

Державний вищий навчальний заклад  
«Запорізький національний університет»  
Міністерства освіти і науки України

Н.І. Костюченко

## **ПРОМИСЛОВА МІКРОБІОЛОГІЯ**

**Навчальний посібник  
для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра  
напряму підготовки «Екологія, охорона навколишнього середовища та  
збалансоване природокористування»**

Затверджено  
вченою радою ЗНУ  
протокол №    від    р.

Запоріжжя  
2016

УДК 504.062 (075.8)  
ББК 20.18 я 73  
К 727

Костюченко Н.І. Промислова мікробіологія: навчальний посібник для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра напряму підготовки «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування» / Н.І. Костюченко. – Запоріжжя: ЗНУ, 2016. – 104 с.

Курс «Промислова мікробіологія» є необхідною складовою підготовки кваліфікованих фахівців з галузі знань «Природничі науки».

У посібнику висвітлені основні питання промислової мікробіології. Коротко розглянуто історію становлення і розвитку промислової мікробіології. Значну увагу приділено описові методів селекції промислових штамів мікроорганізмів, способів їх культивування та зберігання. Детально висвітлено технологічні схеми виробництва біологічно активних речовин, амінокислот, органічних кислот і розчинників, етанолу, харчових продуктів і напоїв за допомогою мікроорганізмів. Висвітлено участь мікроорганізмів у очищенні стічних вод.

Посібник містить теоретичні відомості, перелік питань для самоконтролю, тестові завдання для поточного контролю знань студентів за розділами курсу «Промислова мікробіологія».

Для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра напряму підготовки «Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування».

Рецензент *О.М. Войтович*, кандидат біологічних наук, доцент

Відповідальний за випуск *О.Ф. Рильський*, професор, завідувач кафедри загальної та прикладної екології і зоології

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП.....</b>	<b>5</b>
<b>Тематичний розділ 1. Наукові основи промислової мікробіології.....</b>	<b>7</b>
<b>Тема 1 Промислова мікробіологія, етапи становлення, завдання та перспективи.....</b>	<b>7</b>
1.1. Промислова мікробіологія як складова біотехнології.....	7
1.2. Зв'язок біотехнології з іншими науками.....	8
1.3. Історія розвитку та етапи становлення біотехнології.....	9
1.4. Розвиток промислової мікробіології в Україні в XX столітті.....	14
1.5. Основні галузі застосування біотехнології.....	15
1.6. Основні завдання та перспективи біотехнології.....	16
<b>Тема 2 Загальна характеристика мікроорганізмів і способи їх культивування.....</b>	<b>18</b>
2.1. Продукти і мікроорганізми-продуценти, що їх утворюють.....	19
2.2. Особливості і параметри росту мікроорганізмів.....	21
2.3. Отримання і способи зберігання культур-продуцентів.....	22
2.3. Способи культивування культур-продуцентів.....	24
<b>Тема 3 Наукові основи промислової мікробіології.....</b>	<b>29</b>
3.1. Генетична інженерія як наукова основа для отримання корисних штамів мікроорганізмів.....	29
3.2. Методи генної інженерії.....	29
3.3. Методи селекції промислових штамів мікроорганізмів.....	32
3.4. Конструювання біотехнологічних штамів мікроорганізмів.....	35
<b>Тема 4. Основні етапи біотехнологічного виробництва.....</b>	<b>39</b>
4.1. Підготовчий (передферментаційний) етап.....	39
4.2. Виробничий (ферментаційний) етап біотехнологічного процесу.....	40
4.3. Заклучний (постферментаційний) етап біотехнологічного процесу.....	43
<b>Тематичний розділ 2. Мікробіологічне виробництво біологічно активних речовин і продуктів харчування.....</b>	<b>49</b>
<b>Тема 5. Мікробіологічне виробництво біологічно активних речовин і препаратів.....</b>	<b>49</b>
5.1. Виробництво вітамінів, каротиноїдів і кормових препаратів вітамінів.....	49
5.2. Виробництво ферментів і ферментних препаратів.....	52
5.3. Отримання антибіотиків.....	55
5.4. Використання мікроорганізмів для виробництва гормонів і лікарських препаратів.....	61
<b>Тема 6. Промислове виробництво амінокислот, органічних кислот .....</b>	<b>65</b>
6.1. Біосинтез амінокислот.....	65

6.2. Промислове виробництво органічних кислот.....	69
<b>Тема 7. Біотехнологія отримання спирту і розчинників.....</b>	<b>76</b>
7.1. Виробництво етилового спирту.....	76
7.2. Використання мікроорганізмів для отримання розчинників.....	80
<b>Тема 8. Використання мікроорганізмів для виготовлення продуктів харчування .....</b>	<b>82</b>
8.1. Виробництво пива і вина.....	82
8.2. Виробництво хлібного квасу.....	84
8.3. Хлібопечення.....	84
8.4. Виробництво кисломолочних продуктів.....	85
8.5. Квашення овочів.....	88
<b>Тема 9. Біологічні методи очищення стічних вод.....</b>	<b>91</b>
9.1. Очисні споруди, принципи та методи контролю їх роботи.....	91
9.2. Екстенсивні способи очищення стічних вод.....	92
9.3. Інтенсивні способи очищення стічних вод.....	93
<b>РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....</b>	<b>102</b>

## ВСТУП

Сучасний етап науково-технічного прогресу характеризується революційними змінами в біології, яка вийшла на молекулярний і субмолекулярний рівень і стає лідером природничих наук. Такі актуальні проблеми, як дефіцит чистої води і продуктів харчування, забруднення довкілля, скорочення сировинних і енергетичних ресурсів, необхідність новітніх методів діагностики і лікування, не можуть бути вирішені традиційними методами.

Подальший розвиток суспільства може бути забезпечений тільки на основі інтеграції міждисциплінарних наукових досліджень, спрямованих на розвиток новітніх технологій, що дозволяють вирішувати екологічні, економічні і соціальні проблеми людства. Значна роль у вирішенні комплексу цих проблем відводиться біотехнології, у рамках якої здійснюється цільове використання біологічних систем і процесів у різних сферах людської діяльності.

Збільшення наукової інформації визначає потребу в сучасних навчальних посібниках і підручниках, їх постійному оновленні.

У посібнику висвітлені основні питання сучасної промислової мікробіології за програмою підготовки студентів-екологів.

*Метою* курсу є формування у студентів системи знань, умінь і навичок з промислової мікробіології, а саме: ознайомити студентів із основними досягненнями в області фундаментальних досліджень, на яких базуються різні біотехнологічні виробництва; сформувати знання про біотехнологічні процеси, що відбуваються за допомогою промислових мікроорганізмів, а також перспективи їх розвитку.

*Завданнями* вивчення дисципліни «Промислова мікробіологія» є формування знань про основні принципи організації біотехнологічних виробництв і процесів, що мають значення для практичного використання; методи селекції і отримання нових штамів мікроорганізмів з корисними властивостями, а також методи їх культивування та зберігання; одержання за допомогою мікроорганізмів біологічно активних речовин і біопрепаратів, продуктів харчування.

Згідно з вимогами освітньо-професійної програми студенти повинні **знати:**

- теоретично-методологічні основи сучасної промислової мікробіології;
- основні етапи становлення промислової мікробіології;
- галузі застосовування промислової мікробіології;
- загальну характеристику мікроорганізмів-продуцентів, методи їх виділення, селекції, культивування та зберігання;
- основні етапи біотехнологічних виробництв;
- методи отримання біологічно активних речовин;
- технології бродильних виробництв,
- технології виробництва харчових продуктів,

- біологічні методи очищення стічних вод.

***вміти:***

- застосовувати на практиці теоретично-методологічні основи сучасної біотехнології;
- користуватися вивченими схемами при виборі необхідних біотехнологій на практиці;
- визначати методи очистки навколишнього середовища з використанням біотехнологічних процесів;
- використовувати на практиці технології бродильних виробництв для отримання продуктів харчування і напоїв.

Курс складається з 2-х тематичних розділів:

***Тематичний розділ 1.*** Наукові основи промислової мікробіології.

***Тематичний розділ 2.*** Мікробіологічне виробництво біологічно активних речовин і продуктів харчування.

Посібник розроблено з метою організації аудиторної і самостійної роботи студентів, а також контролю рівня засвоєних знань. Матеріал подано в обсязі, який визначений навчальною програмою курсу «Промислова мікробіологія».

## Тематичний розділ 1. Наукові основи промислової мікробіології

### Тема 1. Промислова мікробіологія: етапи становлення, завдання та перспективи

**Мета:** сформулювати уявлення про промислову мікробіологію, як складову біотехнології, основні завдання та перспективи промислової мікробіології, її зв'язок з іншими науками.

#### План

1. Промислова мікробіологія як складова біотехнології.
2. Зв'язок біотехнології з іншими науками.
3. Історія становлення і етапи розвитку промислової мікробіології.
4. Основні галузі застосування промислової мікробіології.
5. Основні завдання та перспективи біотехнології.

**Основні терміни і поняття:** біотехнологія, промислова мікробіологія, мікробіологічні виробництва.

#### 1.1. Промислова мікробіологія як складова біотехнології

Сучасний етап науково-технічного прогресу характеризується революційними змінами в біології, яка стає лідером природознавства. Біологія вийшла на молекулярний і субклітинний рівень, у ній інтенсивно застосовуються методи суміжних наук, системні підходи. Бурхливий розвиток наук біологічного профілю, розширення практичної сфери їх застосування обумовлено також соціально-економічними потребами суспільства. Такі актуальні проблеми, як дефіцит чистої води, сировинних та енергетичних ресурсів, потреба в нових методах діагностики і лікування, не можуть бути вирішені традиційними методами. Наразі існує гостра необхідність у розробці і впровадженні принципово нових методів і технологій.

Уперше термін «біотехнологія» було запропоновано в 1917 р. угорським інженером К. Еріке, який запропонував процес великомасштабного промислового вирощування свиней з використанням у якості кормів цукрового буряку. При цьому він розглядав перетворення сировини (буряку) у цільовий продукт (свинину) як ряд біотехнологічних етапів. Цей процес було названо *біотехнологією*, оскільки цільовий продукт отримано в результаті життєдіяльності біологічної системи.

Друге народження і популярність цей термін набув у 1961 році після того як шведський мікробіолог Карл Герен Хеген запропонував змінити назву наукового журналу «Журнал мікробіологічної і хімічної інженерії і технології» на «Біотехнологія і Біоінженерія». Оскільки цей журнал публікував роботи з прикладної мікробіології і промислової ферментації, то з цього моменту біотехнологія була пов'язана з дослідженнями в області промислового

виробництва товарів та послуг за участі живих організмів, біологічних систем і процесів.

Таким чином, основою нового наукового напрямку була інтеграція мікробіологічних процесів і хімічної інженерії, що сприяло розвитку великомасштабного виробництва продуктів біологічного походження.

