

ЛЕКЦІЯ 2

Тема: Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів і способи їх культивування

План

1. Продукти і мікроорганізми-продуценти, що їх утворюють.
2. Особливості і параметри росту мікроорганізмів.
3. Отримання і способи зберігання культур-продуцентів.
4. Способи культивування культур-продуцентів.

2.1. Продукти і мікроорганізми-продуценти, що їх утворюють

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. Серед бактерій промислове застосування мають прокаріоти різних таксономічних груп. Найширше використовують дріжджі, рідше інші одноклітинні гриби, а також анаеробні та 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*.

Плісєневі гриби використовують для отримання органічних кислот: лимонної (*Aspergillus niger*), глюконової (*Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*), ітаконової (*Aspergillus terreus*), фумарової (*Rhizopus nigricans*); антибіотиків – пеніциліну (*Penicillium chrysogenum*, *P. notatum*), та цефалоспорину (*Cephalosporium sp.*); препарати вітаміну B₂ одержують за допомогою *Eremothecium ashbyii*, *Ashbyii gossypii*, а бета-каротин – *Blakeslea trispora*. Загалом у виготовленні харчових продуктів використовують понад 70 видів мікроорганізмів.

Серед бактерій промислове застосування мають прокаріоти різних таксономічних груп. Деякі промислові продуценти і продукти, які вони утворюють, представлені в таблиці 2.1.

Для промислового використання штам-продуцент повинен відповідати таким вимогам:

- здатність рости в чистій культурі (зокрема бактерій – без фагів);
- бути генетично стабільними;
- відсутність патогенності й токсиноутворення;
- висока швидкість росту при масовому культивуванні та здатність синтезувати продукт у великій кількості за період не більше трьох діб;
- стійкість до забруднення (контамінації іншими культурами).

Деякі прокаріоти виявляють потребу в одній певній органічній сполуці із групи амінокислот, вітамінів чи азотистих основ, які самі не здатні синтезувати. Такі органічні речовини потрібні в 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 в 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.

Таблиця 2.1

Продукти і продуценти, що їх утворюють
(за Й. Ленгелером, Г. Дреусом, Г. Шлегелем, 2005)

Продукти	Продуценти
Харчові продукти Соління та маринади Кисломолочні продукти Оцет	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pediococcus</i> ; <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> ; <i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Acetobacter aceti</i>
Харчові та кормові добавки Глутамат, лізин, інші амінокислоти Вітаміни	<i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Brevibacterium flavum</i> <i>Micrococcus</i> , <i>Microbacterium</i> <i>p.Eremothecium</i> , <i>Ashbyii</i> ; <i>Propionibacterium</i> ; <i>Bacillus subtilis</i>
Ферменти Протеази Амілази Глюкозоізомераза Пеніцилінацилаза	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>Actinoplanes missouriensis</i> , <i>Streptomyces sp.</i> <i>Escherichia coli</i> .
Розчинники Етанол Ацетон, <i>n</i> -бутанол Молочна кислота	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> ; <i>Lactobacillus sp.</i>
Полісахариди Ксантан Декстран Альгірати	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Leuconostoc mesenteroide</i> ; <i>Azotobacter vinelandii</i>
Бактерійні препарати Добрива Ентомопатогенні	<i>Rhizobium sp.</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>
Лікувальні засоби Стероїди Антибіотики Амінокислоти	Мікобактерії, <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Streptomyces erythraeus</i> , Бактерії роду <i>Bacillus</i>

Мікробіологічне виробництво базується на використанні ростучих культур відповідних видів. Для отримання деяких продуктів також використовують суспензії відмерлих клітин та іммобілізовані клітини мікроорганізмів

2.2. Параметри росту мікроорганізмів

Для характеристики росту мікроорганізмів визначають такі параметри:

Економічний коефіцієнт – вихід кінцевого продукту по відношенню 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. Цей параметр 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 у 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 (критерій швидкості росту) – це час, протягом якого подвоюється кількість клітин чи біомаси.

Одним із способів вимірювання біомаси є визначення абсолютно сухої ваги клітин ваговим методом. На практиці для оцінки росту найчастіше застосовують непрямі методи визначення біомаси: за вмістом клітинного азоту, білка тощо. Біомасу можна визначити за допомогою оптичних приладів (фотоелектроколориметра, спектрофотометра), вимірюючи оптичну густину суспензії. Інколи підраховують сумарну кількість клітин під мікроскопом у спеціальних лічильних камерах, або лише кількість живих клітин, висіваючи проби на тверді поживні середовища чи спеціальним зафарбовуванням живих або мертвих клітин.

У біотехнологічних виробництвах важливим є наукове керування метаболічними процесами мікроорганізмів для чого використовують два підходи:

- генетичний, який базується на використанні мутагенезу;
- фізіологічний – створення оптимальних умов культивування для росту культур-продуцентів. Використання цього підходу можливе за умови точних відомостей про фізіологічну роль цього процесу для продуцента, шлях синтезу метаболіту, оптимальні умови його синтезу.

Усі мікробіологічні процеси за характером росту культур-продуцентів поділяють на дві групи:

- перша група – продуценти, синтез цінного метаболіту яких пов'язаний із процесами росту культури. Для культивування підбирають умови, оптимальні для росту певної культури.
- друга група – продуценти, синтез яких не пов'язаний із процесами росту культури.

Визначення оптимальних умов залежить від фази росту мікробів, у якій відбувається максимальне накопичення певного продукту, що може бути обумовлено підтриманням високої швидкості катаболічних процесів, порушення регуляції поглинання джерела вуглецю, підвищенням проникності цитоплазматичної мембрани. Надсинтез метаболіту в цій групі залежить від лімітуючого фактора (рН, температура, іонна сила, вторинні метаболіти тощо). Значення рН і температури взаємопов'язані: з підвищенням температури діапазон рН звужується, що впливає на ефективність конверсії субстрату в певний продукт

2.3. 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.

