

ЛЕКЦІЯ 4

Тема: Мікробіологічне виробництво біологічно активних речовин і препаратів

План

1. Виробництво вітамінів, каротиноїдів і кормових препаратів вітамінів.
2. Виробництво ферментів і ферментних препаратів.

Основні терміни і поняття: біологічно активні речовини, антибіотики, вітаміни, вакцини, гормональні препарати, каротиноїди, кормові препарати, бактерицидна дія, бактериостатичний ефект, мутасинтез, ферменти, ферментна технологія.

Біотехнологічна промисловість умовно поділяється на великотонажне виробництво й виробництво продуктів тонкого синтезу. До тонкого синтезу відноситься, перш за все, виробництво антибіотиків, гормонів, медичних (очищених) ферментів, фармацевтичних препаратів, а також різноманітних біохімічних реактивів. До великотонажних виробництв відноситься виробництво етанолу, кормових і пекарських дріжджів, органічних кислот, органічних розчинників, полісахаридів і ферментів. До цієї групи можна приєднати одержання фруктозної патоки за допомогою мікробних ферментів.

1. Виробництво вітамінів, каротиноїдів і кормових препаратів вітамінів

Вітаміни – низькомолекулярні органічні речовини, які в низьких концентраціях мають високу біологічну дію. Джерелом вітамінів у природі є рослини і мікроорганізми. Препарати вітамінів у промисловості одержують двома способами:

- хімічним – переважну більшість препаратів вітамінів;
- мікробіологічним – препарати вітамінів **B₁₂** (ціанкобаламін), **B₂** (рибофлавін), ергостерин, каротиноїди.

Світове виробництво **вітаміну B₁₂** становить 9–11 т/рік, з них 6,5 т використовують для медичних цілей, а решту – для тваринництва. Основними продуцентами вітаміну B₁₂ є пропіоновокислі бактерії – *Propionibacterium freudenreichii* та *Pseudomonas denitrificans*.

Сировиною для культивування продуцентів **вітаміну B₁₂** є соєва та рибна мука, м'ясний та кукурудзяний екстракти, спирти – ізопропанол, метанол і пропандіол. Необхідними компонентами при виготовленні середовища є солі кобальту і амоній сульфат.

Схема виробництва препаратів **вітаміну B₁₂** при використанні пропіоновокислих бактерій:

1. Культивування здійснюється періодичним способом у анаеробних умовах. Обов'язково контролюють рН середовища (утворену кислоту нейтралізують, додаючи луги). Через 72 години в середовище культивування вносять попередник вітаміну B₁₂ – 5,6 диметилбензімідазол. Без внесення цієї сполуки бактерії синтезують кобінамід і псевдовітамін B₁₂ (азотистою основою є аденін), які не виявляють біологічної активності та не мають практичної цінності.

2. Через 72 години в клітинах нагромаджується B₁₂ і ферментацію завершують. Проводять сепарування біомаси і екстракцію вітаміну з неї водою, підкисленою до рН 4,5–5,0 при 85–90⁰С протягом 60 хв. Як стабілізатор додають розчин 0,25 % NaNO₂. За таких умов вітамін B₁₂ переходить у розчин.

3. Водний розчин охолоджують, доводять рН до 6,8–7,0 50 % NaOH. Для коагуляції білків до розчину додають Al₂(SO₄)₃ x 18H₂O і безводний FeCl₃, після чого суміш фільтрують через прес-фільтр.

4. Очищають розчин, використовуючи іонообмінні смоли СГ-1, після чого кобаламін елюють за допомогою розчину аміаку.

5. Далі проводять додаткове очищення водного розчину вітаміну органічними розчинниками, випарювання і очищення на колонці з Al_2O_3 , після чого кобаламін елюють водним ацетоном. При цьому вітамін відділяється від CN- і оксикобаламіну.

6. До водно-ацетонового розчину вітаміну додають ацетон і витримують 24–48 годин при температурі $+3-4^{\circ}C$. Кристали вітаміну відфільтровують, промивають сухим ацетоном та сірчанним ефіром і висушують у вакуумному ексикаторі над P_2O_5 .

Щоб запобігти руйнуванню вітаміну B_{12} всі операції проводять у затемненому приміщенні або при червоному світлі.