Ефективність виробництва залежить від керування продуктивністю мікробіологічних процесів, що можливо за умов пізнання молекулярно-біологічних процесів мікробної клітини.

Завдяки інтенсивному розвитку молекулярної біології і біохімії прокаріотичних клітин стали відомими основні етапи синтезу білка в клітині, механізми синтезу РНК на молекулах ДНК, механізми реплікації і кон'югації клітин бактерій. Було виділено і охарактеризовано плазмиди, здійснено хімічних синтез генів і сформульовано уявлення про механізм мутагенезу.

Новітні біологічні технології дозволяють здійснювати реконструкцію генетичного апарату мікроорганізмів, яка направлена на «надпродукцію» тих або інших цінних біологічних речовин або синтез нових продуктів, що є нехарактерними для даного організму (*наприклад*, інсулін, що продукується клітинами *E. coli* тощо).

У 1983 р. на міжнародному біотехнологічному Конгресі в Братиславі було прийнято таке визначення біотехнології:

**Біотехнологія** – це наука, що розробляє наукові основи великомасштабної реалізації процесів отримання за допомогою каталізаторів різноманітних продуктів і захист навколишнього середовища. У цьому визначенні з'явився важливий аспект для біотехнології – захист оточуючого середовища.

У 1984 р. Європейською Федерацією Біотехнологів було запропоновано наступне визначення біотехнології:

**Біотехнологія** – це інтегральне використання біохімії, мікробіології та інженерних наук у цілях промислової реалізації здатностей мікроорганізмів, культур тканин клітин і їх частин.

**Біотехнологія** – це свідоме виробництво необхідних людині продуктів і матеріалів за допомогою біологічних об'єктів і процесів.

Часто до біотехнології відносять дослідження рекомбінантних ДНК і нові процеси, створені при використанні генної інженерії.

**Біотехнологія** (за Ю.А. Овчинниковим) – це комплексна багатопрофільна галузь науково-технічного прогресу, що включає мікробіологічний синтез у його широкому розумінні, генетичну, білкову і клітинну інженерію, ензимологію.

## 1.2. Зв'язок біотехнології з іншими науками

За своїм генезисом науково-технічні галузі можна поділити *на три групи*:



1. Галузі, що виникли на базі вдосконалення традиційних емпіричних виробництв (ливарне виробництво, обробка металу різанням). Розвиток цих галузей завжди відбувається еволюційно.

2. Нові галузі які виникли в результаті впровадження у виробництво фундаментальних наукових знань. Розвиток їх, як правило, революційний і відбувається в результаті розширення протиріччя між науковим потенціалом і станом техніки. Вони не можуть виникати на базі попереднього виробничого досвіду або емпіричним шляхом. *Наприклад:* атомна енергетика, квантова електроніка, радіоелектроніка і обчислювальна техніка. Природні науки входять до цих галузей в значенні суттєвого елемента.

3. Галузі, що виникли на основі традиційних виробництв у результаті корінного перевороту технології, викликаного взаємодією фундаментальних природних наук і технічних наук.

Біотехнологія відноситься до третього типу. Вона виникла в надрах мікробіології на базі традиційних бродильних виробництв.

#### **Складові біотехнології:**

1. Генна інженерія (технологія рекомбінації ДНК).
2. Біокаталіз (створення ферментів за допомогою нових принципів виділення, іммобілізації та стабілізації ферментів).
3. Імунологія (одержання моноклональних антитіл).
4. Технологія ферментації (технологія переробки відходів і технологія виробництва харчових продуктів).
5. Біоелектрохімія (технології з очистки виробничих стічних вод).

#### **Науково-технічні напрямки, інтегровані з біотехнологією:**

1. *Фундаментальні біологічні дослідження:* генетика; біохімія; фізіологія, імунологія, біологія клітини, молекулярна біологія, мікробіологія, біофізика, альгологія, екологія.
2. *Галузеві дослідження:* медичні науки, сільськогосподарські науки; екологічні науки, суспільні науки, фармацевтичні науки.
3. *Технічні науки і технології:* харчові технології, хімічні технології, технічні науки, кібернетика.
4. *Агропромислові та енергетичні проблеми.*
5. *Охорона навколишнього середовища.*

### **1.3. Історія становлення та етапи розвитку промислової мікробіології**

Питання щодо формування біотехнології трактують неоднозначно: на думку одних вчених (Овчинніков, Баєв, Скрябін), вважається правомірним віднести до сфери біотехнології давні процеси бродіння, включно отримання спирту, силосування; на думку інших (Аїба, Хемфі, Мілліс), умовно датою появи біотехнології можна вважати присудження в 1947 р. компанії «Марк Кемікал Компані» премії Мак-Гро – Хілла за досягнення в області біохімічної технології. Нарешті, існує думка, що початок розвитку біотехнології слід віднести до 70-х років ХХ ст. Вочевидь, правомірно віднести виникнення

сучасної біотехнології, яка почала своє формування на базі існуючих галузей мікробіологічної промисловості, до початку 50-х років XX ст., а весь попередній етап вважати передісторією формування біотехнології.

Передісторію формування біотехнології можна розділити на ряд етапів:

1. Поява емпіричних технологій у VI-му тисячолітті до н.е.
2. Зародження природничих наук у XV – XVII ст.
3. Формування мікробіологічних виробництв і початок взаємодії науки і мікробіологічних виробництв наприкінці XIX – 10-х роках XX ст.
4. Створення науково-технічних передумов для виникнення сучасної біотехнології (10-і – кінець 40-х років XX ст.).

Першими мікробіологічними процесами, що були використані на практиці, були бродильні виробництва: бродіння використовували при отриманні вина, пива, квасу, хліба, кисломолочних продуктів. З III- IV тисячоліття відомі процеси пектинового бродіння, що лежать в основі вимочування прядильних рослин (льону, конопель). З давнини людство зустрічалось із негативними наслідками діяльності мікроорганізмів (псування продуктів харчування, інфекційні захворювання тварин і людини). Наслідком цього були емпіричні спроби розробки методів і заходів боротьби з цими явищами – методи консервування продуктів.

**У другій половині XV ст.** починається розвиток сучасного природознавства. На становлення і розвиток біології суттєвий вплив здійснили досягнення хімії, яка в цей період з описувальної перетворилась у аналітичну. Відбулися зміни уявлень щодо суті процесів бродіння; з'явився термін «ферментація», а процес бродіння почали пов'язувати з присутністю дріжджів і ферментів. У XVI – XVII ст. спочатку у Франції, а потім і в інших країнах для розпушування тіста почали застосовувати дріжджі спиртових виробництв. У Європі почали видобувати мідь у процесах бактеріального вилугування.

У другій половині XVIII ст. була доведена здатність одних речовин розкладати інші. Це обумовило розвиток експериментального вивчення унікальної здатності ферментів до каталізу специфічних хімічних реакцій. Таким чином, розвиток описувальної мікробіології і вивчення хімічних перетворень стали підґрунтям для становлення мікробіології і біохімії.

**У XIX ст.** з розвитком хімічних наук були закладені основи органічної хімії. У цей період були відкриті більшість органічних кислот, гліцерин, холестерин, глюкоза, перші амінокислоти, синтез сечовини. Для зародження ензимології велике значення мало вивчення процесів гідролізу полісахаридів.

Значний внесок у вивчення процесів бродіння внесли французькі вчені А. Лавуазьє і Луї Пастер.

**А. Лавуазьє** (хімік) близько підійшов до розуміння ролі дріжджів у процесах спиртового бродіння (з цукру).

Великий вплив на формування наукових основ мікробіологічних виробництв мали праці **Луї Пастера** (1822 – 1895), який на прохання уряду Франції вивчав причини порушення технологічних процесів у ряді виробництв. Л. Пастер зробив ряд фундаментальних відкриттів, які заклали фундамент сучасної технічної мікробіології. Саме його вважають засновником

промислової мікробіології. Він довів, що хвороби, псування продуктів, бродіння і гниття викликають мікроорганізми і створив теорію про екзогенність потрапляння цих організмів у середовище. Цим було доведена неспроможність теорії самозародження мікроорганізмів, яка панувала на той період. Праці Луї Пастера заклали наукові основи виноробства, пивоваріння, виробництва спирту й оцту, боротьби з інфекційними хворобами.

У 1857 р. Л. Пастер відкрив дріжджі, що викликають спиртове бродіння. Він довів, що утворення молочної кислоти із цукру може протікати тільки за наявності живих дріжджів і є результатом особливої форми їхньої життєдіяльності без доступу повітря. Пізніше він відкрив маслянокисле бродіння і довів, що збудниками маслянокислого бродіння є анаеробні бактерії (рухливі циліндричні прямі палички із закругленими кінцями). Саме Луї Пастер увів у біологію терміни **«аеробний»** і **«анаеробний»** для позначення життя за наявності кисню та без нього.

Досліджуючи бродіння, він довів, що різні його види – спиртове, молочнокисле, маслянокисле – є результатом діяльності певних груп мікроорганізмів, і описав окремих збудників цих процесів, тобто ним було встановлено специфічність мікроорганізмів.

Праці Луї Пастера дали поштовх для **розвитку мікробіологічних виробництв**, у основі яких лежать процеси бродіння. Луї Пастера на прохання французьких виноробів вивчав процеси скисання вина та пива. У 1866 р. він опублікував працю «Дослідження вина», де довів, що псування вина спричинене діяльністю оцтовокислих бактерій. Для боротьби із «хворобами» вина він запропонував прогрівати вино до 60–70<sup>0</sup>С після того як воно розлите у пляшки. Продукт не втрачав якості, а бактерії гинули. Цей метод дістав назву **«пастеризація»**, і його широко застосовують для стерилізації харчових продуктів.

Значним досягненням цього періоду була розробка метода чистих культур, а також удосконалення середовищ для виділення і культивування мікроорганізмів. Чисті культури стали використовувати в мікробіологічних виробництвах.

**Роберт Кох** (1843 – 1910) – німецьких мікробіолог, розробив технології мікробіологічних виробництв. Він розробив методи посіву на щільні середовища та виділення культур мікроорганізмів у чисту культуру; увів у практику забарвлення мікробів аніліновими фарбниками, імерсійну систему мікроскопування і мікрофотографію.

Велике значення мали роботи з вивчення мікробного антагонізму й використання його в медицині. **І.І. Мечниковим** було створено вчення про антагонізм мікробів і науково обґрунтовано рекомендації для його практичного застосування.

У цей період активно вивчалися процеси азотфіксації. Німецькі вчені Гельригель і Вильфарт установили біологічну природу процесу фіксації азоту бобовими рослинами, а М. Бейеринк виділив чисту культуру бульбочкових бактерій і довів їх присутність у ризосфері рослин. Виробництво бактерійних препаратів бере початок з досліджень учених С. М. Виноградського,

М. Бейерінка, В. Л. Омелянського, які вивчали мікроорганізми ґрунту і їхнє практичне застосування.

