

WŁAŚCIWOŚCI REOLOGICZNE MEDIUM HODOWLANEGO W TRAKCIE PRODUKCJI PULLULANU PRZEZ *AUREOBASIDIUM PULLULANS*

D. Nowak, M. Rzeszotarski, P. P. Lewicki

Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji SGGW
ul. Nowoursynowska 159 c, 02-776 Warszawa
e-mail: NOWAK@sggw.waw.pl

Streszczenie. W pracy badano właściwości reologiczne medium hodowlanego w trakcie syntezy polisacharydu przez *Aureobasidium pullulans*, prowadzonej w bioreaktorze. Hodowlę prowadzono na sztucznym podłożu zawierającym sacharozę, przez 96 godzin. Zastosowano zmienne obroty mieszadła w granicach od 200 do 1000 rpm, co pozwalało na zróżnicowanie stopnia natlenienia podłoża. Analizowano charakterystykę reologiczną medium w trakcie prowadzenia hodowli jak i przy różnych warunkach procesu. Stwierdzono, że medium hodowlane ma właściwości cieczy niutonowskiej tylko w pierwszej dobie po zaszczepieniu, później zachowuje się jak ciecz nieniuonowska pseudoplastyczna. Uzyskane krzywe płynięcia opisano równaniem Ostwald-de-Waele'a i na ich podstawie stwierdzono stały nieniuonowski charakter oraz zmienność konsystencji medium. Stwierdzono, że największy wzrost lepkości pozornej następuje w drugiej dobie hodowli, a intensywność mieszania wpływa na wzrost lepkości pozornej. Właściwości reologiczne medium hodowlanego porównano z właściwościami reologicznymi roztworów czystego pullulanu o odpowiadających stężeniach. Na podstawie uzyskanych wyników wnioskowano, że o lepkości pozornej medium hodowlanego decyduje głównie struktura polimeru utworzonego przez mikroorganizmy i ich egzogenne produkty przemiany materii.

Słowa kluczowe: *Aureobasidium pullulans*, pullulan, właściwości reologiczne, lepkość pozorna, bioreaktor.

WSTĘP

Właściwości reologiczne surowców, ich zmiana w trakcie procesu technologicznego czy podczas użytkowania gotowego produktu stanowią bardzo ważny parametr mający wpływ zarówno na sam przebieg procesu technologicznego jak i na jakość i wartości użytkowe gotowego produktu. Ciała płynne mogą

zachowywać się jak ciecze niutonowskie, których lepkość nie zależy od szybkości ścinania lub mogą mieć charakterystykę cieczy nieniutonowskiej. W cieczy nieniutonowskiej zmiana prędkości przepływu lub/i zmiana wymiaru charakterystycznego przepływającej warstwy (zmiana szybkości ścinania) powoduje zmianę jej właściwości reologicznych [9]. Z kolei od lepkości, lub ogólniej od właściwości reologicznych, zależą takie parametry jak moc zainstalowanych pomp czy mieszadeł, wymiary przewodów, rur czy dysz, którymi transportowany jest surowiec płynny czy produkt, średnice otworów w opakowaniach jednostkowych, przez które np. wyciskany jest produkt.

Procesy biotechnologiczne prowadzone z udziałem żywych organizmów zajmują ważne miejsce w wielu dziedzinach takich, jak medycyna, produkcja żywności, ochrona środowiska. Na skalę przemysłową wykorzystywane są zwłaszcza pleśnie, dzięki którym otrzymuje się cenne enzymy, antybiotyki, kwasy organiczne czy polisacharydy. Jednym z takich polisacharydów jest pullulan - wielocukier syntetyzowany przez grzyby należące do gatunku *A. pullulans*. Jest on substancją bezbarwną, bezwoną, dającą roztwory o dużej lepkości już przy niewielkich stężeniach, po wyschnięciu tworzącą mocne błony. Z tego względu ma potencjalnie duże zastosowanie - zarówno jako dodatek do żywności - jak i składnik biodegradowalnych lub jadalnych opakowań [2].

W trakcie prowadzenia hodowli następuje przyrost biomasy, a więc wzrasta liczba komórek zawieszonych w podłożu. Drobnoustroje, aby mogły się rozmnażać, zużywają związki chemiczne wchodzące w skład podłoża hodowlanego. Jednocześnie, wskutek przemiany materii żywych organizmów, produkowane są różne związki chemiczne, których część może być wydzielana na zewnątrz komórki (substancje egzogenne). Tak więc skład podłoża ulega ciągłej zmianie, stąd należy się spodziewać, że zmianie ulegają również właściwości reologiczne medium hodowlanego. Z kolei zmiany lepkości mają wpływ nie tylko na procesy związane z wprawianiem podłoża w ruch, ale również na warunki związane z przebiegiem samego procesu. Zmiany lepkości mogą wpływać na zdolność rozpuszczania tlenu w podłożu, na równomierność rozprowadzania w podłożu składników niezbędnych do prawidłowego prowadzenia hodowli czy na ich dostępność dla drobnoustrojów [4].

