сиропів, які містять суміш вуглеводів, шляхом ферментативного трансглікозилювання продуктів гідролізу крохмалю з використанням трансглікозилаз мікробного походження, а також про доцільність досліджень, спрямованих на розробку вітчизняного ферментного препарату з трансглікозилазною активністю та технології одержання вуглеводних сиропів, збагачених ІМОС, з крохмалевмісної сировини зернового походження.

У другому розділі «Матеріали та методи досліджень» викладено відомості про об'єкти, обладнання та методи досліджень, наведено схему, яка показує взаємозв'язок головних етапів роботи (рис. 1), а також постановку експериментів, методи та характеристики об'єктів досліджень на кожному з етапів.

Головними об'єктами дослідження в даній дисертаційній роботі були: борошно кукурудзяне 90 % виходу, борошно пшеничне хлібопекарське II гатунку, борошнце кормове пшеничне, солод ячмінний сухий, культура дейтеромицетових дріжджів *Aureobasidium pullulans* (F-7331 Ж) з колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України.

Основну частину досліджень проведено у лабораторіях кафедри біохімії та мікробіології ОДАХТ; окремі дослідження було виконано на Центральній санітарно-епідеміологічній станції водного транспорту України.

Вивчення фізико-хімічних та біохімічних властивостей одержаних продуктів здійснювали за допомогою хімічних та хроматографічних методів дослідження; фізіологічну активність вивчали в експерименті *in vitro* на тест-культурах кишкових мікроорганізмів та в експерименті *in vivo* на щурах.

Промислові випробування та випуск дослідних партій розроблених продуктів проводилися на Одеському виробничому хіміко-фармацевтичному об'єднанні «Біостимулятор».

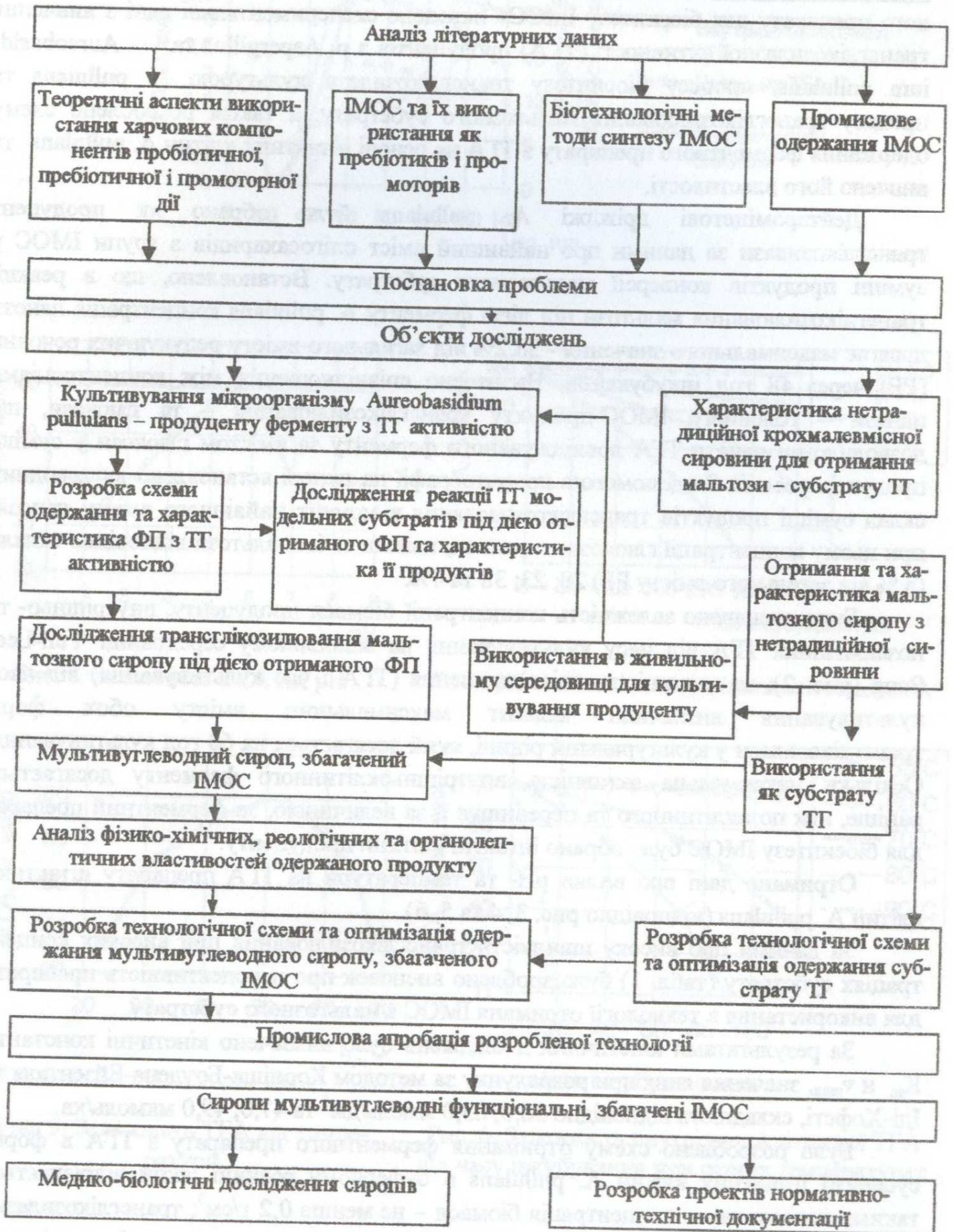


Рис. 1. Схема проведення досліджень: ІМОС- ізомальтоолігосахариди; ТГ- трансглікозилювання; ФП – ферментний препарат