**М. Бейерінк** – голандець – вивчав ґрунтові мікроорганізми, відкрив аеробний азотфіксатор *Az. chroococcum*.

**С. М. Виноградський** (1856 – 1953) запропонував створювати специфічні (селективні) умови, які дають можливість переважно розвиватися певній групі мікроорганізмів. Він виділив з ґрунту бактерій хемолітотрофної групи (бактерії, які в якості єдиного джерела вуглецю використовують  $\text{CO}_2$ , а енергію дістають у результаті окислення неорганічних сполук: відновлених сполук азоту, заліза, сірки, молекулярного водню). С. М. Виноградський відкрив здатність деяких бактерій засвоювати (фіксувати) атмосферний азот, виділив з ґрунту анаеробного азотфіксатора *Clostridium pasteurianum*.

**В. Л. Омелянський** (1867 – 1928) – учень і співробітник С. М. Виноградського. Вивчав процеси нітрифікації, розкладу целюлози. Написав перший підручник «Основи мікробіології» та практикум з мікробіології. В. Л. Омелянський разом із В. А. Ніколаєвим і Г. Л. Селібер розробили наукові основи бродіння тіста.

Роботами С. М. Виноградського, В. Л. Омелянського, Б. Л. Ісаченка були закладені основи геологічної мікробіології, почалося вивчення ролі мікроорганізмів у перетворенні сірки, заліза, кальцію тощо.

**Б. Л. Ісаченко** (1871 – 1948) – автор численних праць про роль мікроорганізмів у кругообігу речовин у водоймах, що мало значення для створення мікробоценозів очисних споруд.

**Л. Й. Рубенчик** (1896 – 1988) – український вчений, досліджував участь мікроорганізмів у кругообігу сірки, зокрема сульфатредуючих бактерій, як основних продуцентів сірководню у водоймах і ґрунті. Його праці заклали фундамент для розробки процесів біосорбції та осадження металів із розчинних концентратів.

У 70 – 80 рр. XIX ст. були закладені основи культивування рослинних клітин і тваринних тканин. Після робіт Шванна і Вірхова, які назвали клітину елементарним організмом, розпочалися експерименти зі збереження життєздатності клітин і тканин у специфічних умовах і середовищах.

У 1865 р. **Г. Мендель** зробив доповідь Товариству дослідників природи про закономірності передачі спадкових ознак. На початку XX ст. були введені терміни «мутації», «ген» виникла гіпотеза Сеттона-Бовері про те, що хромосоми є матеріальними носіями ознак спадковості. Російським вченим цитологом Навашиным було розкрито особливості структури хромосом і закладено основи хромосомної теорії спадковості.

**Останній період ери передісторії сучасної біотехнології** (10-і – 40-і роки XX ст.) умовно можна розділити на два етапи. На *першому етапі*, на його початку, відбувалось удосконалення технології існуючих виробництв, а потім на базі успіхів мікробіології, біохімії та інших наук, у результаті принципового вдосконалення апаратури, технологій виникла основа для організації новітніх виробництв. У цей період почали виготовляти екологічно чисті біодобрива, біологічні препарати для боротьби зі шкідниками сільського господарства,

виникли виробництва деяких цільових продуктів (органічних розчинників, спиртів), почалися промислові випробування біотехнологічних процесів переробки і використання рослинних відходів.

Саме ХХ століття характеризується великими відкриттями в галузі мікробіологічних виробництв.

Впровадження безперервного способу культивування мікроорганізмів пов'язане з російським вченим, спеціалістом з виноробства і бродильних виробництв, **С. В. Лебедєвим**, який розробив його в 1915 р. для культивування дріжджів.

Автор теорії фізіологічної двофазності бродіння і дослідник динаміки процесів **В. М. Шапошніков** (1884 – 1968) описав фізіологію молочнокислих, оцтовокислих, маслянокислих ацетобутилових бактерій, що дало можливість суттєво поліпшити технології одержання продуктів їхньої життєдіяльності. На основі його робіт було налагоджено виробництво молочної і масляної кислот, ацетону і бутилового спирту. У 1923 р. було налагоджено виробництво лимонної, а далі глюконової та інших органічних кислот.

**В. С. Буткевич** (1872 – 1942) – розробив мікробіологічний спосіб отримання лимонної кислоти за допомогою грибів. Роботи про роль мікроорганізмів в утворенні залізо-марганцевих руд.

**П. Лінднер** (у Німеччині) під час Першої світової війни розробив схему виробництва гліцерину за допомогою гриба *Endomycetes vernalis*.

**Х. Вайсман** (Англія) – розробив технологію отримання ацетону за допомогою бактерій.

*Другий етап* цього періоду пов'язаний із біотехнологічними методами отримання складних речовин – антибіотиків, ферментів, вітамінів.

Досягненням ХХ ст., яке мало першорядне значення для медицини, було відкриття антибіотиків.

**А. Флемінг** (1888 – 1955) – англійський мікробіолог – у 1929 р. відкрив пеніцилін і застосував його в якості антисептика при лікуванні гнійних ран. У 1940 р. **А. Флорі** і **Е. Чейн** (Оксфорд, Англія) одержали перші чисті препарати пеніциліну і довели їх терапевтичну активність, налагоджено виробництво (спільна Нобелівська премія, 1945 р.). У Радянському Союзі пеніцилін вперше відкрили академік **З. В. Єрмольєва** і **Т. І. Бalezіна** в 1942 р. з плісеневого гриба *Penicillium crustosum*. У 1940 – 1944 роках **З. Ваксман** виділив культуру стрептоміцетів – продуцентів стрептоміцину, який виявився дуже цінним для лікування туберкульозу. Російськими вченими Г.Ф. Гаузе, З. В. Єрмольєвою, М.О. Красильниковим були відкриті антибіотики граміцидин С, альбоміцин, бацитрацин, екмолін та ін. Пізніше були розроблені технології виробництва цих та інших антибіотиків у промислових масштабах.

**Ера новітніх біотехнологічних процесів**, яка виникла впродовж останніх 25–35 років, пов'язана з використанням іммобілізованих ферментів і клітинних органел, а також заснована на методах рекомбінантних ДНК. Розвиток генетичної і клітинної інженерії сприяє тому, що біотехнологія

невпинно впроваджується у нові галузі виробництва та різні сфери діяльності людини (виробництво антитіл, інтерферону, протипухлинних хіміопрепаратів).

Виникнення генетичної інженерії умовно відносять до 1972 р., коли в США Бергом була отримана перша рекомбінантна молекула ДНК. Розвиток генетичної інженерії створює можливість конструювання рекомбінантних ДНК і цілеспрямовано створювати штучні генетичні програми. Це дає змогу організувати отримання багатьох важливих препаратів, а також отримання суперштамів-деградаторів промислових токсикантів.

#### **1.4. Розвиток промислової мікробіології в Україні в XX столітті**

Розвиток промислової мікробіології в Україні у XX ст. пов'язаний із вченими Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного, що був створений 31 травня 1928 року.

**Д. К. Заболотний** (1866 – 1929) – академік, Президент Всеукраїнської академії наук України, засновник Інституту мікробіології і вірусології. У різні роки вченими цього інституту створено антибіотики із рослинної сировини, які знайшли застосування в медицині та рослинництві (В.Г. Дроботько, К.Г. Бельтюкова, Б.Ю. Айзенман та ін.).

**В. В. Смірнов** – вивчав механізми антибіотикоутворення у багатьох мікроорганізмів різних систематичних груп. За його участю було одержано антистафілококовий антибіотик батумін і розроблено препарат «Діастаф» для діагностики стафілококових інфекцій.

**Є. І. Квасников** – створення і впровадження біотехнологію безперервного розмноження дріжджів в умовах резервуарного способу виготовлення шампанських вин.

**М. М. Підоплічко** – проводив дослідження процесів біосинтезу біологічно активних речовин мікроміцетами. Знайдено новий вид грибів (*Penicillium vitale*), на основі якого вченими **В. Й. Білай** і **О. О. Нікольською** розроблено технологію одержання ферментів глюкозооксидази й каталази.

**Т. С. Кириленко** та ін. знайдено мікроміцети-продуценти альфа-галактооксидази, пероксидази, поліфенолоксидази. Вивчено гідролітичні ферменти, зокрема целюлази, протеолітичні, пектолітичні та ліполітичні ферменти.

**К. Г. Бельтюковою** проводились дослідження бактерійних хвороб рослин і їх збудників та були винайдені нові методи боротьби зі шкідниками.

Співробітниками інституту інтенсивно вивчались аеробні спороутворювальні бактерії для створення протипухлинних засобів і пробіотиків (Д. Г. Затула). Було створено препарати: біоспорин, бактерин, фітоспорин, гінеспорин, субалін (В.В. Смірнов). Також створено пробіотики й кисломолочні продукти на основі молочнокислих бактерій (Є.І. Квасніков, В. С. Підгорський, Н. К. Коваленко).

Досліджено азотфіксувальні бактерії з метою їх використання для підвищення врожайності бобових, овочевих і технічних культур (К. І. Андреюк,

А. Ф. Антипчук) і створено ефективні гранульовані препарати цих мікроорганізмів (І. К. Курдиш).

Дослідження біології мікроорганізмів, що дезактивують високотоксичні катіони важких металів стічних вод (Є.І. Квасніков, В.С. Підгорський), ґрунтів (К.І. Андріюк, Г.О. Іутинська), очищують ґрунти і води від нафтозабруднень.

**Г. М. Шавловський** (1925 – 1996) – професор кафедри мікробіології Львівського університету зі співробітниками і учнями вивчав біосинтез рибофлавіну дріжджами р. *Pichia*.

### 1.5. Основні галузі застосування промислової мікробіології

Сучасна промислова мікробіологія знаходить застосування в різних галузях господарства, наукових дослідженнях, медицині, побуті, тощо, а також у вирішенні екологічних проблем і оптимізації довкілля.