Właściwości reologiczne medium uzależnione są od użytego szczepu drobnoustrojów oraz warunków prowadzenia procesu [2,5,8] - gdyż od tego zależy metabolizm komórki. Dane dotyczące właściwości reologicznych i ich zmian podczas prowadzenia procesów biotechnologicznych muszą być więc określone dla konkretnego szczepu i konkretnych warunków.

MATERIAŁ I METODYKA

Materiałem użytym do badań był dziki szczep *A. pullulans* AP-3, pochodzący z kolekcji czystych kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW. Hodowla prowadzona była na podłożu płynnym, standardowym wg Gniewosz i wsp. [3]. Skład jego był następujący: sacharoza - 6%, K_2HPO_4 - 0,75%, NaCl - 0,15%, $(NH_4)_2SO_4$ - 0,07%, $MgSO_4$ - 0,04%, ekstrakt drożdżowy (f-my Life Technologies) - 0,04%. Przed zaszczepieniem, pH podłoża było doprowadzane do wartości 6,5 za pomocą kwasu solnego. Inoculum przygotowywano prowadząc hodowlę w kolbkach umieszczonych w wytrząsarce posuwisto - zwrotnej (celem napowietrzenia podłoża), w temperaturze 28°C, przez 48 godzin.

Hodowlę właściwą *A. pullulans* przeprowadzono w sposób okresowy w bioreaktorze BIOFLO 3000 firmy New Brunswick Scientific o pojemności maksymalnej zbiornika 5 dm³. Zbiornik bioreaktora, po napełnieniu podłożem i zamontowaniu używanych czujników (elektroda tlenowa, czujnik temperatury, elektroda pH), sterylizowany był w temperaturze 121°C przez 25 minut. Po ostudzeniu i spolaryzowaniu elektrody O₂, podłączano zbiornik do układu sterująco-kontrolnego i, po osiągnięciu zadanej temperatury oraz skalibrowaniu elektrody tlenowej, zaszczepiano. Dodatek inoculum wynosił 4% objętościowo.

W zbiorniku, wyposażonym w przegrody, umieszczone było mieszadło turbinowe. Dodatkowo, poprzez barboter, podawane było powietrze w ilości 100 l na godzinę. Układ ten pozwalał na osiągnięcie wysokiego poziomu natlenienia medium hodowlanego. Jako zmienną niezależną przyjęto prędkość mieszadła. Zastosowano prędkości 200, 400, 600, 800 i 1000 rpm (rotations per minute - obr min⁻¹). Hodowlę prowadzono przez 96 h.

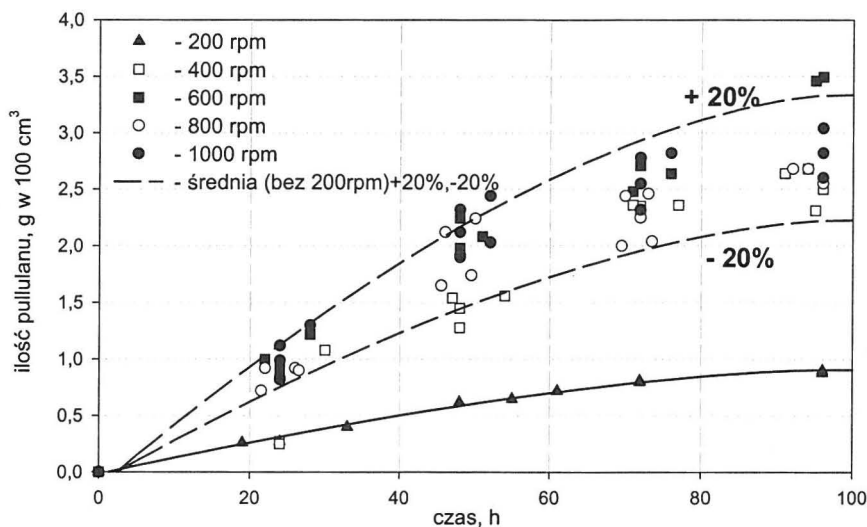
Właściwości reologiczne medium określano przy użyciu reometru Brookfield Engineering Labs. Zastosowano wrzeciono RV SC4-21. Szybkość ścinania zmieniano skokowo w zakresie 0 do 220 s⁻¹ - co 10 s⁻¹. Próbkę medium hodowlanego do oznaczeń pobierano bezpośrednio po zaszczepieniu oraz w odstępach czasowych zależnych od zaawansowania hodowli.