Кормовий препарат вітаміну B_{12} отримують шляхом термофільного метанового бродіння спиртової і ацетоно-бутилової барди (відходи ацетоно-бутилового виробництва). Для зброджування використовують змішану культуру термофільних матанутворюючих бактерій.

Схема виробництва кормового концентрату вітаміну B_{12}

1. Зброджування барди у залізобетонних ферментерах безперервним способом протягом року. Контролюють рівень жирних кислот і амонійного азоту.

2. До барди у ферментер додають 4 г/л кобальт хлориду і 5 г/л метанолу, які стимулюють синтез кобаламінів. Перед випарюванням до збродженого середовища додають хлоридну чи фосфатну кислоту (рН 6,3–6,5), оскільки вітамін B_{12} при нагріванні у лужному середовищі інактивується.

3. Метанову бражку концентрують і висушують на розпилюючій сушарці. Готовий препарат – порошок коричневого кольору з кислим смаком. Препарат фасують по 15 кг. Термін зберігання 12 місяців.

Рибофлавін (вітамін B_2) отримують за допомогою мікробіологічного синтезу, але основну частку виробництва становить хімічний синтез.

Промисловими продуцентами **вітаміну B_2** є дріжджоподібні гриби *Eremothecium ashbyii*, *Ashbyii gossupii*, дріжджі *Candida famata*, генно-інженерні штами бактерій *Bacillus subtilis*.

Сировина різна, залежно від продуцента. Якщо продуцентом є *Eremothecium ashbyii* – основним компонентом середовища у ферментері є кукурудзяна і соєва мука, кукурудзяний екстракт, буряковий цукор, технічний жир, KH_2PO_4 , $CaCO_3$, $NaCl$. Середовище стерилізують при $120-122^{\circ}C$ протягом години. Культуру культивують періодичним способом у аеробних умовах при температурі $28-30^{\circ}C$ до початку спороутворення. За таких умов утворюється 12 мг/мл вітаміну.

При використанні *Bacillus subtilis* – середовища включає мелясу, білково-вітамінний концентрат, або дріжджовий екстракт.

Рибофлавін використовують для лікування захворювання печінки і підшлункової залози, для вітамінізації деяких сортів хліба. Наявність вітаміну B_2 у кормах значно підвищує яйценосність курей, виживання курчат і ваговий приріст, тому препарати B_2 входять до складу комбікормів.

Кормовий препарат рибофлавіну – продуцент *Eremothecium ashbyii*. Ферментацію проводять глибинним способом у ферментерах за температури $28-30^{\circ}C$, інтенсивному перемішуванні та аерації.

Сировиною є глюкоза, мальтоза або кукурудзяна мука. Культуральну рідину після ферментації випарюють у вакуумі до 30–40 % сухих речовин. Сироп висушують у розпилюючій сушарці й отримують готовий продукт.

Ергостерин (вихідний продукт для одержання деяких стероїдних гормонів, жиророзчинного вітаміну D_2 , лікувальних та харчових препаратів).

Продуценти – *Saccharomyces cerevisiae*, гриби р. *Aspergillus*, *Penicillium*.

Культивування дріжджів ведуть при оптимальній температурі і гарній аерації (до 2 % кисню), середовище повинно містити надлишок джерела вуглецю (співвідношення C:N є важливим фактором). Ростучу культуру опромінюють УФ-променями (280–300 нм). Склад і вихід продуктів залежить від тривалості опромінення, температури, наявності добавок.

Каротиноїди – це основні харчові барвники. Вони інгібують розвиток ракових клітин шкіри, індукованих УФ-променями.

Продуценти – дріжджі *Rhodotorula gracilis* і гетероталічний гриб *Blakeslea trispora*.

Середовище для культивування містить кукурудзяно-соєву та рослинні олії, поверхнево-активні речовини і спеціальні стимулятори, які впливають на синтез того чи іншого виду каротиноїду.

Бета-каротин (провітамін А) виробляють в Україні з гриба *Blakeslea trispora* глибинним способом на середовищах із мелясою, соєвою олією, кукурудзяним екстрактом (схема отримання подібна до вітаміну В₂).