1. **Медицина, охорона здоров'я, фармакологія** – використання в медичній практиці біологічно активних речовин і препаратів, таких як антибіотики, ферменти, амінокислоти, кровозамінники, алкалоїди, нуклеотиди, імунорегуляторні препарати, протиракові та противірусні препарати, нові вакцини, гормональні препарати (інсулін, гормон росту), моноклональні антитіла для діагностики, дослідження природи раку і процесів старіння людського організму, продукти для дієтичного харчування.
2. **Отримання хімічних речовин** – етилен, пропілен, бутилен, окислені вуглеводи, органічні кислоти, терпени, феноли, акрилати, полімери, ферменти, продукти тонкого органічного синтезу, полісахариди.
3. **Тваринництво** – удосконалення кормових раціонів (виробництво білка, амінокислот, вітамінів, кормових антибіотиків, ферментів, заквасок (для силосування); виробництво ветеринарних препаратів (антибіотики, вакцини тощо), гормонів росту; створення високопродуктивних порід, пересадка запліднених яйцеклітин та ембріонів, маніпуляції з ембріонами.
4. **Рослинництво** – біораціональні пестициди, бактеріальні добрива, гібереліни; виробництво безвірусного посадкового матеріалу; створення високопродуктивних сортів і гібридів стійких до посухи, заморозків, засоленості ґрунту.
5. **Рибне господарство** – кормовий білок, ферменти, антибіотики.
6. **Харчова промисловість** – білок, амінокислоти, замінювачі цукру (аспартат, глюкозо-фруктозний сироп), полісахариди, органічні кислоти, нуклеотиди, ліпіди, переробка харчових продуктів.
7. **Енергетика і видобуток корисних копалин** – виробництво спиртів, біогазу, жирних кислот, аліфатичних вуглеводнів, водню, урану, а також інтенсифікація видобування нафти, газу, вугілля, штучний фотосинтез, біометалургія, добування сірки.
8. **Важка промисловість** – покращення технічних характеристик каучуку, бетонних, цементних, гіпсових розчинів, отримання

моторного палива, антикорозійних присадок, змазки для прокатки чорних і кольорових металів, технічного білка і ліпідів.

9. **Легка промисловість** – покращення технології переробки шкіри, виробництво технічної сировини, шерсті, паперу, парфумерно-косметичних виробів, отримання біополімерів, штучної шкіри і шерсті тощо.
10. **Біoeлектроніка, космонавтика, екологія** – створення замкнених систем життєзабезпечення в космосі, біосенсорів; утилізація сільськогосподарських і побутових відходів; виробництво нешкідливих пестицидів, полімерів, які легко руйнуються; біодеградація токсичних речовин (пестицидів, героїцидів, нафти), що важко розкладаються; створення замкнених технологічних циклів.
11. **Наукові дослідження** – генно-інженерні і молекулярно-біологічні дослідження (ферменти рестрикції ДНК, ДНК і РНК-полімерази, ДНК і РНК-лігази, нуклеїнові кислоти, нуклеотиди тощо), медичні дослідження (засоби діагностики, реактиви), хімія (сенсори, реактиви).

### 1.6. Основні завдання і перспективи біотехнології

За прогнозами фахівців до 2025 р. населення нашої планети становитиме біля 9 млрд. осіб. Ріст населення призведе до значного зростання потреб у продуктах харчування і енергетичних ресурсів, підвищення попиту і вимог до медичного обслуговування. Це потребує зростання промислового і аграрного виробництва. Так, для забезпечення потреб людства в продуктах харчування, воді, та енергії до 2025 р. на рівні сучасних європейських стандартів необхідно збільшити масштаби виробництва в 10 разів порівняно з теперішнім рівнем.

Однак, зростання виробництва за існуючих технологій неминуче призведе до біосферної катастрофи. Екологічна криза матиме планетарні наслідки, які призведуть до радикальних змін у прояві життя на планеті. Про це уперше було вказано на конференції в Стокгольмі в 1972 р. за участі 106 країн.

Рішення цієї проблеми може бути досягнуто тільки за умов впровадження новітніх технологій, які дозволять мати високий виробничий потенціал і не чинити загрози довкіллю. На думку багатьох фахівців найбільш перспективними є технології, що базуються на властивостях біологічних систем. Це обумовлено тим, що біологічні системи здатні функціонувати з високою ефективністю при низьких тиску і температурах, піддаються контролю, їх активність можна регулювати. Вони компактні, не забруднюють довкілля, бо можуть бути безвідходними.

Новітні технології, засновані на використанні різноманітних, високо специфічних властивостей біологічних систем, дозволять комплексно вирішити глобальні завдання, що стають перед людством:

1. **Забезпечення харчовими ресурсами** – шляхом використання високоефективних технологій отримання біомаси визначеного складу.



2. *Охорона здоров'я* – шляхом розробки нових високоефективних діагностичних тестів, нових лікарських препаратів біологічного походження, способів лікування і профілактики.

3. *Забезпечення енергетичними ресурсами* – шляхом отримання енергії з джерел, що швидко відновлюються.

4. *Відновлення і збереження стану довкілля* – шляхом біологічної утилізації відходів традиційних технологій і розробки безвідходних технологій.

Крім того, біологічні технології знаходять застосування при вирішенні інших завдань, зокрема, у промисловості при вилученні з бідних руд рідкісних хімічних елементів, таких як золото, платина, срібло тощо.

Нова концепція природокористування повинна базуватися на використанні новітніх сучасних технологій, які дозволять зменшити антропогенний тиск на біоценози і розробити коеволюційну систему виживання, тобто сумісної односпрямованої еволюції людини і довкілля.

### ***Питання для самоконтролю:***

1. Сформулюйте основні завдання та перспективи промислової мікробіології.
2. Розкрийте зв'язок промислової мікробіології з іншими науками.
3. Охарактеризуйте основні етапи становлення біотехнології.
4. Наведіть класифікацію біотехнологічних процесів.
5. Назвіть основні галузі застосування промислової мікробіології.
6. Який внесок наукової діяльності Л. Пастера в галузі промислової мікробіології?
7. Охарактеризуйте основні наукові досягнення С.М. Виноградського, В.Л. Омелянського, Б.Л. Ісаченка.
8. Який внесок вітчизняних вчених у розвиток промислової мікробіології?

### ***Виберіть правильну відповідь:***

#### ***1. Хто увів терміни «аероби» і «анаероби»?***

- А) Р. Кох;
- Б) Л. Пастер;
- В) Дженнер;
- Г) С.М. Виноградський.

#### ***2. Засновником промислової мікробіології вважають:***

- А) Л. Пастера;
- Б) А. Лавуазьє;
- В) Р. Коха;
- Г) А. ван Левенгука.

#### ***3. Які типи бродіння досліджував Луї Пастер?***

- А) спиртове;
- Б) молочнокисле;
- В) маслянокисле;

Г) пропіоновокисле.

**4. Ким уперше було запропоновано щільні поживні середовища і анілінові барвники?**

- А) Л. Пастер;
- Б) А. Лавуазьє;
- В) Р. Кох;
- Г) А. ван Левенгук

**5. Ким уперше було відкрито антибіотики?**

- А) А Флемінгом;
- Б) А. Лавуазьє;
- В) Р. Кохом;
- Г) Флорі та Чейном.

**6. Хто відкрив продуцентів стрептоміцину?**

- А) А Флемінг;
- Б) Г. Флорі та Е.Чейн;
- В) З.В. Єрмольєва;
- Г) З. Ваксман.

**7. Біотехнологія виробництва лимонної кислоти розроблена:**

- А) В.С. Буткевичем;
- Б) В.М. Шапошніковим;
- В) С.М. Виноградським;
- Г) Л.Й. Рубенчиком.

**8. Безперервний метод для культивування дріжджів у бродильні виробництва впровадив:**

- А) З. Ваксман;
- Б) В.М. Шапошніков;
- В) С.М. Виноградський;
- Г) С.В. Лебедев.

**9. Виробництво пробіотиків пов'язано з працями:**

- а) З. Ваксмана;
- б) В.В. Смірнова;
- в) С.М. Виноградського.

**Виконайте завдання:**

1. Побудуйте схему:

а) «Структура сучасної біотехнології»;

б) «Зв'язок промислової мікробіології з іншими науками».

2. Заповніть таблицю «Галузі застосування промислової мікробіології».

Галузі застосування	Приклади

## Тема 2. Загальна характеристика мікроорганізмів-продуцентів і способи їх культивування

**Мета:** сформувати знання про основні принципи регуляції метаболізму та швидкості росту мікроорганізмів-продуцентів, методи відбору мутантів мікроорганізмів з підвищеним рівнем продуктивності.

### 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.

**Основні терміни і поняття:** ауксотрофи, культура, культивування, ліофілізації, кріопротектори, мікроорганізми-продуценти, прототрофи, фактори росту, хемостатне культивування.

### 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 В<sub>2</sub> 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.

Таблиця 2.1

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

<b>Продукти</b>	<b>Продуценти</b>
<b>Харчові продукти</b> 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>
<b>Харчові та кормові добавки</b> Глутамат, лізин, інші амінокислоти  Вітаміни	<i>Corynebacterium glutamaticum</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>
<b>Ферменти</b> 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> .
<b>Розчинники</b> 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>
<b>Полісахариди</b> Ксантан Декстран Альгірати	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Leuconostoc mesenteroide</i> ; <i>Azotobacter vinelandii</i>
<b>Бактерійні препарати</b> Добрива Ентомопатогенні	<i>Rhizobium sp.</i> <i>Bacillus thuriangiensis</i>
<b>Лікувальні засоби</b> Стероїди Антибіотики  Амінокислоти	Мікобактерії, <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium notatum</i> , <i>Streptomyces erythraeus</i> , Бактерії роду <i>Bacillus</i>

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.

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----→виращування у колбах на струшувачах у рідкому середовищі----→посівні апарати----->стадія виробничої ферментації.

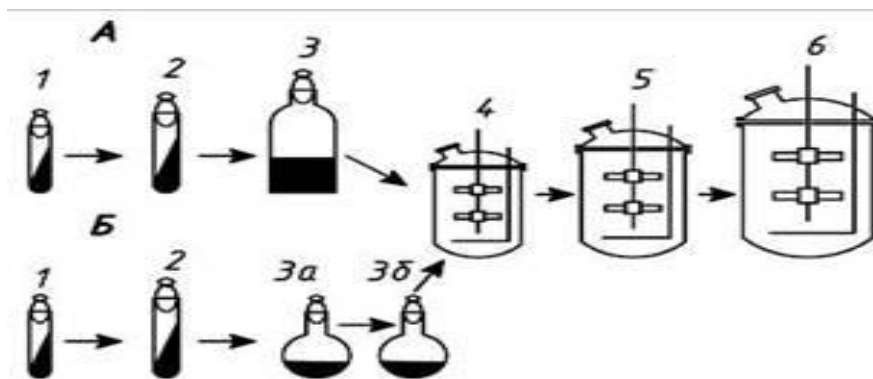


Рисунок 2.1 – Схема вирощування культур-продуцентів у флаконах (А), у колбах на качалках (Б): 1 – законсервований вихідний матеріал; 2 – спорова генерація на скошеному агарі в пробірці; 3 – II спорова генерація на твердому середовищі; 3а і 3б – I і III генерації на рідкому середовищі у колбі; 4 – ферментер 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  $+20^{\circ}\text{C}$ . 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 пробками, заморожують у рефрижераторах при температурі від  $-12$  до  $-80^{\circ}\text{C}$ . 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 (pp. *Pichia*, *Lipomyces*), ніж неспороутворювальні великі клітини дріжджів (pp. *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.

**Лаг-фаза** починається з моменту посіву мікроорганізмів у поживне середовище. У лаг-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 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.

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 НАДН<sub>2</sub>; 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?