У третьому розділі «Дослідження мікробних трансглікозилаз та розробка ферментного препарату для біосинтезу ІМОС» наведено експериментальні дані з вивчення трансглікозилазної активності (ТГА) продуцентів з р. *Aspergillus* та *Aureobasidium pullulans*, процесу біосинтезу трансглікозилази культурою *A. pullulans* та процесу трансглікозилювання мальтозного субстрату, а також розроблено схему одержання ферментного препарату з ТГА на основі інтактних клітин *A. pullulans* та вивчено його властивості.

Дейтероміцетові дріжджі *A. pullulans* було обрано як продуцент трансглікозилази за даними про найвищий вміст олігосахаридів з групи ІМОС у суміші продуктів конверсії мальтозного субстрату. Встановлено, що в реакції трансглікозилювання мальтози під дією ферменту *A. pullulans* концентрація панози досягає максимального значення - 38,2% від загального вмісту редуруючих речовин (РР) через 48 год інкубування. Визначено співвідношення між концентраціями панози – головного ІМОС-продукту трансглікозилювання – та глюкози, що дозволило визначати ТГА досліджуваного ферменту за вмістом глюкози у суміші продуктів реакції. За допомогою хроматографії на папері встановлено вуглеводний склад суміші продуктів трансглікозилювання в момент найвищого вмісту панози, при цьому концентрації глюкози, мальтози, панози та ізомальтози відповідно склали (в % від загального вмісту РР) 28; 23; 38 та 4%.

Було визначено залежність концентрації біомаси продуценту, внутрішньо- та позаклітинної ТГА від часу культивування на живильному середовищі Yun-Lee-Song (рис. 2); за залежністю співвідношення (ТГА : час культивування) від часу культивування визначили момент максимального вмісту обох форм трансглікозилази у культуральній рідині, який досягається на 60 год культивування. Оскільки максимальна активність внутрішньоклітинного ферменту досягається раніше, ніж позаклітинного та перевищує її за величиною, за ферментний препарат для біосинтезу ІМОС було обрано інтактні клітини продуценту.

Отримано дані про вплив рН- та температури на ТГА препарату інтактних клітин *A. pullulans* (відповідно рис. 3, 4 та 5, 6).

За даними про високу швидкість трансглікозилювання при високих концентраціях субстрату (табл. 1) було зроблено висновок про перспективність препарату для використання в технології отримання ІМОС з мальтозного субстрату.

За результатами кінетичних досліджень було визначено кінетичні константи K_m і v_{max} , значення яких при розрахунку за методом Корніша-Боудена-Ейзенталя та Іді-Хофсті, складають відповідно 56,0; 63,0 ммоль/дм³ та 47,0; 49,0 мкмоль/хв.

Було розроблено схему отримання ферментного препарату з ТГА в формі суспензії інтактних клітин *A. pullulans* в буферному розчині, який відрізняється такими показниками: концентрація біомаси – не менше 0,2 г/см³; трансглікозилазна активність – 104 од/г; втрата активності під час зберігання протягом 6 тижнів при -5°C - не більше 14,5% від вихідної.