2. Виробництво ферментів і ферментних препаратів

Галузь промислової мікробіології, що займається одержанням ферментів і ферментних препаратів за допомогою мікроорганізмів називають біокаталізом або **ферментною технологією**. Інтенсивний розвиток технологій ферментації обумовлений тим, що ферменти є високоактивними і нетоксичними біокалізаторами, які широко використовуються в харчовій промисловості (пивоваріння і виноробство), медицині, хімічній промисловості, при виробництві тканин, миючих засобів, для очищення середовища від пестицидів, інших отруйних сполук тощо.

Джерелом отримання деяких ферментів є рослини (протеїнази) і тканини тварин (хімотрипсин, амілаза, колагеназа, ліпаза). Однак основним джерелом для виділення ферментів і ферментних препаратів є мікроорганізми. Це обумовлено високою інтенсивністю їх метаболізму, швидким приростом біомаси на дешевих (нехарчових) субстратах, окремі з яких є токсичними для інших організмів. Мікробіологічний метод одержання ферментів є більш перспективним, порівняно з хімічним синтезом. Його перевагами є:

- широке різноманіття ферментів, що синтезуються мікроорганізмами;
- можливість управління ферментними системами і складом препаратів, що виробляються;
- висока швидкість розмноження мікроорганізмів і можливість використання різноманітних дешевих субстратів.

У ферментній технології використовуються як дикі, так і мутантні штами мікроорганізмів, деякі з них представлені в табл. 5.1.

Крім високо очищених окремих ферментів, промисловість випускає ферментні препарати, які містять суміш ферментів. Ферментні препарати класифікують за основним компонентом (ферментом): амілолітичні містять амілази, протеолітичні – протеази, ліполітичні – ліпази тощо.

Ферменти, що утворюють мікроорганізми, бувають:

- **екзогенні** (екзоцелюлярні, позаклітинні) – можуть виділятися у культуральну рідину – протеази, амілази;
- **ендогенні** (ендоцелюлярні, внутрішньоклітинні) – містяться в середині клітин – глюкозоізомераза, інвертаза, глюкозооксидаза.

В Україні виробляють глюкозооксидазу, галактозооксидазу і каталазу.

Ферменти, що виробляють у промисловості, та їх продуценти

Ферменти	Продуценти
А-амілаза	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> ; <i>Bacillus</i> , <i>Streptococcus</i>
Протеїнази (лужна і кисла)	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> ; <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Clostridium</i>
Целюлази	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>T. roseum</i> ; <i>Cellulomonas</i> , <i>Clostridium</i>
Пектинази	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i> ; <i>Erwinia</i> ,
Глюкозоізомераза	<i>Bacillus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Streptomyces</i>
Інвертаза	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Streptomyces</i>
Ліпаза	<i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Clostridium</i>
Сичужний фермент	<i>Mucor</i> , <i>Bacillus</i>
Лактаза	<i>Saccharomyces</i> <i>Escherichia</i>
РНК-ази	<i>Aspergillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i>

Виробництво ферментів має деяку специфіку в порівнянні з іншими мікробіологічними процесами:

1. Потрібно ретельне дотримання стерильності, бо продукт, що утворився – фермент – на відміну від кислот, спиртів і антибіотиків не подавляє сторонню мікрофлору.
2. Біосинтез ряду ферментів пригнічується катаболітною репресією.
3. Для продукту представляють небезпеку протеази.

Ці особливості враховують при підборі поживних середовищ, селекції штамів і реалізації процесу.

Сировина для одержання ферментів є різною, залежно від продуцентів. У виробництві пектинолітичних ферментів використовують пектинвмісну сировину (буряковий жом), целюлолітичних – солону, висівки тощо.

У якості джерела вуглецю використовують кукурудзяне або пшеничне борошно, крохмаль, глюкозу, лактозу. Крохмаль є індуктором для α -амілази, а глюкоза репресором. Утворення глюкоізомерази інтенсивніше відбувається в середовищах із ксилозою або геміцелюлозою. У якості джерела азоту в середовищах для одержання ферментів застосовують соєве борошно або білкові ізоляти, рибне борошно, кукурудзяний екстракт, казеїн, солі амонію. Сухої речовини в таких середовищах повинно бути 10–20 %.