Jednocześnie w próbkach tych przeprowadzano oznaczenia zawartości pullulanu. W tym celu oddzielano biomasę poprzez wirowanie przy obrotach 8000 rpm przez 20 minut. Do 1 części objętościowej supernatantu dodawano 2 części 96% etanolu i, energicznie mieszając, zbierano wytrącony wielocukier. Po ponownym rozpuszczeniu w gorącej wodzie i powtórzeniu procedury wytrącania pullulan suszono w temperaturze 96°C, a jego zawartość wyrażano w gramach suchej substancji na 100 cm³ podłoża.

Do celów porównawczych wyznaczono krzywe płynięcia dla 1, 2, 3, 4 i 5% wodnych roztworów pullulanu otrzymanego w hodowlach i oczyszczonego metodą detergentowo-toluenową, której zasada opiera się na usunięciu barwników melaninowych i innych zanieczyszczeń detergentem (HTAB) oraz strąceniu białek wraz z substancjami białkowymi 10% alkoholowym roztworem toluenu [7].

WYNIKI I DYSKUSJA

Kinetykę produkcji pullulanu przez *Aureobasidium pullulans* w zależności od zastosowanej prędkości obrotowej mieszadła przedstawia Rys. 1. Ponieważ wzrost prędkości obrotowej mieszadła oznacza jednocześnie zwiększenie intensywności natleniania medium hodowlanego, zatem rysunek ten może być również interpretowany jako korelacja pomiędzy stopniem natlenienia a ilością wytworzonego wielocukru (lepkością podłoża). Należy jednak pamiętać, że wzrost obrotów mieszadła powoduje jednocześnie wzrost sił ścinających, działających na żywe organizmy, co może stwarzać niekorzystne warunki rozwoju.



Rys. 1. Wpływ prędkości obrotowej mieszadła na ilość wyprodukowanego pullulanu w trakcie hodowli.

Fig. 1. Effect of agitator speed on pullulan production during fermentation.

Najniższe ilości pullulanu uzyskano w hodowli, w której prędkość obrotowa mieszadła wynosiła 200 rpm. Spowodowane było to faktem, że w tych warunkach ilość tlenu rozpuszczonego w podłożu była niewystarczająca (w okresie intensywnego wzrostu drobnoustrojów elektroda tlenowa wskazywała zerowy poziom tlenu w podłożu). Wzrost tej prędkości do 400 rpm powodował wyraźne zwiększenie ilości pullulanu, niezależnie od czasu trwania hodowli, i w efekcie uzyskano około 2,5-krotny wzrost wydajności oczekiwanego produktu przemiany materii.

Dalszy wzrost prędkości obrotowej mieszadła nie powodował statystycznie istotnej różnicy w ilości wyprodukowanego pullulanu. Jednak wykreślenie krzywych wyznaczających 20-to procentowe odchylenie od wartości średniego plonu pullulanu uzyskanego dla wszystkich tych hodowli (Rys.1) pozwala zauważyć, że punkty odpowiadające hodowli przy 400 rpm leżą najbliżej dolnej granicy obszaru przez te krzywe wyznaczonego, a z kolei punkty dla 600 rpm - najbliżej górnej granicy. Można więc mówić o tendencji wzrostu wydajności pullulanu do prędkości 600 rpm i do jej obniżenia dla wyższych prędkości. Takie relacje można by tłumaczyć bądź zbyt wysokim stężeniem tlenu w podłożu lub stresującym działaniem na komórki drożdży naprężeń ścinających występujących przy prędkościach 800 rpm i większych.

Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów naprężenia stycznego τ przy zmieniających się szybkościach ścinania $\dot{\gamma}$ wykreślono krzywe płynięcia w trakcie każdej hodowli oraz dla zmieniających się warunków hodowli. Przykładowy przebieg krzywych płynięcia przedstawia Rys. 2. Krzywe te są dobrze aproksymowane za pomocą równania Ostwald-de-Waele'a o postaci [6]:

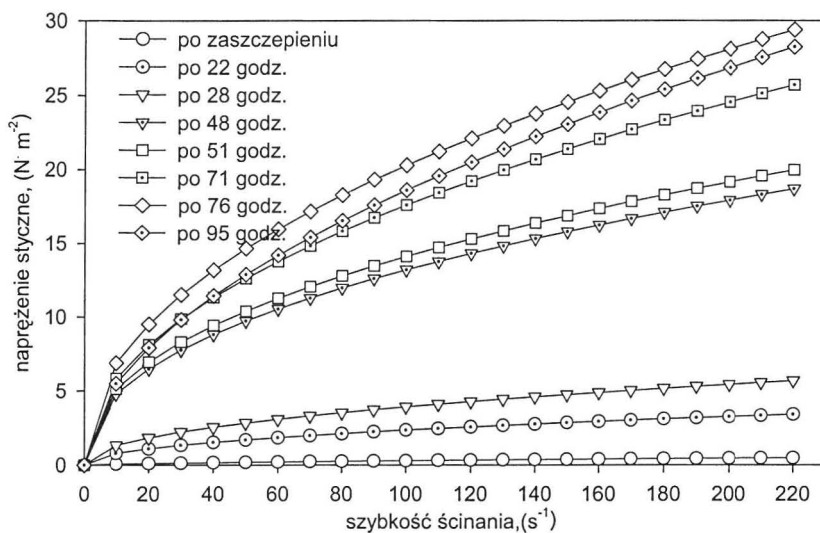
$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

gdzie: K - współczynnik konsystencji, n - wykładnik potęgi.

Warto zauważyć, że gdy n w równaniu (1) przyjmuje wartość 1, wówczas równanie to opisuje zachowanie się cieczy niutonowskiej i K przekształca się we współczynnik lepkości η . Im bardziej n odbiega od jedności, tym bardziej właściwości danej cieczy odbiegają od właściwości cieczy niutonowskiej. Z kolei im wyższa wartość współczynnika K , tym wzrost szybkości ścinania wywołuje większe zmiany naprężenia stycznego.

W trakcie hodowli, niezależnie od zastosowanej liczby obrotów mieszadła (a więc od intensywności procesu napowietrzania), wartości współczynnika K rosły, przyjmując najwyższe wartości pomiędzy 48 a 72 godziną hodowli, co wyraźnie związane jest ze wzrostem ilości pullulanu w medium hodowlanym. Można zauważyć pewną tendencję obniżania konsystencji medium w ostatniej

dobie hodowli, co obrazuje przebieg krzywej płynięcia dla podłoża w 96 godzinie hodowli poniżej krzywej płynięcia dla 76 godziny.



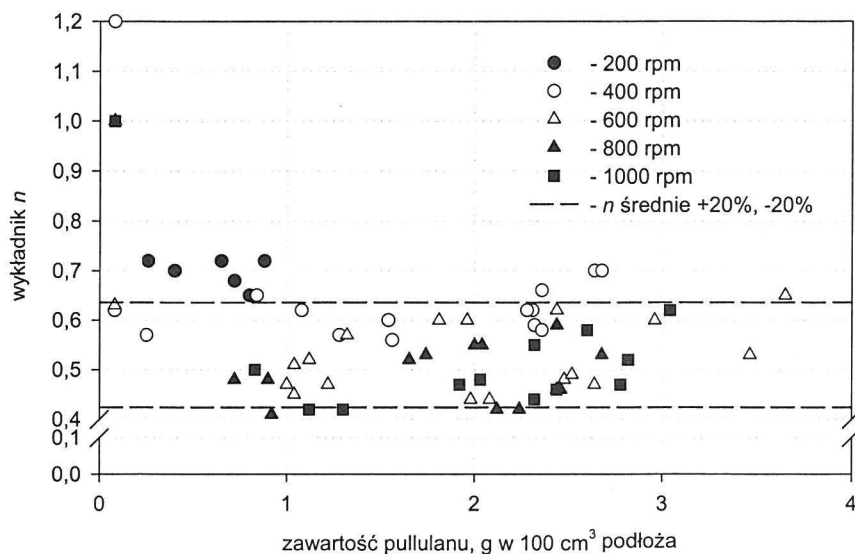
Rys. 2. Zmiany naprężenia stycznego w funkcji szybkości ścinania w trakcie hodowli prowadzonej przy obrotach mieszadła 600 min^{-1} .

Fig. 2. Relationship between shear stress and shear rate at agitator speed 600 rpm.

Wartości wykładnika potęgi bezpośrednio po zaszczepieniu przyjmują wartość 1 lub blisko jedności. Wtedy w podłożu znajduje się około $0,08 \text{ g s.s. pullulanu}$ w 100 cm^3 podłoża, a więc ilość wynikająca z dodawanego inoculum. Powstałe stężenie jest więc bardzo małe, dlatego właściwości podłoża są zbliżone do cieczy niutonowskiej. Natomiast dla wszystkich innych analizowanych punktów pomiarowych (może z wyjątkiem tych uzyskanych przy 200 rpm) brak jest wyraźnej korelacji pomiędzy wartościami wykładnika równania Ostwald-de-Waele'a a ilością wytworzonego pullulanu (Rys. 3) (a więc i czasem hodowli), co wskazuje na stały, nieniuonowski charakter medium hodowlanego.