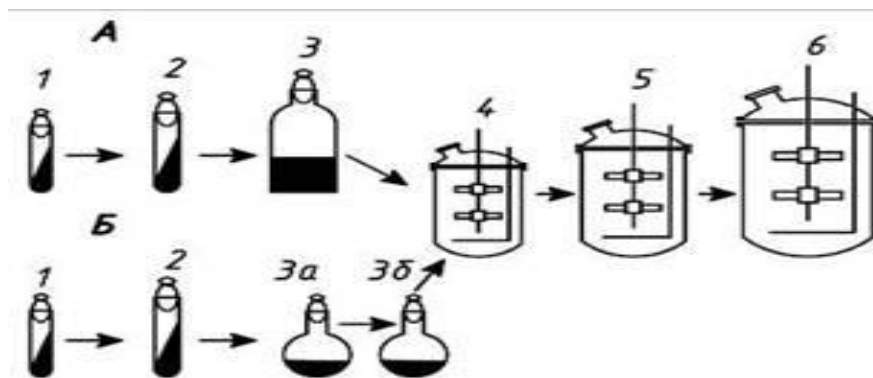


Рисунок 2.1 – Схема вирощування культур-продуцентів у флаконах (А), у колбах на качалках (Б): 1 – законсервований вихідний матеріал; 2 – спорова генерація на скошеному агарі в пробірці; 3 – II спорова генерація на твердому середовищі; 3а і 3б – I і III генерації на рідкому середовищі у колбі; 4 – ферментер попереднього інокулювання; 5 – ферментер інокулювання; 6 – основний ферментер.

Методи зберігання промислових культур

Відомо багато методів зберігання культур мікроорганізмів у життєздатному стані: періодичні пересіви (субкультивування), зберігання при низьких та ультранизьких температурах, висушування (просте і ліофілізоване), зберігання під мінеральною олією.

Періодичні пересіви (субкультивування) – систематичні пересіви культур – аспорогенні види пересівають 1-2 рази на місяць; спороутворювальні і мікроміцети – через 2-3 місяці. Культури зберігають у темноті при температур від +5 до +20⁰С. Недоліками цього методу є ймовірність зараження, короткотривалість 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 від -12 до -80⁰С. Культури зберігають у рідкому азоті тривалий час.

Ліофілізація – висушування заморожених клітин у вакуумі. Як протектори при ліофілізації 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 в різних співвідношеннях. Ліофілізацію проводять у спеціальних апаратах, після чого ампули запаюють і зберігають при $+4^{\circ}\text{C}$ у темноті. Такі ампули зручно транспортувати. Ліофілізовані клітини зберігають у вакуумі або в атмосфері інертного газу (аргон, неон, гелій, криптон). Так зберігають бактерійні препарати, вакцини, сироватки.

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. Застосовують для спороутворювальних мікроорганізмів.

Зберігання під мінеральною олією – культуру вирощують на оптимальному твердому середовищі і заливають вазеліновою олією, яка сповільнює швидкість обмінних процесів і запобігає висиханню середовища. Цей метод не потребує спеціального обладнання, проте забезпечує тривале зберігання культур.

2.4. 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 %.

- глибинний засів – культуру вносять у середовище (субстрат), яким заповнюються на 0,6 чи 1,5 – 1,8 м прямокутну ємність.

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

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, контролювати і отримувати 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 і 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 і 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**). У фазі відмирання в культурі нагромаджується значна кількість ендогенних ауторегуляторних факторів (зокрема ефірів), які впливають на чисельність популяції і перехід вегетативних клітин у стан спокою.

Періодичні культури вирощують на твердих або в рідких середовищах: у лабораторних умовах – у скляному посуді різного об'єму в термостатах, у промислових – у ферментерах (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 спеціального обладнання, стабілізація в 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 іншого – 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: хемостатним і турбідостатним.

Хемостатне культивування – проводять у хемостатах – апаратах, у які із постійною швидкістю надходить свіже поживне середовище і з такою ж швидкістю відбувається відтік культури. У хемостаті протягом тривалого періоду автоматично підтримується постійний урожай культури (вихід молодих клітин), швидкість росту і концентрація компонентів середовища. Хемостатне культивування дає можливість вивчати особливості обміну речовин культур-продуцентів, які залежать від швидкості росту культури або умов середовища. У такий 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, грамїцидину С – молекулярний кисень.

Хемостатне культивування має як практичне, так і теоретичне значення, адже дає змогу визначати важливі показники росту і вивчати фізіологічну реакцію культури на лімітуючі фактори, субстрати і їх суміші, що використовують різні культури тощо.

Турбідостатне культивування – проводять у турбідостатах – у середовищі підтримують постійний рівень біомаси мікроорганізмів, який реєструють за оптичною густиною спеціальним приладом, що обладнаний фотоелементом. На відміну від хемостата, ріст мікроорганізмів у турбідостаті здійснюється без зовнішнього лімітування, швидкість нагромадження біомаси визначається швидкістю 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.

Питання для самоконтролю:

1. Назвіть мікроорганізми-продуценти, що використовують у мікробіологічних виробництвах.
2. Які параметри визначають для характеристики росту мікроорганізмів?
3. Назвіть способи зберігання культур-продуцентів.
4. Охарактеризуйте способи культивування культур-продуцентів.
5. Назвіть основні фази росту періодичної культури.
6. Порівняйте хемостатний і турбідостатний способи культивування.
7. Обґрунтуйте переваги безперервного способу культивування.
8. Які параметри середовища контролюються при біотехнологічних процесах?