

Лекція 2

Тема: Загальна характеристика мікроорганізмів і способи їх культивування.

План.

1. Особливості і параметри росту мікроорганізмів.
2. Отримання і способи зберігання культур-продуцентів.
3. Способи культивування культур-продуцентів.

Мікроорганізми, маючи широкий набір ферментних систем, здатні утворювати в процесі життєдіяльності різні продукти обміну, які є цінними для людини. Мікроорганізми здатні модифікувати природні та хімічно синтезовані сполуки у речовини, які потребує людина.

Особливого розвитку набули мікробіологічні виробництва в останні роки завдяки детальному вивченню фізіолого-біохімічних і генетичних властивостей мікроорганізмів. Найширше використовують дріжджі, рідше інші одноклітинні гриби, а також анаеробні і аеробні бактерії. Загалом у виготовленні харчових продуктів використовують понад 70 видів мікроорганізмів-продуцентів.

Різні штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* використовують при виготовленні пива, вина, хліба отримання **етилового спирту**.

Як джерело **білка і вітамінів** на нехарчовій сировині використовують дріжджі роду *Candida*.

Плісеневі гриби використовують для отримання **органічних кислот**: лимонної (*Aspergillus niger*), глюконової (*Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum*), ітаконової (*Aspergillus terreus*), фумарової (*Rhizopus nigricans*);

для **отримання антибіотиків** пеніциліну (*Penicillium chrysogenum, P. notatum*), а цефалоспорину (*Cephalosporium sp.*);

препарати вітаміну В₂ одержують за допомогою *Eremothecium ashbyii, Ashbyii gossypii*, а бета-каротин - *Blakeslea trispora*.

1. Параметри росту мікроорганізмів.

Деякі прокариоти виявляють потребу в одній певній органічній сполуці із групи амінокислот, вітамінів чи азотистих основ, які самі не здатні синтезувати. Такі органічні речовини потрібні у дуже малих кількостях і називаються **факторами росту**, а організми які їх потребують – **ауксотрофами**, на відміну від **прототрофів**, що синтезують усі необхідні їм органічні сполуки. Більшість мікроорганізмів, що використовуються у мікробіологічних процесах, належать до прототрофів. Окремі мікроорганізми є ауксотрофами за кількома факторами росту. Зокрема, деякі молочнокислі бактерії потребують для росту всіх амінокислот, пуринів, піримідинів і вітамінів групи В. У деяких мікроорганізмів (молочнокислі бактерії, окремі штами *E. coli*, дріжджі) потреба у вітамінах є постійною і специфічною ознакою.

Мікробіологічне виробництво базується на використанні ростучих культур відповідних видів, а також суспензії відмерлих клітин та іммобілізованих клітин мікроорганізмів.

Для характеристики росту мікроорганізмів визначають такі параметри:

Економічний коефіцієнт - вихід кінцевого продукту за відношенням до використаного субстрату. Розраховують за джерелом вуглецю, азоту або фосфору і оцінюють ріст певного виду мікроорганізмів на різних середовищах.

Метаболічний коефіцієнт – питома швидкість метаболізму чи фізіологічна активність (швидкість використання поживних речовин і, відповідно швидкість утворення продукту). Є величиною непостійною і визначається швидкістю росту мікроорганізму й умовами культивування.

Питома швидкість росту – приріст біомаси за одиницю часу на одиницю біомаси. Є важливою характеристикою як самої культури, так і умов культивування. Лімітуючим фактором є концентрація субстрату, а також нагромадження продуктів обміну.

Величина врожаю (вихід біомаси) культури - це та максимальна кількість клітин, чи біомаси, яку можна одержати за певних умов в одиниці об'єму (кількість клітин у 1 мл або 1 л середовища). На цей показник впливають умови культивування (рН середовища, температура, аерація).

Час генерації або час подвоєння біомаси – це час, протягом якого подвоюється кількість клітин чи біомаси.

Чиста культура – це популяція мікроорганізмів одного виду, що отримані з ізолюваної мікробної колонії;

Штам – це клітини одного виду, отримані з різних середовищ і в різний час;

Колонія – це сукупність клітин, що виростили з однієї материнської клітини.

2. Отримання і способи зберігання культур-продуцентів

Отримання посівного матеріалу

Для отримання посівного матеріалу використовують вихідну музейну культуру, що надходить з відповідного інституту чи колекції. Така культура містить молоді ростучі колонії на скошеному агарі або в ампулах (до неї додають паспорт, що містить дані про культуру: продуцент, колекційний номер, серія і дата виготовлення, середня активність серії та термін придатності).

Залежно від виду продуцента, приготування посівного матеріалу проходить у кілька етапів: вихідна культура---->ріст на скошеному агаризованому середовищі---->вирощування у колбах на струшувачах у рідкому середовищі---->посівні апарати----->стадія виробничої ферментації.