Процес виробництва ферментів і ферментних препаратів включає три стадії:

1. Отримання посівного матеріалу.
2. Отримання виробничої культури з використанням методів глибинного і/або поверхневого культивування.
3. Отримання з готової виробничої культури технічних чи очищених ферментних препаратів і ферментів.

Способи культивування:

- поверхневий (для грибів) – кюветний або в механічних установках;
- глибинний (для бактерій) – у ферментерах.

Більшість процесів одержання ферментів аеробні, тому потрібні біореактори з аераторами. Притік повітря $0,1-1,0 \text{ м}^3/\text{хв}$. При роботі з бактеріальними продуцентами потрібні механічні мішалки – $1-3 \text{ кВт/м}^3$, а при роботі з міцеліальними продуцентами – $4-6 \text{ кВт/м}^3$. рН нейтральний або слабкокислий.

Залежно від способів аерування і перемішування розрізняють три групи ферментерів:

- комбіновані з механічним перемішуванням і автоматичною аерацією;
- ежекційні (автоматичне перемішування і аерація різними способами);
- барботажні (перемішування за допомогою аерації).

Глибинне культивування продуцентів ферментів має переваги над поверхневим: скорочує виробничі площі, виключає важку ручну працю, поліпшує гігієну праці, спрощує механізацію й автоматизацію виробництва, робить можливим перехід на безперервне культивування, дає змогу раціональніше використовувати середовище, забезпечує більшу питому активність отриманих ферментів.

Незалежно від способу культивування (поверхневого чи глибинного), культура мікроорганізмів містить ряд баластних речовин. Виділення і очищення ферментів – процес дуже коштовний і трудомісткий. Тому в таких галузях господарства, як спиртова, шкіряна, сільськогосподарська використовують неочищені культури мікроорганізмів і/або культуральну рідину (амілазні, протеазні, целюлазні препарати). Однак у хлібопеченні, пивоварінні, виноробстві, м'ясопереробному, концентратному, текстильному виробництві, при виготовленні сирів, крохмалю, соків, хутра, у медицині використовують частково або повністю очищені ферменти або ферментні препарати.

Процес очищення культур після глибинного культивування починають з відділення культуральної рідини від твердої фази (використовують фільтри, центрифуги, сепаратори).

Очищення культур після поверхневого культивування починається із руйнування клітин, потім додають розчинник і отримують екстракт. Далі фільтрати, центрифугати й екстракти піддають концентруванню:

- вакуум-випарювання;
- ультрафільтрація (діаліз, електродіаліз, зворотній осмос);
- осадження органічними розчинниками (у спеціальних апаратах);
- висолювання – осадження висококонцентрованими розчинами солей (амоній сульфат, натрій сульфат, натрій хлорид).

Після концентрування проводять розділення і очищення ферментів методом адсорбції за допомогою спеціальних колонок, з яких фракціями збирають відповідні ферментні препарати. Потім фермент іммобілізують. Після адсорбції окремі фракції піддають висушуванню для отримання стабільного для зберігання ферментного препарату.

Важливо, щоб на всіх етапах розділення і очищення ферменти і ферментні препарати не втратили своєї активності, тобто були стабільними. Для стабілізації ферментів використовують наступні **способи стабілізації**:

- фізико-хімічні (висушування, зберігання при низьких температурах, зміна рН чи тиску);
- вплив хімічних агентів із метою ущільнення (гліцерину, вуглеводів, полісахаридів, іонів металів, детергентів, інгібіторів тощо);
- мікрокапсулювання і гранулювання.

Ферментні препарати, що випускаються в промислових масштабах, завжди стандартизовані. Для стандартизації ферментів і ферментних препаратів до них додають наповнювачі. Наповнювачем для амілолітичних і пектолітичних ферментів є крохмаль, для інших – сахароза, глюкоза, лактоза, желатина.

Питання для самоконтролю:

1. Як здійснюється мікробіологічний синтез вітамінів B₂ і B₁₂?
2. Що таке кормові препарати вітамінів і як їх отримують?
3. Які ферменти одержують за допомогою мікробного синтезу?
4. Охарактеризуйте основні стадії виробництва ферментів.