Analiza statystyczna wykazuje, że brak jest również wyraźnej korelacji pomiędzy warunkami prowadzenia procesu (zmienne napowietrzenie poprzez zmianę obrotów mieszadła) a zmianami wartości wykładnika n . Natomiast wartości wykładnika n dla hodowli prowadzonej przy 200 rpm leżą powyżej linii wyznaczającej obszar 20% odchylenia od jego średniej wartości uzyskanej dla wszystkich prowadzonych hodowli (Rys. 3). Punkty odpowiadające pozostałym hodowlom w zdecydowanej większości zawarte są w tym obszarze, przy czym dla hodowli przy 400 rpm

zgrupowane są bliżej górnej granicy, dla hodowli przy 1000 rpm - bliżej dolnej. Istnieje więc tendencja obniżenia wartości wykładnika n wraz ze wzrostem intensywności mieszania. Obserwacje przebiegu hodowli wskazują, że hodowle przy 800 i 1000 rpm uzyskiwały intensywne ciemne zabarwienie wynikające z obecności melanin już w pierwszej dobie, podczas gdy w innych przypadkach zmiana barwy występowała wyraźnie dopiero po drugiej dobie. Może to sugerować, że produkcja tego barwnika i jego powiązania z pullulanem wpływają na charakter reologiczny medium.



Rys. 3. Wartości wykładnika n w funkcji zawartości pullulanu przy zmiennych warunkach hodowli.

Fig. 3. Value of n coefficient in relation to pullulan content under various fermentation conditions.

Analiza powyższa pozwala stwierdzić, że medium hodowlane wykazuje właściwości cieczy niutonowskiej tylko bezpośrednio po zaszczepieniu, natomiast później jego właściwości reologiczne odpowiadają cieczom rozrzedzonym ścinaniem.

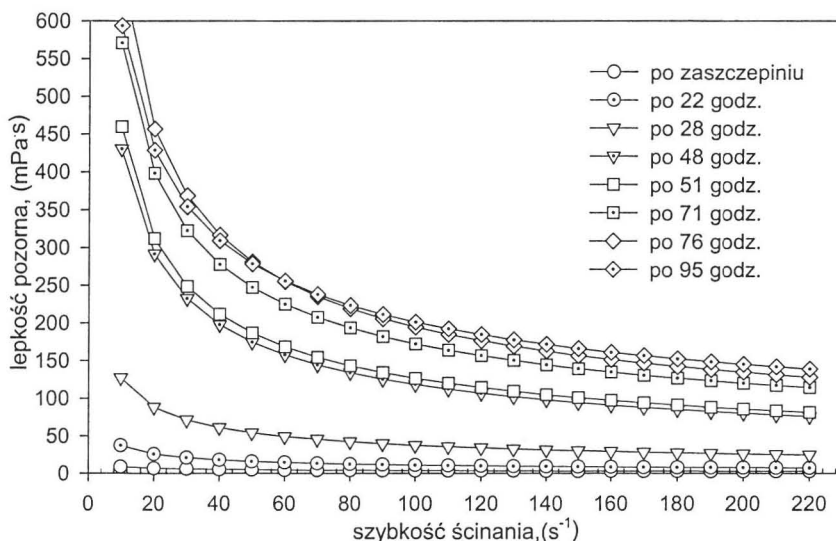
Przekształcając równanie (1) otrzymuje się wyrażenie na lepkość pozorną przy danej szybkości ścinania:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (2)$$

która pokazuje, w jakim stopniu wzrost sił ścinających wpływa na konsystencję układu. Cechą charakterystyczną cieczy rozrzedzanych ścinaniem jest to, że ze

wzrostem sił ścinających lepkość pozorna maleje i przy dużych siłach ścinających osiąga prawie stałą wartość. Oznacza to, że przy dużych siłach ścinających ciecz zaczyna zachowywać się jak ciecz niutonowska.

Na podstawie równania (2) wyznaczono lepkości pozorne medium hodowlanego przy określonych szybkościach ścinania. Przykładowy przebieg zmian lepkości pozornej w zależności od czasu trwania hodowli oraz od zastosowanej prędkości ścinania przedstawia Rys. 4.