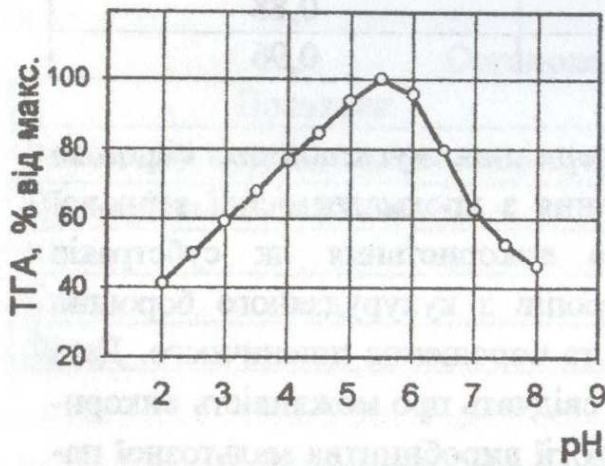
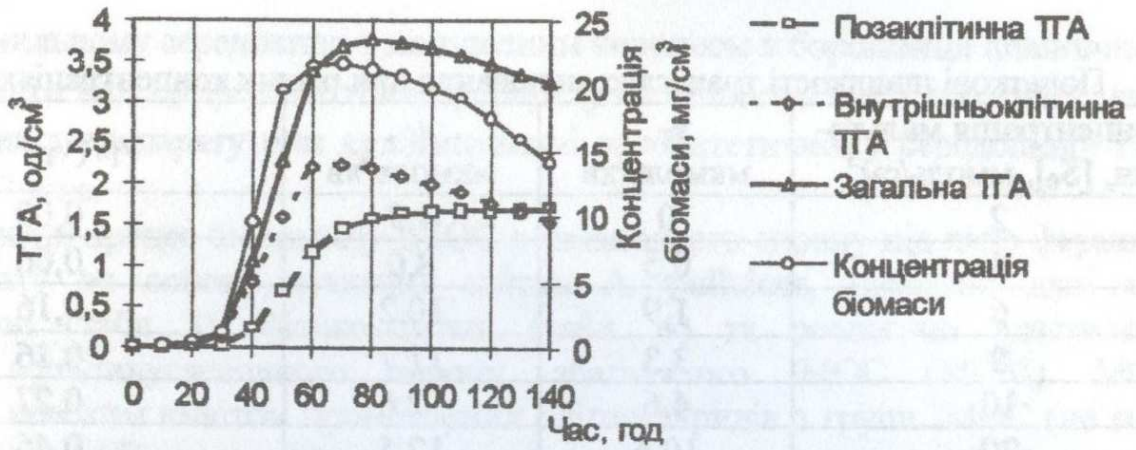


Рис. 3. Залежність ТГА від рН

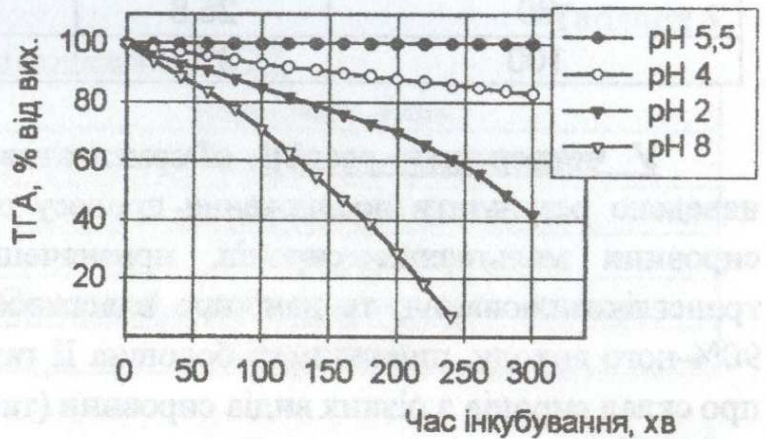


Рис.4. рН-стабільність внутрішньоклітинної ТГА

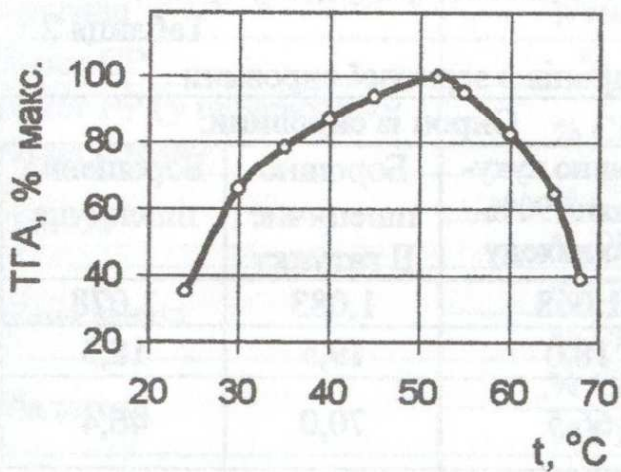


Рис. 5. Залежність ТГА від температури

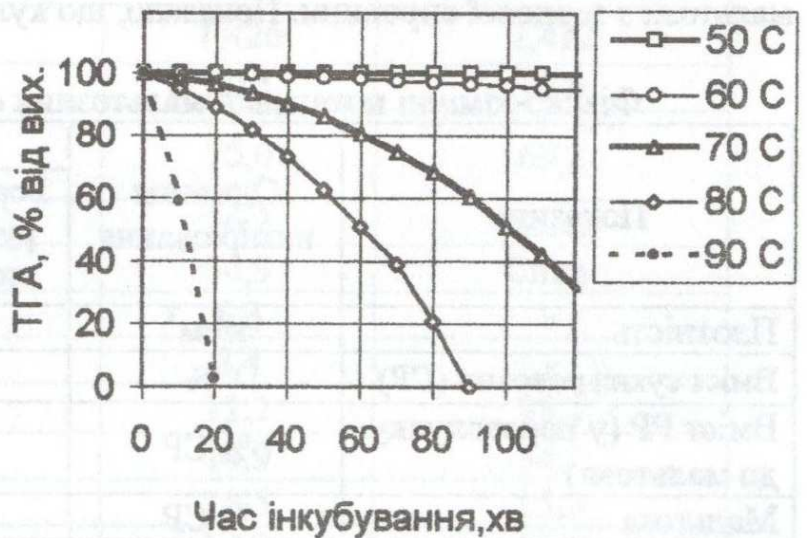


Рис. 6. Залежність внутрішньоклітинної ТГА від часу інкубування при різних температурах