Методи зберігання промислових культур

Відомо багато методів зберігання культур мікроорганізмів у життєздатному стані:

Періодичні пересіви (субкультивування) – систематичні пересіви культур – аспорогенні види пересівають 1-2 рази на місяць; спороутворювальні і мікрومیцети – через 2-3 місяці. Недоліки методу: ймовірність зараження, коротко тривалість зберігання, трудомісткість, високі витрати на приготування середовищ.

Зберігання при низьких температурах – з використанням кріопротекторів (гліцерин, глюкоза, сахароза, галактоза, натрій глутамат, натрій аспартат, деякі білки). Густу суспензію мікроорганізмів у середовищі, що містить кріопротектори, поміщають у скляні чи пластмасові ампули із гвинтовими корками, заморожують у рефрижераторах при температурі -12 до -80°C.

Ліофілізація – висушування заморожених клітин у вакуумі.

Як протектори використовують прості сполуки (гліцерин, глюкоза, сахароза, галактоза, натрій глутамат, натрій аспартат), і складні (сироватку крові, білки сироватки, желатину, молоко, бульйон, декстрин, крохмаль, поліетиленгліколь тощо). Використовують як окремі препарати, так і декілька у різних співвідношеннях.

Ліофілізацію проводять у спеціальних апаратах, після чого ампули запаюють і зберігають при +4°C у темноті. Такі ампули зручно транспортувати. Ліофілізовані клітини зберігають у вакууму або в атмосфері інертного газу (аргон, неон, гелій, криптон).

Ліофілізацію краще переносять грампозитивні, ніж грамнегативні бактерії, дріжджі з маленькими клітинами і аскоспорами (рр. *Pichia*, *Lipomyces*) ніж неспороутворювальні великі клітини дріжджів (рр. *Saccharomyces*, *Rhodotorula*).

Культури, що не витримують ліофілізації (деякі автотрофні бактерії, спірохети, мікоплазми, різні віруси та закваски молочнокислих бактерій) зберігають у рідкому азоті.

Висушування – (зневоднення мікробних клітин) на адсорбентах – у стерильному ґрунті, піску, глині, силікагелі, на фільтрувальному папері, ваті, скляних і фарфорових частинках, тканинах, пластмасах, тощо.

Зберігання під мінеральною олією - культуру вирощують на оптимальному твердому середовищі і заливають вазеліновою олією, яка сповільнює швидкість обмінних процесів і запобігає висиханню середовища.

3. Способи культивування культур-продуцентів.

Розрізняють два способи культивування мікроорганізмів: поверхневий і глибинний:

Поверхнєве культивування (для вирощування грибів) – мікроорганізми вирощують на поверхні тонкого шару рідкого середовища чи твердого субстрату, які в свою чергу за способом посіву поділяються на дві групи:

- посів на поверхню тонкого шару середовища (тонкошарова схема) – субстрат вносять товщиною 2-4 см на металеву або дерев'яну ємність у приміщеннях з гарною аерацією для видалення тепла, що утворюється під час культивування і вологістю 40-70%.

Субстрат – буряковий і виноградний жом, зернова солома, пшеничні та рисові висівки, різні солі тощо.

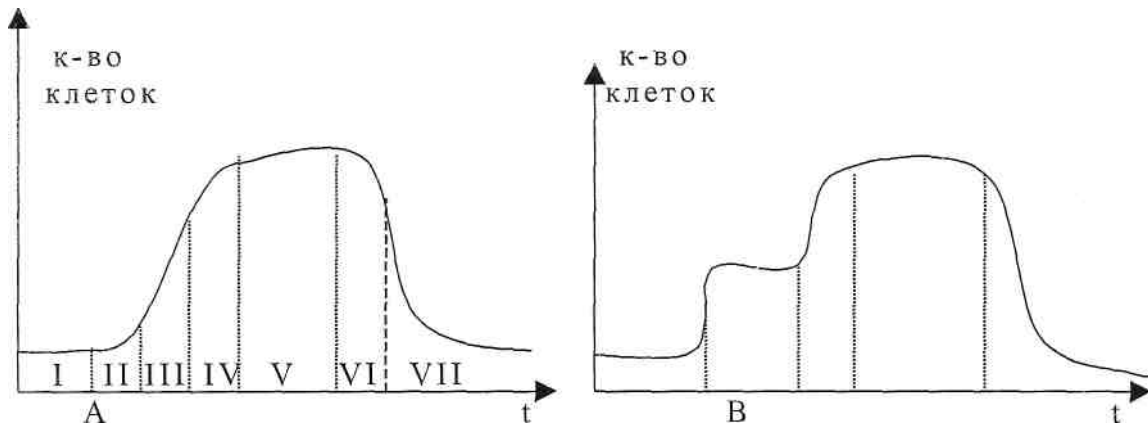
- глибинний засів - культуру вносять у середовище (субстрат), яким заповнюються на 0,6 чи 1,5-1.8 м прямокутну ємність.

Глибинне культивування – це головний спосіб, який використовують у мікробіологічних виробництвах. Воно має ряд переваг: менш трудомістке, потребує менше площ, має меншу ймовірність інфікування, його легше автоматизувати, і контролювати і отримати більший вихід продукції.