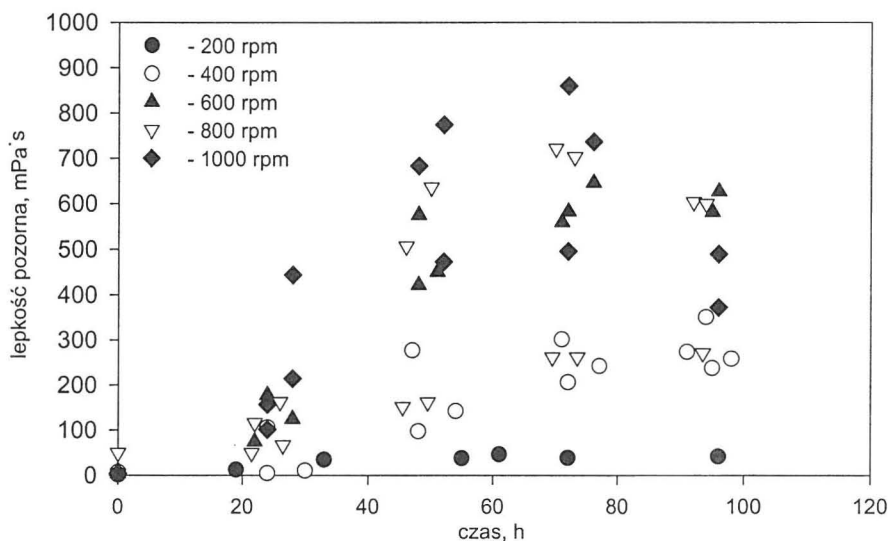


Rys. 4. Zmiany lepkości pozornej w funkcji szybkości ścinania w trakcie hodowli prowadzonej przy obrotach mieszadła 600 rpm.

Fig. 4. Changes in apparent viscosity as a function of shear rate during fermentation at agitator speed of 600 rpm.

Najwyższe wartości lepkości pozornej, niezależnie od zastosowanej prędkości mieszadła i czasu trwania hodowli, otrzymano dla najniższej z zastosowanych szybkości ścinania, tj. dla 10 s^{-1} . Lepkość pozorna malała istotnie do szybkości ścinania mieszczącej się w zakresie $30 \div 50 \text{ s}^{-1}$. Dalszy wzrost szybkości ścinania powodował już tylko niewielkie obniżenie lepkości pozornej. A więc medium hodowlane było rozrzedzane ścinaniem. Największą zmianę lepkości pozornej zaobserwowano w drugiej dobie hodowli, niezależnie od szybkości ścinania i od warunków prowadzenia procesu. Na Rys. 4 jest to widoczne w postaci nieproporcjonalnego przedziału pomiędzy krzywymi dla 24 i 48 godziny hodowli.

Przykładowe zmiany lepkości pozornej w zależności od czasu trwania hodowli, dla szybkości ścinania 10 s^{-1} , przedstawia Rys. 5. Mimo dużego rozrzutu wyników warto zauważyć, że wzrost prędkości obrotowej mieszadła powodował wzrost lepkości pozornej medium hodowlanego z jednoczesnym pojawieniem się maksimum tej wartości. Przy niższych obrotach mieszadła maksymalną wartość lepkości pozornej uzyskano w końcowym etapie hodowli. Dalszy wzrost prędkości obrotowej mieszadła powodował nie tylko wzrost lepkości pozornej, ale również wystąpienie jej maksymalnej wartości na przełomie trzeciej i czwartej doby procesu. Pod koniec hodowli następowało obniżenie lepkości pozornej medium hodowlanego. Wyniki te dobrze korelują z zależnością przedstawioną na Rys. 1 i pokazują, że istnieje określona korelacja pomiędzy obrotami mieszadła i czasem uzyskania maksymalnej ilości pullulanu. Ponadto wydaje się, że wzrost intensywności mieszania wpływa w znacznym stopniu na strukturę pullulanu, co objawia się obniżeniem lepkości pozornej medium pod koniec procesu.



Rys. 5. Zmiany lepkości pozornej w czasie hodowli przy zmiennych warunkach hodowli.

Fig. 5. Changes in apparent viscosity as a function of fermentation time under various fermentation conditions.

Lepkość pozorna medium hodowlanego będąca miarą tarcia wewnętrznego jest zależna, między innymi, od liczby komórek, ich kształtu, wielkości, stopnia agregacji, a także ilości i jakości pullulanu (wysokie naprężenia ścinające mogą

prowadzić do produkcji pullulanu o krótszych łańcuchach [6]) jako egzogenne produktu przemiany materii, tworzącego warstwę śluzu na powierzchni ściany komórkowej. Nie ulega wątpliwości, że najważniejszym czynnikiem - w przypadku *A. pullulans* - jest stężenie i jakość polisacharydu.