Початкові швидкості трансглікозилування при різних концентраціях субстрату

Концентрація мальтози, $[S_0]$, ммоль/см ³	v_T , мкмоль/хв	v_G , мкмоль/хв	$v_T / (v_T + v_G)$
2	0	4,9	0,00
4	0,5	8,0	0,06
6	1,9	10,2	0,16
8	3,3	11,7	0,16
10	4,6	12,6	0,27
20	10,5	12,5	0,46
40	19,0	9,5	0,67
60	24,2	6,6	0,79
80	26,8	3,5	0,88
100	27,3	1,2	0,96

У четвертому розділі «Ферментативне одержання вуглеводних сиропів» наведено результати дослідження процесу отримання з крохмалевмісної зернової сировини мальтозних сиропів, призначених до використання як субстратів трансглікозилування, та дані про властивості сиропів з кукурудзяного борошна 90%-ного виходу, пшеничного борошна II гатунку та борошенця пшеничного. Дані про склад сиропів з різних видів сировини (табл. 2) свідчать про можливість використання пшеничного борошна II гатунку як в технології виробництва мальтозної папки за традиційною схемою, так і для біосинтезу ІМОС з використанням розробленого ферментного препарату. Вивчено вплив технологічних параметрів на вихід мальтози з зернової сировини. Показано, що культивування продуценту трансгліко-

Таблиця 2.

Фізико-хімічні показники мальтозних сиропів з зернової сировини

Показник	Одиниця вимірювання	Сироп із сировини:		
		Борошно кукурудзяне 90%-ного виходу	Борошно пшеничне II гатунку	Борошенце пшеничне
Плотність	г/см ³	1,068	1,083	1,078
Вміст сухих речовин (СР)	%	18,0	19,5	18,5
Вміст РР (у перерахунку до мальтози)	% СР	66,5	70,0	46,4
Мальтоза	% СР	34,5	39,0	25,2
Глюкоза	% СВ	12,2	16,0	5,8
Білок	% СВ	13,2	14,5	16,5
Зола	% СВ	1,2	1,0	1,5
Кислотність	см ³ 1 н. NaOH на 100 г СР	9,0	8,8	9,2
pH	Одиниці pH	6,0	5,8	5,5

зилази на живильному середовищі з мальтозним сиропоом з борошенця пшеничного дозволяє досягти виходу ферментного препарату на одиницю маси субстрату, який перевищує вихід препарату при культивуванні на синтетичному середовищі Yun-Lee-Song у 1,7 рази.

Досліджено процес біосинтезу ІМОС з мальтозного сиропу під дією ферментного препарату на основі інтактних клітин *A. pullulans*, наведено дані про органолептичні (табл 3), фізико-хімічні (табл. 4) та реологічні властивості одержаного мультівуглеводного сиропу, збагаченого ІМОС (МСЗІ). МСЗІ відрізняється високим вмістом промоторних олігосахаридів з групи ІМОС (не менше 32,5% від маси СР) та за своїми показниками є близьким до мальтозної патоки з тієї ж сировини, що робить можливим його використання замість цього виду патоки в технологіях різних продуктів харчування.

Таблиця 3

Органолептичні показники МСЗІ

Показник	Характеристика
Зовнішній вигляд, консистенція	В'язка рідка маса
Прозорість	Має опалесценцію
Колір	Коричневий
Смак	Солодкий, з легким присмаком солоду
Запах	Солодовий

Таблиця 4

Фізико-хімічні показники МСЗІ та мальтозної патоки

Показник	Одиниця вимірювання	Значення	
		МСЗІ	Мальтозна патока
Густина	г/см ³	1,426	1,412
Вміст СР	%	80,4	79,6
Вміст РР (у перерахунку до мальтози)	% СР	75,0	69,8
Паноза	% СР	26,2	Сліди
	% РР	34,9	Сліди
Ізомальтоза	% СР	6,3	-
	% РР	8,4	-
Мальтоза	% СР	11,2	38,2
	% РР	14,9	54,7
Глюкоза	% СР	18,5	15,2
	% РР	24,7	21,7
Білок	% СР	14,2	13,8
Зола	% СР	1,3	1,2
Кислотність	см ³ 1 н. NaOH на 100 г СР	9,0	9,5
pH	Одиниці pH	5,6	5,5

Встановлено, що сироп містить вітаміни B₁, B₂, B₄, B₆, PP, H, E, а також ряд мінеральних елементів (Na, K, Ca, Mg, Fe, P). Досліджено вплив сорбційного очищення на активованому вугіллі на склад МСЗІ, встановлено, що сорбційне очищення призводить як до суттєвого зниження вмісту білка та золи в сиропі, так і до практично повного видалення з нього вітамінів. Вивчено вплив технологічних параметрів на процес біосинтезу ІМОС з мальтозного сиропу.

В експерименті *in vitro* підтверджено пребіотичну активність панози відносно бактерій р. *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*.