***Виберіть правильну відповідь:***

***1. Чиста культура – це:***

- А) бактеріальні клітини, виділені з різних середовищ;
- Б) популяція мікроорганізмів одного виду, що отримані з ізолюваної мікробної колонії;
- В) клітини одного виду, що отримані з різних середовищ і в різний час;
- Г) бактеріальні клітини, що відрізняються за розміром.

***2. Час, за який подвоюється кількість клітин чи біомаси – це:***

- А) час генерації;
- Б) врожай (вихід біомаси) культури;
- В) питома активність культури.

***3. Яка фаза росту бактерій характеризується станом рівноваги?***

- А) лог-фаза;
- Б) лаг-фаза;
- В) стаціонарна фаза;
- Г) фаза відмирання.

***4. Для оцінки ефективності процесів росту (ефективності використання компонентів середовища), використовують:***

- А) економічний коефіцієнт;
- Б) метаболічний коефіцієнт.

***5. Етапи приготування посівного матеріалу:***

- А) вихідна культура → скошене агаризоване середовище → вирощування у колбах на качалках → посівні апарати → стадія виробничої ферментації;
- Б) вихідна культура → вирощування у колбах на качалках у рідкому середовищі;
- В) вихідна культура → посівні апарати → стадія виробничої ферментації.

***6. Методи для тривалого зберігання культур бактерій (дайте найповнішу відповідь):***

- А) ліофілізація, субкультивування і зберігання під вазеліновою олією;
- Б) ліофілізація, зберігання під вазеліновою олією;
- В) зберігання під вазеліновою олією, різні способи висушування, ліофілізація.

***7. Обов'язковими умовами культивування аеробів є:***

- А) джерела світла та енергії, рН середовища;
- Б) джерело світла, рН середовища, температура;

В) аерація, температура, світло, джерело живлення;

Г) джерело живлення та енергії, рН середовища, аерація, температура.

**8. Мікроорганізми, які потребують факторів росту – це:**

А) ауксотрофи;

Б) прототрофи.

**9. При періодичному культивуванні...**

А) змінюються швидкість росту, фізіологічна активність та морфологічні показники культури;

Б) не змінюються швидкість росту, фізіологічна активність та морфологічні показники культури.

**10. Автоклавовання – це:**

А) стерилізація сухим жаром;

Б) стерилізація кип'ятінням;

В) дробна стерилізація;

Г) стерилізація паром під тиском.

**Виконайте завдання:**

1. Побудуйте схему:

а) «Методи зберігання культур-продуцентів»;

б) «Способи культивування культур-продуцентів».

2. Заповніть таблицю «Параметри, що контролюються при біотехнологічних процесах».

Фізичні параметри	Хімічні параметри	Біологічні параметри

**Теми рефератів:**

1. Методи відбору мутантів мікроорганізмів з підвищеним рівнем продуктивності.

2. Методи отримання і зберігання культур-продуцентів.

### Тема 3. Наукові основи промислової мікробіології

**Мета:** сформулювати знання про основні методи і етапи роботи в генній інженерії, біотехнологію конструювання рекомбінантних ДНК, використання плазмід бактерій і бактеріофагів у якості генетичних векторів, що застосовують у генетиці і селекції промислових продуцентів.

#### План

1. Генетична інженерія як наукова основа для отримання корисних штамів мікроорганізмів.
2. Методи генної інженерії.
3. Методи селекції промислових штамів мікроорганізмів.
4. Конструювання біотехнологічних штамів мікроорганізмів.

**Основні терміни і поняття:** штам, ген, генетичні вектори, клонування, мутації, мутагени, мутагенез, індукований мутагенез, ауксотрофні мутанти, регуляторні мутанти, рекомбінантна ДНК.

#### 3.1. Генетична інженерія як наукова основа для отримання корисних штамів мікроорганізмів

Генетична інженерія створює умови для пізнання способів і шляхів «конструювання» нових або покращення існуючих організмів з важливими господарськими якостями, які можуть забезпечити зростання продуктивності біотехнологічних процесів.

У рамках генетичної інженерії розрізняють генну інженерію і клітинну інженерію.

Під генною інженерією розуміють маніпуляції з метою створення рекомбінантних ДНК (синоніми – молекулярне клонування, клонування генів, технологія рекомбінантних ДНК тощо).

Під клітинною інженерією розуміють генетичні маніпуляції з ізольованими окремими клітинами або групами клітин рослинного або тваринного походження.

Завданням генної інженерії є виділення окремих генів, їх молекулярне клонування і створення рекомбінантної ДНК – штучної комбінації із генів і різноманітних промоторів.

#### 3.2. Методи генної інженерії

Методи генної інженерії використовують у певні послідовності, причому, розрізняють декілька стадій у виконання типового генно-

інженерного експерименту, спрямованого на клонування будь-якого гену, а саме:

1. Виділення ДНК з клітин певного організму і виділення ДНК-вектора.
2. Розрізання (рестрикція) ДНК висхідного організму на фрагменти, що містять певні гени, за допомогою ферментів-рестриктаз та виділення цих генів з утвореної рестрикційної суміші. Одночасно розрізають векторну ДНК, перетворюючи її з кільцевої структури в лінійну.
3. Змикання отриманого сегменту ДНК (гена) із ДНК вектора з метою отримання гібридних молекул ДНК.
4. Введення гібридних молекул ДНК шляхом трансформації в будь-який інший організм, наприклад *E. coli*, або у соматичні клітини.
5. Висів бактерій, у котрі вводили гібридні молекули ДНК, на елективні поживні середовища, які дозволяють ріст тільки тих клітин, які містять гібридні молекули ДНК.
5. Ідентифікація колоній, що утворені бактеріями з гібридними молекулами ДНК.
6. Виділення клонованої ДНК (клонованих генів) і її характеристика, включаючи секвенування (визначення послідовності) азотистих основ у клонованому фрагменті ДНК.

Перший етап клонування будь-якого гену – одержання «бібліотеки» генів і пошук у її складі потрібного гену, наприклад, ген людини, який кодує один із глобінів – білків, що утворюють в еритроцитах – гемоглобін. Одержання «бібліотеки» генів починається з розрізання ДНК, на декілька фрагментів. Число таких ферментів залежить від обраної рестриктази. Для одержання фрагментів, що містять окремі гени, потрібно розрізати ДНК на декілька десятків або навіть сотень тисяч фрагментів. Для відділення генів один від одного використовують плазмиди, у складі яких фрагменти ДНК вводяться в інші клітини, зазвичай бактеріальні.

### **Виділення ДНК (на прикладі плазмід)**

ДНК з бактеріальних клітин, що містять плазмиди, виділяють за допомогою традиційної техніки, що полягає в отриманні клітинних екстрактів у присутності детергентів з наступним видаленням з екстрактів білків фенольною екстракцією. Повне очищення плазмідної ДНК від білків, РНК та інших сполук проводиться в декілька стадій. Після того, як клітини порушені (лізис клітинної стінки за допомогою лізоцима), до екстракту додають детергент для розчинення мембран й інактивації деяких білків. ДНК видаляють звичайним центрифугуванням.

Часто для повного очищення застосовують хроматографію. Якщо потрібна досить ретельна очистка, то використовують швидкісне центрифугування в градієнті щільності CsCl з використанням етидія бромиду (етидій бромід забарвлює фрагменти, що полегшує їх визначення). Після центрифугування в центрифужній пробірці буде утворюватися два

кільця – плазмідна ДНК і хромосомна ДНК. Плазмідну ДНК відбирають для подальшої роботи, а хромосомну ДНК відкидають.

Інструментами для виділення і клонування генів можуть бути особливі ферменти, які одержують із найрізноманітніших джерел – бактерій, клітин ссавців і птахів, яких вирощують у культурі, зараженій різноманітними вірусами тощо. Найчастіше за все використовують три види ферментів: рестриктази, лігази і зворотну транскриптазу.

**Рестриктази** – це різновид дезоксирибонуклеаз, ферментів, що розрізують ДНК на короткі або довгі фрагменти або навіть на окремі нуклеотиди.

Рестриктази уперше були виділені з *E.coli* у 1968 р. Виявилося, що вони здатні розрізати (плавити) молекули ДНК на різних сайтах (ділянках, місцях) рестрикції. Ці ферменти отримали назву ендонуклеаз класу I. Потім у бактерій знайшли ендонуклеази класу II, які розпізнають у чужорідній ДНК сайти рестрикції специфічно і на цих сайтах також здійснюють рестрикцію. Саме ферменти цього класу стали використовувати в генній інженерії. Тоді ж були відкриті ферменти III класу, які розплавляють ДНК поряд із сайтами розпізнання, проте ці ферменти не мають значення для використання в генній інженерії.

Особливістю рестриктаз є те, що вони розрізують ДНК не в будь-якому місці, а тільки між певними нуклеотидами на ділянці з суворо характерною для кожної рестриктази послідовністю нуклеотидів. Найчастіше це 4 – 6 пар нуклеотидів у місці розрізу. Наприклад, рестриктаза *Eco RI* (з системи рестрикція-модифікація *E.coli*) розщеплює ДНК на ділянці ГААТТЦ, а рестриктаза *Bam HI* на ділянці ГГАТЦЦ.

Тепер відомо понад сотні різноманітних ферментів-рестриктаз, що дозволяє вибір рестриктаз і селективне вирізання фрагментів з вихідної ДНК.

Після рестрикції ДНК з рестрикційної суміші виділяють рестрикційні ДНК-фрагменти (ДНК-рестрикти), які будуть необхідні для об'єднання з вектором. Для виділення ДНК-рестриктів застосовують електрофорез (матеріал – агароза, поліакриламід). Цей метод дозволяє розділити ДНК-рестрикти на фракції за розмірами, оскільки окремі фрагменти мають різні розміри і масу, тому з різною швидкістю мігрують у електричному полі під час електрофорезу. Чим більший (довший) фрагмент, тим повільніше він мігрує в електричному полі. Для розпізнання фрагментів застосовують етидій бромід, що забарвлює фрагменти і дозволяє легко їх виявити.

Виділені після електрофорезу з агарозного гелю фрагменти ДНК (рестрикти) попередньо піддають секвенуванню (розпізнаванню), тобто визначенню нуклеотидної послідовності. Для цього застосовують хімічний і ферментативний метод секвенування. Хімічний метод базується на отриманні мічених радіоактивним фосфором ( $P^{32}$ ) фрагментів. Ферментативний метод – базується на тому, що в кінець фрагмента, що аналізується, вводять нуклеотид, який потім використовують у синтезі фрагментів *in vitro* (аналізують нуклеотидну послідовність за допомогою електрофорезу).

**Лігаза** – фермент, що зшиває вільні кінці ДНК між собою. Цей фермент у нормальних клітинах бере участь у синтезі ДНК і в процесах її репарації, тобто у відновленні нормальної структури ДНК після її часткового ушкодження.