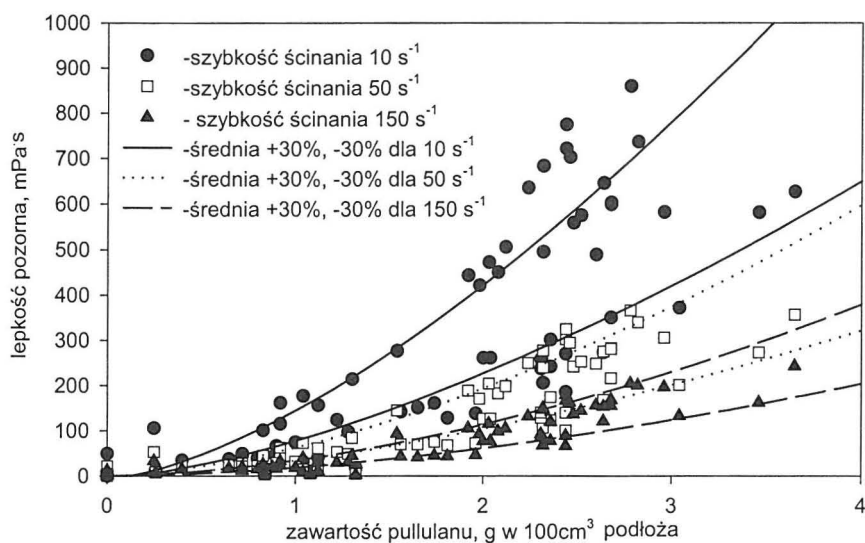
Dalsza interpretacja uzyskanych wyników została więc przeprowadzona z uwzględnieniem ilości wyprodukowanego pullulanu, na bazie lepkości pozornej obliczonej dla trzech szybkości ścinania: 10, 50 i 150 s⁻¹. Dwie pierwsze wartości odpowiadają zakresom, w których konsystencja medium hodowlanego silnie zależy od szybkości ścinania, natomiast trzecia wartość dotyczy tego zakresu, w którym ciecz hodowlana zachowuje się podobnie do cieczy niutonowskiej. Do analizy wpływu stężenia polisacharydu na właściwości medium wykorzystano wyniki ze wszystkich prowadzonych hodowli.

Krzywe zależności lepkości pozornej od stężenia pullulanu - dla wybranych szybkości ścinania - mają charakter parabol (Rys. 6). Wraz ze wzrostem szybkości ścinania, w równaniach opisujących te zależności, rosną wartości wykładnika potęgi i maleją współczynniki proporcjonalności. Świadczy to o tym, że im mniejsza szybkość ścinania, tym zmiany lepkości pozornej wywołane jednostkowym wzrostem stężenia są większe. Dowodzi to również istotnego wpływu struktury, utworzonej przez wydzielane produkty przemiany materii i komórki drożdży, na lepkość pozorną medium. Zniszczenie jej, przy jednoczesnym ukierunkowaniu długich łańcuchów biopolimeru, spowodowanych naprężeniami ścinającymi wzrastającymi wraz ze wzrostem szybkości ścinania powoduje, że stężenie pullulanu staje się czynnikiem decydującym o lepkości pozornej podłoża.

Dla najmniejszej z analizowanych szybkości ścinania znaczna część punktów leży poza wyznaczonym obszarem. Wzrost szybkości ścinania powoduje, że prawie wszystkie punkty należą do wyznaczonych obszarów. A więc istnieją inne czynniki - poza stężeniem pullulanu - które istotnie wpływają na wartość lepkości pozornej. Mogą to być: naprężenia ścinające wynikające z intensywności mieszania oraz stres z nimi związany, poziom natlenienia czy inne bodźce mogące mieć wpływ na kierunek lub intensywność procesów biochemicznych zachodzących w żywych organizmach.

We wszystkich prowadzonych hodowlach plon pullulanu wynosił poniżej 4g ze 100 cm³ medium, dokonano więc porównawczych pomiarów lepkości pozornej wodnych roztworów oczyszczonego pullulanu zawierających 1, 2, 3, 4 i 5% polisacharydu. Otrzymane wyniki pokazały, że roztwory te zachowywały się jak cieczy niutonowskie, a ich lepkości wynosiły odpowiednio 3, 6, 10, 17 i 22 mPa·s, a więc kilkadziesiąt razy mniejsze niż medium hodowlanego zawierającego

odpowiadającą ilość pullulanu. Dowodzi to, że nieniutonowski charakter cieczy nie jest spowodowany stężeniem polisacharydów, a raczej strukturą, którą ta materia tworzy w połączeniu z mikroorganizmami czy zanieczyszczeniami, wśród których najważniejszą rolę strukturotwórczą mogą odgrywać związki melaninowe. Związki te są polimerowymi pochodnymi tyrozyny o wysokiej masie cząsteczkowej i mogą tworzyć pozakomórkowe polimery [1].



Rys. 6. Zmiany lepkości pozornej w funkcji uzyskanego plonu polisacharydu przy wybranych szybkościach ścinania.

Fig. 6. Changes in apparent viscosity as a function of polysaccharide productivity at chosen shear rates.