У п'ятому розділі «Технологія одержання мультівуглеводних сиропів, збагачених ІМОС» наведено технологічну схему одержання мультівуглеводних сиропів, збагачених ІМОС, описання технологічних процесів виробництва МСЗІ, схему технімічного контролю, дані про склад та органолептичні властивості одержаних продуктів, відомості про виробничу апробацію розробленої технології та медико-біологічні дослідження МСЗІ.

З урахуванням експериментальних даних розроблено технологічну схему процесу отримання МСЗІ (рис. 7). Технологія одержання розроблених продуктів складається з двох етапів: отримання низькоконцентрованого мальтозного сиропу та біосинтезу ІМОС в реакції трансглікозилювання вуглеводів мальтозного сиропу під дією ферментного препарату на основі інтактних клітин *A. pullulans*. На першому етапі крохмаль зернової сировини оцукрюють ферментами ячмінного солоду. Низькоконцентрований мальтозний сироп може бути використаний як субстрат трансглікозилювання або сконцентрований з метою отримання мальтозної патоки. Другий етап процесу полягає в інкубуванні стерилізованого мальтозного сиропу з розробленим ферментним препаратом, фільтруванні та концентруванні отриманого МСЗІ.

З метою оптимізації окремих технологічних процесів виробництва МСЗІ було використано методи математичного планування експерименту, одержано рівняння регресії, які адекватно описують процес отримання мальтозного сиропу з борошенця пшеничного та процес біосинтезу ІМОС. Значення оптимальних параметрів для процесу одержання мальтозного сиропу складають: кількість подрібненого солоду на стадії розрідження крохмалю сировини (% від маси борошенця пшеничного) - 4,8 %; температура процесу оцукрення - 60,52°C; час процесу оцукрення - 81,17 хв; кількість подрібненого солоду на стадії оцукрення (% від маси борошенця пшеничного) - 20,35 %. Оптимальні параметри процесу біосинтезу ІМОС такі: концентрація ферментного препарату - 10,55 од на 1 г маси PP; температура процесу біосинтезу ІМОС - 54,42 °C; час процесу біосинтезу - 38, 00 год.

Проведено виробничі випробування на ОВХФО «Біостимулятор»; показано можливість використання серійного обладнання для виробництва розроблених продуктів. Показники продуктів з дослідних партій відповідають проекту нормативно-технічної документації.