**Зворотна транскриптаза** – фермент, аналогічний РНК-полімеразі, але який синтезує ДНК не на ДНК, а на РНК. Цей фермент у порівнянні з РНК-полімеразою працює мовби у зворотньому напрямку, тобто не від ДНК до РНК, а від РНК до ДНК. Чи є зворотна транскриптаза в нормальних клітинах і чи відбувається в них синтез ДНК на РНК – питання суперечливе і поки що до кінця не вирішене. Але цей фермент з'являється в клітинах еукаріот при зараженні їх РНК-геномними вірусами (ретровірусами). Геноми цих вірусів кодують зворотну транскриптазу, за допомогою якої утворюється вірусна ДНК-матриця, на якій потім відбувається синтез багатьох молекул вірусних РНК.

### 3.3. Методи селекції промислових штамів мікроорганізмів

У мікробіологічних виробництвах використовують:

- природні штами мікроорганізмів;
- штами, змінені в результаті мутагенезу;
- штами, одержані методом генної та клітинної інженерії.

**Природні штами** використовують здебільшого для виробництва біомаси, бактерійних добрив і біоінсектицидів. У них наявні високоефективні регуляторні механізми, що запобігають накопиченню надлишків метаболітів.

**Генетично змінені штами** використовують у виробництвах, де цільовим продуктом є не біомаса, а метаболіти, що виділяються мікроорганізмами у середовище, або накопичуються в клітинах.

Для спрямованої селекції (з лат. *selection* – добір) високопродуктивних штамів важливе значення має дослідження генома мікроорганізмів, принципів його організації та функціонування. Головним завданням селекційної роботи є реорганізація генома мікробної клітини з переорієнтацією шляхів біосинтезу в потрібному напрямі.

Одним із методів селекції мікроорганізмів є **індукований мутагенез і ступінчастий відбір** кращих штамів.

Усю різноманітність мутацій поділяють на певні групи:

– за зміною ДНК мутації поділяють на вставки, делеції, транзиції та трансверсії. Транзиції і трансверсії часто призводять до **місенс-мутацій** (мутації зі зміною змісту) – викликають зміну однієї амінокислоти на іншу в білках.

– за зміною ознак розрізняють морфологічні, фізіологічні та біохімічні мутації;

– за напрямом зміни ознак мутації бувають прямі і зворотні. Мутанти зі зворотними мутаціями до вихідного генотипу називають **ревертантами**.

При істинних зворотних мутаціях у ДНК відновлюється вихідна послідовність нуклеотидів і відповідно генотип.



Реверсії, які відбуваються завдяки супресорним мутаціям, можуть бути внутрішньогенними супресіями і позагенними супресіями. При **внутрішньогенній супресії** друга мутація виникає у тому ж гені, що і пряма, і забезпечує відновлення функцій білка. При **позагенній супресії** друга мутація відбувається в іншому гені (гені-супресорі) і лише частково (до 10 %) відновлює активність пошкодженого білка. Такі ревертанти іноді називають **псевдоревертантами**. Вони відрізняються від батьківського типу, бо в них змінені багато ознак і знижена життєдіяльність.

Розрізняють мутації цитоплазматичні та ядерні (хромосомні). Хромосомні мутації можна розділити на три основні типи:

- зміни кількості хромосом;
- перебудова хромосом або структурні зміни;
- зміни індивідуальних генів (внутрішньогенні зміни).

Частоту виникнення мутацій можна підвищити в тисячі разів, використовуючи **мутагени** (фізичні, хімічні, біологічні). Такі мутації носять назву **індукованих**.

**Фізичні мутагени** – УФ-промені (спричиняють утворення тимінових димерів у молекулі ДНК, які змінюють процеси реплікації, що призводить до появи мутацій), різні види іонізуючої радіації (рентгенівські промені, протони, нейтрони тощо).

**Хімічні мутагени**. Аналоги азотистих основ, які за хімічною структурою наближені до нормальних азотистих основ, можуть включатися в молекулу ДНК і утворювати водневі зв'язки з комплементарними і некомплементарними азотистими основами, що призводить до заміни пар нуклеотидів і появи точкових мутацій.

Азотиста кислота спричиняє дезамінування амінопуринів з утворенням гіпоксантину, і, як наслідок, у результаті двох реплікацій відбувається заміна пар нуклеотидів.

Акридинові барвники (профлавін та ін.) вбудовуються між основами ланцюга ДНК і збільшують відстань між ними, що може бути причиною появи делецій або інтеркаляцій пари нуклеотидів під час реплікації ДНК.

**Біологічними мутагенами** є фаг  $\mu$ , інсерційні елементи (IS-елементи), транспозони (Tn). Вони інтегруються в хромосому і спричиняють мутації типу **інсерцій**.

**Фаг  $\mu$**  – широко використовується в селекції промислових штамів. Наприклад, за допомогою помірного фага селекціоновано продуцента амінокислот *Serratia marcescens*.

**IS-елементи** – це лінійні фрагменти ДНК, які містять від 200 до 2000 пар нуклеотидів, мають на кінцях інвертовані повтори (IR, або ITR – *inverted terminal repeat*). Довжина цих повторів у різних IS-елементів різна. ITR необхідні для транспозиції і не несуть жодних інших генів.

**Транспозони** – це утворені на основі IS-елементів (або їх похідних) складні мігруючі структури. Всі транспозони мічені кінцевими повторами, зокрема IS-елементи, які можуть повторюватись на кінцях транспозона в

прямій або оберненій послідовності. Відомо також транспозони, які мають на кінцях короткі інвертовані повтори (ITR). Транспозони можуть переносити будь-які включені в них гени, ділянки ДНК, що опинились між ними. Проте, ймовірність переміщення великих хромосомних блоків досить низька. Відомо багато транспозонів, які несуть детермінанти стійкості до антибіотиків та інших інгібіторів росту бактерій.

Різні мігруючі елементи відрізняються за ступенем специфічності при виборі місць інтеграції в реплікони. При високій специфічності транспозони інтегрується тільки в один або кілька сайтів, а при регіональній специфічності – у певні райони, всередині яких інтеграція проходить у численні сайти. Коли вставка транспозона здійснюється у багато ділянок, говорять про середню специфічність. При низькій специфічності майже кожен акт транспозиції здійснюється в новий сайт. Специфічність транспозиції для одного й того ж транспозона для різних репліконів може бути різною.

Результати можуть проявлятися у різних змінах метаболізму клітин:

- підвищення рівня синтезу ферментів чи їх активності;
- блокування подальшого перетворення метаболіту в клітині;
- блокування деградації продукту;
- забезпечення ефективної секреції продукту клітини;
- посилення позитивної регуляції синтезу продукту тощо.

Методом індукованого мутагенезу одержано більшість продуцентів антибіотиків, ферментів, органічних кислот, вітамінів, амінокислот тощо.

У процесі мутагенезу і **ступінчастого добору** можуть бути послідовно одержані мутації, що ведуть до конститутивного синтезу відповідних ферментів, усунення ретроінгібування, підвищення пулу попередників цільового продукту, змін енергетичного метаболізму і проникності мембран.

Ступінчастий добір часто використовують у селекції продуцентів антибіотиків. Недоліком цього методу є те, що найчастіше селекція на підвищення активності штаму ведеться апіорі. Робота зі створення активного штаму досить трудомістка і триває багато років.

Конструювання штамів на основі ступінчастого добору проводиться з використанням селективних і напівселективних середовищ, що дає змогу відбирати потрібні мутанти із великої популяції клітин.

У селекції продуцентів ферментів важливе значення має одержання конститутивних мутантів. З цією метою можна використовувати метаболічні аналоги субстратів, які не здатні викликати індукцію. На середовищах, де такі сполуки є єдиним джерелом вуглецю і енергії або азоту, утворюються тільки мутанти, які синтезують відповідні ферменти конститутивно.

Основним шляхом селекції продуцентів амінокислот є одержання **ауксотрофних і регуляторних мутантів**. Одержання ауксотрофних мутантів – продуцентів амінокислот – можливе тільки для мікроорганізмів, які мають розгалужений шлях біосинтезу принаймні двох кислот, що утворюються з одного попередника, і яким притаманне явище узгодженого ретрогальмування. У таких ауксотрофних мутантів надлишок однієї амінокислоти при дефіциті

іншої не призводить до зниження активності першого ферменту. Коли одержання ауксотрофних мутантів, здатних нагромаджувати кінцеві продукти нерозгалужених ланцюгів біосинтезу, неможливе, використовують регуляторні мутанти – це мутанти з частково порушеною регуляцією біосинтезу, що дає змогу одержати підвищений вихід кінцевого продукту.

### Методи селекції мутантів

Існують різноманітні методи селекції мутантів. Вибір методу залежить від вибору вихідного штаму мікроорганізмів і пошуку необхідних ознак.

1. **Метод відбитків (реплік)** є зальноприйнятим методом відбору мутантних штамів за допомогою якого виділяють ауксотрофні мутанти (запропонований Дж. і Е. Ледербергами). Принцип методу полягає у тому, що оброблену мутагеном культуру висівають у чашки з поживним агаром, який має додатковий фактор росту (максимальне середовище). За цих умов проростають мутантні клітини і клітини дикого типу. Потім колонії прототрофів і мутантів переносять за допомогою штампів на мінімальне середовище (без факторів росту). Після інкубації чашки порівнюють з вихідними чашками. Колонії ауксотрофів не ростуть на мінімальному середовищі.

2. **Метод виділення стійких мутантів** до лікувальних препаратів або до дії бактеріофагів. Він полягає у висіванні чутливих культур на середовище, яке містить антибактерійний агент. Чутливі клітини не ростуть або гинуть, а нечутливі утворюють колонії.

3. **Пеніциліновий метод виділення мутантів.** Він ґрунтується на тому, що деякі антибіотики (пеніцилін, стрептоміцини, новобіоцин, циклоспорин) вбивають лише ті клітини, які ростуть. Якщо суміш ауксотрофних і прототрофних бактерій перенести на мінімальне середовище, що містить летальну дозу антибіотиків, то прототрофи, проростаючи, гинуть, а ауксотрофи за цих умов не проростають і зберігаються. Потім суспензію клітин промивають або додають фермент, що руйнує антибіотик, переносять у максимальне середовище.

### 3.4. Конструювання біотехнологічних штамів мікроорганізмів

Індукований мутагенез і ступінчастий добір кращих варіантів застосовується для поліпшення промислових штамів мікроорганізмів, геном яких вивчено недостатньо. Проте для мікроорганізмів з описаними особливостями генетичного апарату на сучасному етапі застосовують **методи генетичного конструювання**. Розрізняють генетичне конструювання *in vivo*, яке включає одержання та виділення мутантів і використання різних способів обміну спадковою інформацією живих мікробних клітин і генетичне конструювання *in vitro*, яке базується на використанні генної інженерії, що передбачає маніпуляції на виділеній із організмів ДНК.