WNIOSKI

- Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że medium hodowlane podczas hodowli *Aureobasidium pullulans* ma charakter cieczy nieniutonowskiej już po pierwszej dobie. Charakterystyka ta jest praktycznie niezmienna w czasie, zmienia się natomiast konsystencja układu, co dobrze opisują równania Ostwaldde-Waele'a dopasowane do krzywych płynięcia.
- Lepkość pozorna medium hodowlanego rośnie wraz ze wzrostem liczby obrotów mieszadła w zakresie 200 do 600 rpm, a wpływ dalszego wzrostu prędkości obrotowej nie jest jednoznaczny. Uwzględniając ilość wytworzonego pullulanu, należy stwierdzić, że prędkość obrotowa mieszadła 600 rpm była - w warunkach prowadzenia doświadczeń - najbardziej korzystna.

- O wartości lepkości pozornej, przy danej szybkości ścinania, decyduje głównie struktura utworzona przez egzogenne produkty przemiany materii. Na kształtowanie tej struktury wpływa zawartość pullulanu i związków mu towarzyszących, takich jak melaniny, co powoduje, że pomiar lepkości pozornej może być miarą zawartości pullulanu w podłożu. Metoda ta jest tym bardziej czuła, im zastosowane szybkości ścinania są mniejsze. Ponieważ jednak przy najmniejszej z zastosowanych szybkości uwidaczniał się najbardziej wpływ innych czynników niż stężenie pullulanu, stąd autorzy rekomendują prowadzenie pomiarów lepkości pozornej przy szybkości ścinania 50 s^{-1} .

PIŚMIENNICTWO

1. **Fogarty R. V., Tobin J. M.:** Fungal melanins and interactions with metals. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 311-317, 1996.
2. **Gniewosz M., Sobczak G., Zieliński W.:** Optymalisation of saccharose and ammonium sulfate concentrations for pullulan biosynthesis by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 1, 61-68, 1997.
3. **Gniewosz M., Sobczak G.:** Możliwości wykorzystania *Aureobasidium pullulans* i pullulanu w technologii żywności. *Biotechnologia*, 2(45), 81-92, 1999.
4. **Guo-Qing Li, Hong-Wei Qiu, Zhi-Ming Zheng, Zhao-Ling Cai, Shou-Zhi Yang:** Effect of fluid rheological properties on mass transfer in a bioreactor. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 62, 385-391, 1995.
5. **Lazaridou A., Roukas T., Biliaderis C.G., Vaikousi H.:** Characterization of produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 122-132, 2002.
6. **Leduy A., Marsan A. A., Coupal B.:** A study of the rheological properties of a non-newtonian fermentation broth. *Biotechnology and Bioengineering*, XVI, 61-76, 1974.
7. **Roukas T., Biliaderis C. G.:** Evaluation of carbon pod as substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 55, 27-44, 1995.
8. **Roukas T., Liakopoulou-Kyriakides M.:** Production of pullulan from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank fermentor. *Journal of Food Engineering*, 40, 89-94, 1999.
9. **Schramm G.:** Reologia. Podstawy i zastosowania. Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań, 1999.

RHEOLOGICAL PROPERTIES OF FERMENTATION BROTH DURING PULLULAN PRODUCTION BY *AUREOBASIDIUM PULLULANS*

D. Nowak, M. Rzeszotarski, P. P. Lewicki

Department of Food Engineering and Process Management, Warsaw Agricultural University,
(SGGW)
ul. Nowoursynowska 159 c, 02-776 Warszawa
e-mail: NOWAK@sggw.waw.pl

Abstract. Rheological properties of fermentation broth during polysaccharide biosynthesis by *Aureobasidium pullulans* in bioreactor were examined. The fermentation process in synthetic broth containing saccharose was carried out by 96 hours. Agitator speeds from 200 to 1000 rpm were applied to obtain various cultivation conditions in the bioreactor. Rheological characteristics of the broth during fermentation process and under various process conditions were analyzed. The Newtonian behaviour of the broth was noted only during the first day after inoculation. Then the broth attained the non-Newtonian pseudoplastic fluid characteristics.

The Ostwald-de-Weale equation was used to describe rheological properties of the cultivation medium. The constant presenting the non-Newtonian behaviour of the fluid, the consistency and apparent viscosity of the fermentation broth were calculated.

The highest apparent viscosity increase was observed during the second day of fermentation process. Increased agitation caused increase of the apparent viscosity. Rheological properties of the medium were compared with those of water solutions of pure pullulan at concentrations from 1 to 5%. The solutions were Newtonian and the viscosity was several times lower than the consistency of the broth. It was found that the structure formed by biopolymers and other metabolites such as melanins determine the apparent viscosity of cultivation medium

Keywords: *Aureobasidium pullulans*, pullulan, rheological properties, apparent viscosity, bioreactor.