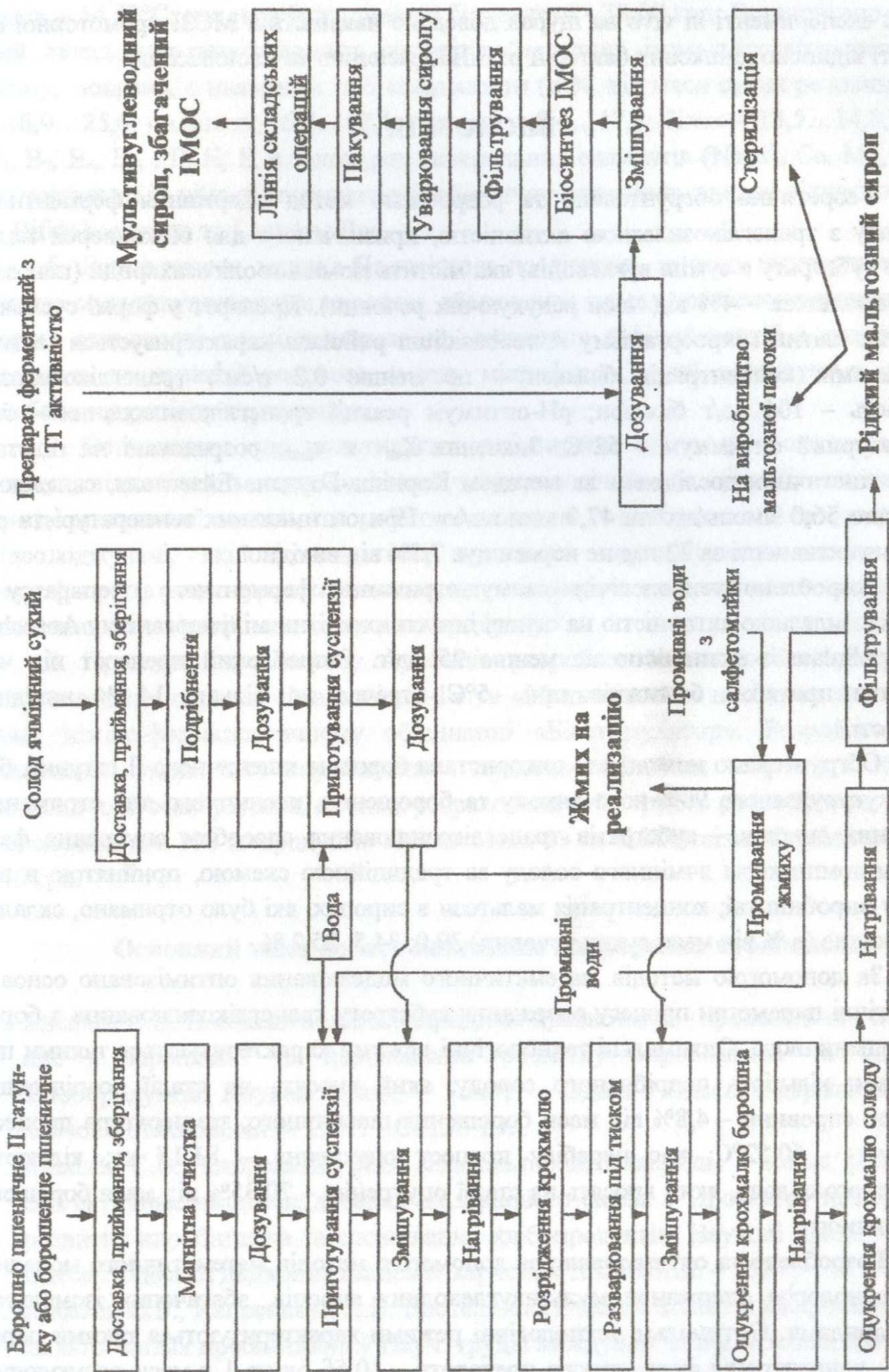


Рис. 5.3. Принципова технологічна схема одержання МСЗІ

В експерименті *in vivo* на щурах доведено наявність в МСЗІ промоторної активності відносно кишкових бактерій р. *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*

ВИСНОВКИ:

1. Теоретично обґрунтовано та розроблено метод одержання ферментного препарату з трансглікозилазною активністю, призначеного для біоконверсії мальтозного субстрату в суміш вуглеводів, яка містить ізомальтоолігосахариди (паноза – 38%, ізомальтоза – 4% від маси редукуючих речовин). Препарат у формі суспензії інтактних клітин мікроорганізму *Aureobasidium pullulans* характеризується такими показниками: концентрація біомаси – не менше 0,2 г/см³; трансглікозилазна активність – 104 од/г біомаси; рН-оптимум реакції трансглікозилювання – 5,5; температурний оптимум – 52°C. Значення K_m і v_{max} розраховані на підставі даних кінетичних досліджень за методом Корніша-Боудена-Ейзенталя, складають відповідно 56,0 ммоль/дм³ та 47,0 мкмоль/хв. При оптимальних температурі та рН зниження активності за 72 год не перевищує 7,5% від вихідної.

2. Розроблено технологічну схему отримання ферментного препарату з трансглікозилазною активністю на основі інтактних клітин мікроорганізму *Aureobasidium pullulans* з активністю не менше 95 од/г. Розроблений препарат під час зберігання протягом 6 тижнів при –5°C втрачає не більше 14,5% вихідної активності.

3. Обґрунтовано можливість використання борошна пшеничного II гатунку, борошна кукурудзяного 90%-ного виходу та борошенця пшеничного для отримання мальтозних сиропів – субстратів трансглікозилювання способом оцукрення ферментним комплексом ячмінного солоду за традиційною схемою, прийнятою в паточному виробництві; концентрація мальтози в сиропах, які було отримано, складала відповідно (в % від маси сухих речовин) 39,0; 34,5; 25,2 %.

4. За допомогою методів математичного моделювання оптимізовано основні технологічні параметри процесу одержання субстрату трансглікозилювання з борошенця пшеничного. Оптимальні технологічні режими характеризуються такими параметрами: кількість подрібненого солоду, який вносять на стадії розрідження крохмалю сировини – 4,8% від маси борошенця пшеничного; температура процесу оцукрення – 60,52°C; час перебігу процесу оцукрення – 81,17 хв; кількість подрібненого солоду, який вносять на стадії оцукрення – 20,35% від маси борошенця пшеничного.

5. Розроблено та оптимізовано за допомогою методів математичного моделювання технологію одержання мультівуглеводних сиропів, збагачених ізомальтоолігосахаридами. Оптимальні технологічні режими характеризуються такими параметрами: концентрація ферментного препарату – 10,55 од на 1 г маси редукуючих речовин мальтозного сиропу; температура процесу біосинтезу ізомальтоолігосаха-

ридів – 54,42°C; час перебігу процесу біосинтезу - 38,00 год. Встановлено біохімічний склад мультівуглеводних сиропів, збагачених ізомальтоолігосахаридами, в якому, зокрема, є наявними такі компоненти (в % від маси сухих речовин): паноза – 16,9...25,6; мальтоза – 6,8...12,4; глюкоза – 8,4...17,8; білок – 13,5...14,8, вітаміни В₁, В₂, В₄, В₆, РР, Н, Е, а також ряд мінеральних елементів (Na, K, Ca, Mg, Fe, P). В експерименті *in vitro* підтверджено пребіотичну активність панози відносно бактерій р. *Bifidobacterium* та *Lactobacillus*.