Як відомо, серед бактерій немає диплоїдних особин, на відміну від еукаріотичних організмів. Однак іноді трапляється парасексуальний процес, який полягає в перенесенні частини генетичного матеріалу клітини-донора до клітини-реципієнта. При цьому утворюється неповна зигота (меризигота), що містить частину генетичного матеріалу донора і всі гени реципієнта. Таку форму обміну генетичним матеріалом використовують для селекції промислових штамів.

Описано три способи передачі ДНК від однієї бактерії до іншої (генетична рекомбінація): трансформація, трансдукція і кон'югація.

**Трансформація** – генотип бактерійної клітини змінюється за допомогою вільної ДНК, виділеної з клітини-донора. Цим способом передається ознаки стійкості до різних отрут і прототрофісність до окремих амінокислот.

**Кон'югація** – процес передачі генетичної інформації від клітини до клітини під час контакту. Штучно перериваючи процес кон'югації через певні проміжки часу (наприклад, інтенсивним струшуванням у дезінтеграторі), оцінюють віддаль між генами і використовують одержані результати для побудови генетичних карт прокаріотів.

**Трансдукція** – перенесення ДНК від клітини-донора до клітини-реципієнта за допомогою помірною фага. При цьому всі інфіковані фагом клітини змінюють свій фенотип.

Незалежно від потрапляння в клітину-реципієнта, донорна ДНК рекомбінує з гомологічними ділянками чи специфічними сайтами в геномі реципієнта або зберігається у вигляді автономної міні-хромосоми. Клітину, у якій відбулася рекомбінація, називають **рекомбінантною**.

## Генетичні вектори

Щоб здійснити транспозонний мутагенез, тобто ввести транспозони в хромосому бактерійної клітини, необхідно мати донорну молекулу ДНК-переносник, або вектор для доставки транспозонів. Як вектори використовують фаги або плазмиди, які можна легко елімінувати із бактерії-реципієнта.

Сегмент ДНК (ген), який призначено для молекулярного клонування, повинен мати здатність до реплікації при перенесенні його в бактеріальну клітину, тобто бути репліконом. Генетичні вектори повинні володіти двома властивостями: по-перше, здатністю до реплікації у клітинах (у декількох копіях); по-друге, забезпечити селекцію клітин, які мають вектор (мати маркери). Саме таким вимогам відповідають плазмиди і фаги.

Обмін ділянками ДНК найчастіше обмежений штамми одного виду і має односпрямований характер. Найчастіше використовують позахромосомні молекули ДНК (**плазмиди**), здатні до автономної реплікації. Усі плазмиди поділяють на кон'югативні і некон'югативні.

**Кон'югативні плазмиди** переносять власну ДНК від клітини-донора до реципієнта при кон'югації (*F*-плазмиди, деякі *Col*-плазмиди, *R*-плазміда).

**Некон'югативні плазмиди** не здатні до кон'югаційного перенесення своєї ДНК з однієї клітини в іншу.

Плазмиди є переносниками (векторами) чужорідної ДНК до бактерійної клітини. З цією метою плазмідну ДНК і чужорідну ДНК обробляють відповідною рестриктазою. В результаті дії цього ферменту утворюються лінійні фрагменти ДНК з одноланцюговими кінцями, що складаються послідовностей ААТТ або ТТАА. Якщо такі фрагменти змішати, то відбудеться спарювання комплементарних основ ланцюгів плазмідної та клітинної ДНК. Місце розривів зшивають за допомогою полінуклеотидлігази. На цьому закінчується етап створення **рекомбінантної** плазмиди (химерної ДНК). Для проявлення генетичної інформації цієї ДНК її вводять у клітину шляхом трансформації. Якщо гібридна плазміда буде мати в клітині декілька копій, то і чужорідна ДНК буде багаторазово копіюватись у складі плазмиди. Нащадки клітини, що містить гібридну ДНК, генетично однорідне, воно утворює **клон**. Тому цей метод назвали **клонуванням**. Цей метод дає змогу вводити в геном бактерійної клітини не тільки генетичну інформацію інших мікроорганізмів, але й інформацію із клітин вищих організмів, і одержувати білки тварин і людини (інсулін, соматотропні, інтерферон тощо).

У якості вектора зазвичай обирають плазмиду, яка містить ген стійкості до антибіотиків, наприклад, ампіциліну, до якого дуже чутлива кишкова паличка. Таку плазмиду розрізають за допомогою рестриктази в одному певному місці, змішують із сумішшю фрагментів ДНК людини і додають лігазу, яка знову зшиває розрізані кінці. У багатьох випадках лігаза просто замикає плазмиду знову в кільце, але досить часто вона зшиває вільні кінці фрагментів ДНК з вільними кінцями ДНК плазмиди. У результаті виникає велика кількість кільцевих плазмід, у які вбудовані різноманітні фрагменти ДНК людини. Потім цими плазмідами «заражають» кишкову паличку або інший вид клітин. Клітини, у котрі вводили гібридні молекули ДНК, висівають на селективні поживні середовища, на яких можливий ріст лише тих клітин, які містять гібридні молекули ДНК.

На основі **плазмід**, які мають широке коло господарів, створені універсальні системи для транспозонного мутагенезу цих організмів. Наприклад, використання в якості вектора плазмиди рAS8-121 для роботи з пурпуровими бактеріями, система транспозонного мутагенезу для грам позитивних бактерій (транспозони Tn551 у *S. aureus* і Tn917 у *Bacillus subtilis*).

**Фагові вектори** теж мають деякі переваги. По-перше, вони можуть включати в себе більш крупні (більш довгі) фрагменти ДНК порівняно з плазмідними векторами. По-друге, перенесення фагами клонованого фрагмента до клітини в результаті інфікування останніх, є більш ефективним, ніж трансформація ДНК. По-третє, фагові вектори дозволяють більш ефективний скринінг (розпізнання) на поверхні агару колоній, які містять клітини, що несуть клонований ген.

Фагові вектори створюють на основі мутантів помірних фагів, наприклад, фага  $\lambda$  із порушеною здатністю до лізогенізації клітин-господаря. Відомі також

фагові вектори на основі фага P22 – для *Salmonella typhimurium* і фага P1 – *E. coli* та деяких грам негативних бактерій. Крім фагових використовують інші вірусні вектори, зконструйовані на базі вірусу герпесу, а також вектори зконструйовані на базі дріжджової ДНК. Багато транспозонів, виявлених у ентеробактерій і псевдомонад, здатні до транспозиції в клітини різних грампозитивних бактерій.

### **Питання для самоконтролю:**

1. Що таке мутації? Які типи мутацій характерні для мікроорганізмів?
2. Назвіть основні фізичні, хімічні та біологічні мутагени, що використовуються в селекції.
3. Як змінюється метаболізм мутантних клітин мікроорганізмів?
4. Охарактеризуйте етапи ступінчастого добору мутантів.
5. Назвіть методи селекції мутантів мікроорганізмів.
6. Поясніть, що таке генетичні вектори?
7. Поясніть терміни «трансформація», «кон'югація», «трансдукція».
8. Для яких продуцентів застосовують методи генетичного конструювання?
9. Розкрийте принцип методу клонування.
10. Які методи використовують для селекції мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків, ферментів, амінокислот?

### **Виконайте завдання:**

1. Складіть схему:
  - а) класифікація методів селекції промислових штамів мікроорганізмів;
  - б) етапи виділення ДНК (на прикладі плазмід).
2. Заповніть таблицю «Індуковані мутації».

Мутагени	Прояви впливу мутагенів

### **Теми рефератів:**

1. Бактеріофаги в генетиці та селекції промислових продуцентів.
2. Плазмиди бактерій, їх використання в селекції промислових продуцентів.
3. Біотехнологія в рослинництві.
4. Біотехнологія в тваринництві.

## Тема.4 Етапи біотехнологічного процесу

**Мета:** сформувати знання про основні етапи біотехнологічного процесу, завдання, що вирішуються на кожному етапі виробництва; методи виділення, очищення цільового продукту.

### План

1. Підготовчий (передферментаційний) етап біотехнологічного процесу.
2. Виробничий (ферментаційний) етап біотехнологічного процесу.
3. Заклучний (постферментаційний) етап біотехнологічного процесу.

**Основні терміни і поняття:** біотехнологічний процес, промислові культури, промислові штами, ферментація, цільовий продукт.

### 4.1. Підготовчий (передферментаційний) етап біотехнологічного процесу

Підготовчий (передферментаційний) етап біотехнологічного процесу включає в себе вирішення наступних завдань:

1. Постановка завдання, вибір стратегії його вирішення, підготовку технічної документації і технічних інструкцій.
2. Підбір, отримання або придбання продуцентів.
3. Підбір, виробництво або придбання біореакторів або промислових установок.
4. Приготування поживних середовищ і підготовка умов культивування.
5. Нарощування маточних культур або продуцентів.
6. Запуск виробництва.

При постановці завдання отримання цільового продукту необхідно виходити не тільки з можливостей біологічних систем виробляти той чи інший продукт, але й з потенційних витрат на виробництво цього продукту різними способами, тобто з його рентабельності. Постановка завдання не може бути успішною без всебічного аналізу стану цього питання.

Продуктивність виробничої системи характеризує кількість продукту, що отримують на одиницю об'єму біореактора за одиницю часу із субстрату, який використовується. Продуктивність біотехнологічної системи залежить від багатьох факторів, основними з яких є: активність продуцента; коефіцієнт виходу продукту із використаного субстрату; кількість активної біомаси в біореакторі (тобто, кількість біомаси, що приймає участь в отриманні цільового продукту).

Збільшення виходу продукту дозволяє знизити собівартість цільового продукту, адже значну частину в структурі собівартості складає ціна субстрату (сировини). Важливими показниками ефективності виробництва є такі

показники як питомі енергозатрати та непродуктивні витрати субстрату та енергії у процесах біоконверсії.

На вихід продукту впливає організаційні фактори (тип біореактора, кваліфікація спеціалістів), генетичні і біохімічні особливості продуцента.

Основні вимоги до продуцентів, що використовуються в біотехнології:

- високий стабільний вихід цільового продукту;
- невисока ціна середовищ;
- простота культивування;
- висока швидкість росту і вихід продукту за коротких час;
- зберігання характеристик при тривалому культивуванні;
- стійкість до можливих контамінантів (інших мікроорганізмів);
- цільовий продукт повинен відносно легко виділятися;
- безпечність для оточуючого середовища.

Відмінні (від хімічних) особливості біотехнологічних процесів ферментації:

- чутливість продуцентів до фізико-хімічних і механічних впливів;
- забезпечення масопередачі у багатофазних системах;
- тривалість періодичного культивування (8 – 12 діб);
- дотримання стерильності;
- піноутворення;
- багатокомпонентність живильних середовищ;
- складність механізмів регуляції росту і біосинтезу продуцентів.