Глибинне культивування може бути періодичним і безперервним.

Періодичне культивування або стаціонарне - культивування мікроорганізмів у закритому об'ємі без поновлення поживного середовища.

За цих умов популяція мікроорганізмів проходить певний цикл розвитку, для якого притаманна певна зміна фаз або періодів. Послідовна зміна фаз має вигляд S-подібної кривої. Виділяють чотири основні фази росту періодичної культури.



Ляг- фаза починається з моменту посіву мікроорганізмів у поживне середовище. У ляг-фазі культура адаптується до нових умов культивування: відбувається синтез мРНК, ферментів, чисельність клітин практично не змінюється. Тривалість фази - від декількох хвилин до декількох годин або діб – визначається оптимальними умовами для росту посівного матеріалу: залежить від віку і об'єму культури, складу середовища, умов культивування.

Експоненціальна (логарифмічна) фаза – розпочинається після адаптації культури до нових умов культивування. Під час цього процесу досягається максимальна швидкість росту і біохімічна активність, генетично закладена і можлива за певних умов. Збільшення кількості клітин відбувається у геометричній прогресії.

Стаціонарна фаза - спостерігається незначний приріст біомаси (процес розмноження врівноважується процесом відмирання клітин). У цій фазі росту культура менш чутлива до дії фізичних факторів, її біомаса досягає максимального значення. Інтенсивність обмінних процесів у стаціонарній фазі знижується, нагромаджуються у значній кількості вторинні метаболіти, токсичні продукти обміну вичерпуються поживні речовини, що сповільнює ріст культури.

Фаза відмирання - крива росту йде униз, бо кількість клітин у культурі помітно зменшується. Починається лізис клітин під дією власних ферментів (**автоліз**).

Періодичні культури вирощують на твердих або в рідких середовищах, у лабораторних умовах – у скляному посуді різного об'єму в термостатах, у промислових – у ферментерах, або біореакторах різного об'єму.

Для культивування аеробних мікроорганізмів використовують ферментери, оснащені мішалками і системою аерації. Анаеробні бактерії вирощують у спеціальних апаратах – анаеростатах, анаеробних боксах, у спеціальному герметичному посуді в атмосфері азоту або інертних газів (аргону).

Фототрофні бактерії потребують світла, тому для їх культивування застосовують термостати, оснащені лампами денного світла – люменістати.

Безперервне культивування – це культивування при якому культура мікроорганізмів тривалий час підтримується в стані експоненціального росту.

Перевагами безперервного культивування є:

- використання спец обладнання;
- стабілізація у часі;
- поліпшення якості продукту;
- можливість автоматизації.

Безперервне культивування можна здійснювати різними способами:

Гомогенно-безперервний – процес повного витіснення, який проводять у трубчастому ферментері, у який з одного боку подається середовище і посівний матеріал, а з другого витікає культура. Застосовується для отримання харчових продуктів, зокрема пива.

Процес проводять при інтенсивному повітряному чи механічному перемішуванні, створюючи умови, що відповідають певній фазі кривої росту. При швидкому заміщенні середовища – це умови експоненціальної фази росту, при повільному – стаціонарної.

Контроль і керування процесами безперервного культивування проводять двома способами: хеMOSTАТНИМ і ТУРБІДОСТАТНИМ.

ХеMOSTАТНЕ КУЛЬТИВУВАННЯ – проводять у хеMOSTАТАХ – апаратах, у які із постійною швидкістю надходить свіже поживне середовище і з такою ж швидкістю відбувається відтік культури.

У хеMOSTАТІ протягом тривалого періоду автоматично підтримується постійний урожай культури (вихід молодих клітин), швидкість росту і концентрація компонентів середовища. У такій спосіб можна впливати на культуру лімітуючим чи інгібуючим фактором, а також регулювати ступінь цього впливу.

Наприклад, при виробництві деяких антибіотиків, продуцентами яких є актиноміцети, лімітуючим фактором є нестача фосфору, при виробництві пеніциліну – глюкоза, граміцидину С – молекулярний кисень.

ТУРБІДОСТАТНЕ КУЛЬТИВУВАННЯ – проводять у ТУРБІДОСТАТАХ – в середовищі підтримують постійний рівень біомаси мікроорганізмів, який реєструють за оптичною густиною спеціальним приладом, що обладнаний фотоелементом. Ріст мікроорганізмів у турбідостаті здійснюється без зовнішнього лімітування, швидкість нагромадження біомаси визначає швидкість притоку поживного середовища.

Параметри, що контролюються:

- фізичні параметри – температура, тиск, енерговитрати, в'язкість, швидкість струменя повітря і рідини, мутність, маса ферментера;
- хімічні параметри – рН, розчинний O_2 ; O_2 і CO_2 у вихідному газі, окисно-відновний потенціал, концентрація субстрату, концентрація продукту, іонна сила розчину;
- біологічні параметри – метаболіти, активність ферментів, вміст ДНК, РНК, вміст АТФ і НАДН₂; вміст білка.