6. Результатами медико-біологічних досліджень *in vivo* підтверджено виявлення мультівуглеводним сиропом, збагаченим ізомальтоолігосахаридами, промоторної активності по відношенню до кишкових біфідобактерій і лактобацил та здатність до корекції родового складу мікрофлори, який порушується внаслідок дисбалансу раціону харчування.

7. Встановлено, що мультівуглеводні сиропи, збагачені ізомальтоолігосахаридами, відповідають технологічним, токсикологічним та мікробіологічним вимогам до мальтозної патоки, що робить можливим їх використання за функціональні підсолоджувачі, які відзначаються здатністю нормалізувати склад кишкової мікрофлори, в рецептурах харчових продуктів замість мальтозної патоки, а також їх вживання як самостійного харчового продукту.

8. Проведено промислову апробацію розробленої технології одержання мультівуглеводних сиропів «Мальтоізин-1» та «Мальтоізин-2» на Одеському виробничому хіміко-фармацевтичному об'єднанні «Біостимулятор». Розроблено проект технічних умов на виробництво мультівуглеводних сиропів, збагачених ізомальтоолігосахаридами, а також розрахована собівартість розроблених продуктів, яка складає для 100 кг продуктів «Мальтоізин-1» та «Мальтоізин-2» відповідно 860 і 840 грн.

Основний зміст роботи викладено в наступних публікаціях:

1. Киселёв С.В. Изомальтоолигосахаридные пребиотики – производство и применение // Проблемы та перспективи розвитку виробництва та споживання хлібопродуктів: Наукові праці. – Том 1. – Одеса : Одеська державна академія харчових технологій. – 1997. – С. 136-139.
2. Киселёв С.В., Капрельянц Л.В. Изомальтоолигосахариды - новые физиологически активные пищевые добавки из зернового сырья // Проблемы та перспективи розвитку виробництва та споживання хлібопродуктів: Наукові праці. – Том 1. – Одеса : Одеська державна академія харчових технологій. – 1997. – С. 140-143.
3. Киселёв С.В., Капрельянц Л.В. Биотехнологические аспекты микробного синтеза мальтогенных пребиотиков // Науч. труды междунар. конф. «Экология». – Ч. 2. – Одесса: Одесская государственная академия пищевых технологий. - 1997. – С. 221-224

4. Кисельов С.В., Капрельянц Л.В. Біотехнологічні аспекти отримання харчових домішок з групи ізомальтоолігосахаридів // Наукові праці. – Вип. 18. – Одеса : Одеська державна академія харчових технологій. – 1998. – С. 94-96.
5. Кисельов С.В., Капрельянц Л.В. Продуцирування ферменту з трансглікозилазною активністю культурою *Aureobasidium pullulans* // Наукові праці. – Вип. 19. – Одеса : Одеська державна академія харчових технологій. – 1999. – С. 123-126.
6. Капрельянц Л.В., Киселёв С.В. Функциональная пища из зерновых // Пищевая промышленность. – 1999. - №.7 – С. 40-42.

АНОТАЦІЯ

Кисельов С.В. Розробка біотехнології одержання природних вуглеводмісних підсолоджувачів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 – Біотехнологія. – Одеська державна академія харчових технологій, Одеса, 1999.

Дисертацію присвячено питанням розробки технології одержання мультивуглеводних підсолоджувачів у вигляді сиропів, які збагачені ізомальтоолігосахаридами (ІМОС) та здатні до підвищення вмісту корисних для здоров'я мікроорганізмів у мікрофлорі товстого кишечника людини.

Встановлено, що ефективним продуцентом ферменту з трансглікозилазною активністю, здатного до біосинтезу ІМОС, є мікроорганізм *Aureobasidium pullulans*; розроблено схему отримання ферментного препарату з трансглікозилазною активністю на основі інтактних клітин продуценту, вивчено його властивості. Досліджено процес отримання субстрату трансглікозилювання з зернової крохмалевмісної сировини шляхом оцукрення ферментами ячмінного солоду, встановлено склад мальтозних сиропів з різних видів сировини. Вивчено процес ферментативної конверсії мальтозних сиропів у мультивуглеводні сиропи, збагачені ІМОС, розроблено технологію одержання нових сиропів. Показано, що нові продукти мають промоторну активність відносно кишкових біфідобактерій та лактобацил.

Ключові слова: промотори, ізомальтоолігосахариди, *Aureobasidium pullulans*, інтактні клітини, ферментний препарат, трансглікозилювання, крохмалевмісна сировина, мультивуглеводний сироп, технологія одержання.

ANNOTATION

Kiselev S.V. Working-out the technology of production of natural carbohydrate-containing sweeteners. – Manuscript.

Thesis for a candidate's of technical sciences degree by speciality 03.00.20 –biotechnology.- The Odessa State Academy of Food Technologies, Odessa, 1999.

The dissertation is devoted to the questions of working-out the technology of production of multi-carbohydrate sweeteners in the form of syrups, which are enriched with

isomalto-oligosaccharides (IMOS) and able to increase the content of health-giving microorganisms in human gut microflora.

It was found, that microorganism *Aureobasidium pullulans* is the effective productant of enzyme with transglycosylase activity, able to IMOS biosynthesis. The scheme of production of enzyme preparation with transglycosylase activity, based on intact cells of productant was worked out. The properties of new preparation were studied. The process of obtaining of transglycosylation substrate from cereal-originated raw materials by means of saccharification with barley malt enzymes was studied, the composition of maltose syrups from different raw materials was established. The process of enzymatic conversion of maltose syrups into IMOS-enriched multi-carbohydrate syrups was studied, the technology of production of novel syrups was worked-out. It was shown, that new products possess promotor activity relative to intestinal bifidobacteria and lactobacilli.

Keywords: promoters, isomalto-oligosaccharides, *Aureobasidium pullulans*, intact cells, enzyme preparation, transglycosylation, starch-containing raw materials, multi-carbohydrate syrup, technology of production.

АННОТАЦИЯ

Киселёв С.В. Разработка биотехнологии получения природных углеводсодержащих подсластителей. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – Биотехнология. – Одесская государственная академия пищевых технологий, Одесса, 1999.

Диссертация посвящена вопросам разработки технологии получения мультиуглеводных подсластителей в форме сиропов, обогащённых изомальтоолигосахаридами, способных к повышению содержания полезных для здоровья микроорганизмов *Bifidoobacterium* и *Lactobacillus* в микрофлоре толстого кишечника человека.

Основными задачами работы явились разработка метода получения ферментного препарата, обладающего специфической трансгликозилазной активностью, предназначенного для биоконверсии углеводного субстрата в смесь углеводов, содержащую ИМОС и исследование его свойств; разработка технологии получения субстрата трансгликозилирования, обогащённого мальтозой и олигосахаридами с низкими степенями полимеризации, из зернового крахмалсодержащего сырья; разработка технологии получения мультиуглеводных сиропов, обогащённых ИМОС (МСОИ) с использованием полученного ферментного препарата, а также исследование биологической активности новых продуктов.

Проведен скрининг трансгликозилазной активности ферментов, синтезируемых микромицетами *Aspergillus* и дейтеромицетовыми дрожжами *Aureobasidium pullulans*; в качестве продуцента наиболее активной трансгликозилазы избран микроорганизм *A. pullulans*. Исследованы процессы биосинтеза внеклеточной и внутриклеточной трансгликозилазы при культивировании продуцента на

синтетической питательной среде, а также реакция трансгликозилирования мальтозного субстрата под действием ферментного препарата на основе интактных клеток продуцента, установлен углеводный состав смеси продуктов трансгликозилирования. Определены кинетические константы трансгликозилирования, значения которых при расчёте по методу Корниша-Боудена-Эйзенталя составляют $K_m = 56,0$ ммоль/дм³; $v_{max} = 47,0$ мкмоль/мин; изучено эффекторное действие катионов Zn^{2+} и Fe^{3+} . Разработан метод получения ферментного препарата с трансгликозилазной активностью, характеризующегося следующими показателями: концентрация биомассы – не менее 0,2 г/см³; трансгликозилазная активность – 104 ед/г биомассы; оптимум pH реакции трансгликозилирования – 5,5; температурный оптимум – 52°C; исследована зависимость целевой активности от условий хранения.

Исследован и оптимизирован процесс получения мальтозного сиропа, предназначенного для использования в качестве субстрата трансгликозилирования из муки кукурузной 90%-ного выхода, муки пшеничной II сорта и мучки пшеничной путём осахаривания ферментами ячменного солода, содержание мальтозы в сиропах составило (в % от массы сухих веществ) 34,5; 39,0; 25,2 %, соответственно. Показано, что культивирование продуцента трансгликозилазы на питательной среде с мальтозным сиропом из мучки пшеничной позволяет достичь высокого выхода ферментного препарата на единицу массы субстрата, превышающего выход препарата при культивировании на синтетической среде Yun-Lee-Song в 1,7 раза.

Разработана и оптимизирована технология биоконверсии мальтозных сиропов в МСОИ. Установлен состав МСОИ, в котором, в частности, присутствуют следующие компоненты: (в % от массы СВ): паноза – 16,9...25,6; мальтоза – 6,8...12,4; глюкоза – 8,4...17,8; белок – 13,5...14,8, витамины В₁, В₂, В₄, В₆, РР, Н, Е, а также ряд минеральных элементов (Na, K, Ca, Mg, Fe, P). Исследовано влияние сорбционной очистки на состав МСОИ. Показано, что сорбционная очистка МСОИ на активированном угле приводит к существенному снижению содержания в нём белка и золы наряду с практически полным удалением витаминов.

В эксперименте на крысах подтверждено наличие у МСОИ промоторной активности по отношению к полезным кишечным микроорганизмам, при этом сироп обладает способностью корректировать нарушенное вследствие несбалансированных рационов питания содержание бактерий р. *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в кишечной микрофлоре.

Ключевые слова: промоторы, изомальтоолигосахариды, *Aureobasidium pullulans*, интактные клетки, ферментный препарат, трансгликозилирование, крахмалсодержащее сырьё, мультиуглеводный сироп, технология получения.