## 4.2. Виробничий (ферментаційний) етап біотехнологічного процесу

**Виробничий етап** – це сукупність послідовних операцій від початку функціонування об'єкта до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації, які можуть бути обумовлені вичерпанням компонентів живильного середовища, старінням культури, зміненням характеристик об'єкта тощо. Для цього в процесі виробництва необхідно контролювати десятки фізико-хімічних параметрів середовища культивування, кількість яких може варіювати залежно від завдання виробництва. Усі необхідні параметри контролюються автоматично і в динаміці. За необхідності, у разі відхилення від заданих характеристик проводиться їх корекція: внесення необхідних компонентів, або їх видалення.

Параметри середовища культивування, що контролюються:

- рН середовища та окислювально-відновлювальний потенціал;
- тиск та температура в біореакторах;
- рівень і маса середовища культивування;
- рівень рідини та газів;
- швидкість обертання мішалок (для регуляції рівня піни);
- концентрація катіонів і аніонів;
- концентрація солей у живильному середовищі;



- концентрація газів у повітрі.

**Основна мета** на цьому етапі – забезпечення максимально сприятливих умов функціонування біооб'єкта (максимальне отримання цільового продукту при мінімальних витратах).

### Основні завдання виробничого етапу

Серед завдань, які необхідно вирішувати на виробничому етапі, можна виділити наступні:

1. Підтримання і контроль асептичних (стерильних) умов.
2. Створення і контроль умов росту культур (температурний режим, масо- і газообмін, якість поживного середовища – зменшення поживних речовин і збільшення продуктів метаболізму).
3. Концентрація ферментів і білків у культуральній рідині.
4. Відсутність сторонньої мікрофлори.
5. Рівень піноутворення.

### Особливості вирішення задач виробничого етапу

#### 1. Підтримання і контроль асептичних (стерильних) умов

У процесі виробничого етапу постійно відбувається газообмін між зовнішнім середовищем і культуральним, тому необхідно дотримуватись умов стерильності, що досить складно при великих об'ємах виробництва.

Рішення цієї проблеми полягає в наступному:

- застосування попередньо очищеного від контамінантів (іншої мікрофлори) повітря за допомогою фільтрів;
- стерилізація поживних середовищ у процесі культивування;
- контроль стерильності умов виробництва.

#### 2. Створення і контроль умов росту культур

**Температурний режим.** У процесі культивування постійно змінюється температурний режим, тому постійно потрібно або відводити тепло, або (навпаки) підігрівати середовище. Так, у аеробних умовах відбувається тепловиділення, причому чим вище інтенсивність росту культури, тим більша швидкість розігріву культуральної рідини.

Найбільш простим способом відводу тепла є застосування оборотної води через змішувачі, водяні сорочки тощо.

Дещо простіше здійснювати контроль підвищення температури: існують різні системи підігріву – електричні, водяні.

**Масо- і газообмін.** Важливою особливістю біологічних об'єктів є їхня гетерогенність, тобто неоднорідність. Рідке середовище, у якому культивують мікроорганізми, теж є гетерогенним, бо в ньому є рідкі, тверді і газоподібні компоненти (фази). У процесі життєдіяльності клітини утилізують частину компонентів із середовища і постійно виділяють екзометаболіти, тобто вони самі створюють гетерогенність хімічного і газового складу. Таким чином сам

об'єкт постійно створює відхилення від оптимальних для нього умов функціонування. Завдання біотехнолога забезпечити максимальну продуктивність об'єкта в штучних умовах шляхом усунення факторів «самознищення».

**Забезпечення необхідного масо- і газообміну.** Перемішування культур – це складне завдання тому, що інтенсивне перемішування призводить до активного піноутворення, яке є вкрай небажаним явищем. Використання піногасників призводить до проблем, пов'язаних з їх побічною дією і дотримання стерильності.

Забезпечення киснем (аеробних культур) – за рахунок гарної розчинності кисню у воді, або шляхом підвищення парціального тиску кисню у газі. (парціальний тиск – це тиск газу або пари в суміші, який мав би цей газ або пара, якщо він один займав увесь об'єм у суміші).

Забезпечення культивування анаеробів, яке не потребує аерації, пов'язано з вирішенням проблеми видалення кисню із середовища, що досягається введенням у реактор інертного газу або витіснення кисню вуглекислотою, яка виділяється в процесі метаболізму об'єкту, що культивується. Герметизація біореактора створює певні складності, бо утруднює перемішування і теплообмін.

Необхідний постійний контроль хімічного складу, вмісту кисню, вуглекислого газу у середовищі культивування, а за необхідності регулюється інтенсивність перемішування.

### **3. Склад і якість поживного середовища.**

Найважливішим фактором оптимального росту клітинної культури є склад і якість живильного середовища, які динамічно змінюються, що виражається у зменшенні вмісту корисних для клітин речовин і неперервному нагромадженні продуктів метаболізму (екзометаболітів). Крім того, компоненти, що входять до складу поживного середовища, можуть змінюватися з неоднаковою швидкістю, що призводить не тільки до збіднення складу, але й до змінення співвідношення між компонентами.

Контроль складу культурального середовища одне з найскладніших завдань виробничого етапу.

**Процес культивування поділяють** на: періодичне культивування, неперервне культивування, напівнеперервне культивування:

– при **періодичному культивуванні** до складу поживного середовища не вводять додаткові компоненти, а після завершення циклу культивування виділяють цільовий продукт (якщо цільовий продукт накопичується в процесі культивування);

– при **неперервному культивуванні** необхідна постійна підтримка заданого стаціонарного стану середовища (контролюється автоматично за допомогою комп'ютерних систем);

– **напівперевний процес культивування** – така система культивування, при якій через певний інтервал часу відбирається частина біомаси і вноситься свіже поживне середовище, що значно збільшує термін культивування. Для

цього застосовують автоматичні системи реєстрації і подачі необхідних компонентів у біореактор.

У середовищі культивування контролюються такі параметри:

- температура;
- рН середовища – за допомогою рН-електродів (скляний мембранний електрод);
- тиск – за допомогою мембранних манометрів, що дають пневматичний сигнал, який перетворюється в електричний;
- в'язкість середовища – оцінюють потужність, яка потребує мішалка за різної швидкості обертання;
- уміст кисню – за допомогою гальванічних (потенціометричних) або полярографічних (електрод Кларка) зондів (вимірюється парціальний тиск).

#### **4. Контроль стану культури в процесі виробництва**

Важливою проблемою є втрата виробничої якості культури, яка може бути з двох причин – аутоселекції і контамінації:

- **аутоселекція** – самовільна селекція клітин у процесі тривалого культивування, основним фактором якого є спонтанні мутації, нестабільність генома в процесі інтенсивного культивування. У результаті можуть втрачатися вихідні властивості культури і промисловий штам може бути втрачено;
- **контамінація** – коли в «чисту культуру» потрапляє культура грибів, або бактерій, що швидко розмножуються і ростуть. Вони можуть досить швидко інгібувати (гальмувати) ріст культури-продуцента.

Методи контролю стану культури:

- морфологічний метод контролю (визначення форми, розмірів, структури клітин);
- генетичний метод контролю (функціональна нестабільність).

#### **4.3. Заключний (постферментаційний) етап виробництва**

Головним завданням завершального етапу біотехнологічного виробництва є **виділення** та **очистка** цільового продукту. Цей процес ускладнюється тим, що в біомасі знаходяться розбавлені розчини і складна суміш розчинних позаклітинних метаболітів, продуктів розкладу клітин, компонентів поживного середовища. При концентруванні цільового продукту в процесі виробництва відбувається інгібування росту продуцентів та їхня загибель.

У залежності від типу цільового продукту (біомаса або окремі метаболіти – ферменти, гормони, вітаміни) використовують різні типи концентрування та виділення. З огляду на те, що продукти мають біологічну природу (ферменти, гормони, вітаміни тощо), у чистому вигляді вони можуть втрачати свої

властивості та активність. Тому для забезпечення їх збереження використовують різні способи стабілізації (висушування, консервацію).

У процесі виробництва біологічні об'єкти не повністю використовують компоненти поживного середовища, крім того, вони утворюють велику кількість різних сполук, крім цільового продукту, тому виникає проблема їх утилізації.

Завершальний етап біотехнологічного виробництва включає:

- концентрування продукту;
- виділення і очистка продукту;
- стабілізація і фасування продукту;
- утилізація побічних продуктів.

**Цільовий продукт** – це очищена речовина, суміш речовин або біомаса клітин, що мають господарську цінність і отримуються як кінцевий продукт біотехнологічного виробництва.

### **Концентрування і виділення цільового продукту**

**Концентрування** – збільшення вмісту продукту в об'ємі за рахунок зменшення вмісту води, залежить від цільового продукту.

Використовують наступні способи концентрування:

- *упарювання і висушування* (якщо білково-вітамінний комплекс);
- *седиментація* – осадження часток у полі гравітаційних сил;
- *декантація* – зливання рідини (зціджування);
- *фільтрація*;
- *флотація* – прилипання часточок до бульбашок повітря (піна);
- *центрифугування* – розділення неоднорідних сумішей на компоненти за допомогою центробіжної сили;
- *сепарація*.

**Методи виділення цільового продукту:**

- *екстракція* – за допомогою органічних розчинників;
- *сорбція* (адсорбція, абсорбція, хемосорбція, десорбція);
- *хроматографічний метод* (газова і рідинна хроматографія; за формою – колонкова, тонкошарова і паперова хроматографія; гель-фільтрація, іонообмінна хроматографія; афінна хроматографія (дуже коштовна) – «хроматографія по середству» – заснована на використанні високої специфічності зв'язування природних сполук: антитіла-антиген, лектин-рецептор, фермент-субстрат.

**Основні стадії концентрування і очистки цільового продукту:**

1. Видалення великих часток (центрифугування, сепарація).
2. Концентрування цільового продукту (екстракція, флотація, сорбція, осаджування).
3. Очистка цільового продукту (хроматографія, мембранна фільтрація, електрофорез).

### ***Виділення цільового продукту з культурального середовища:***

- відділення клітин-продуцентів (сепарація, фільтрація або флотація);
- виділення цільового продукту методом осаджування (спирти, органічні розчинники, висолювання з додаванням сульфату натрію або інші солі) або хроматографії.

### ***Групи методів концентрування і очистки продукту:***

1. *Безреагентні методи* (сепарація, центрифугування, фільтрація, хроматографія).
2. *Методи з використанням реагентів* (коагуляція, флотація, флокуляція).

Безреагентні методи дозволяють отримати чистий продукт, але досить трудомісткі, енерговитратні, не завжди високоефективні. Реагентні методи більш ефективні, але не завжди дозволяють отримати високоякісні і безпечні продукти (можуть бути токсичними).

## **Очистка цільового продукту**

Цільові продукти в промисловій мікробіології досить різноманітні: клітини, очищені молекули тощо. Вони представлені двома різновидами:

- біомасою клітин;
- виділеними метаболітами (екзометаболітами).

Для отримання біомаси клітин необхідно відділити клітини від культуральної рідини (сепарація, центрифугування, фільтрація). Культуральна рідина у випадку виділення екзометаболітів обробляється (за схемою) і з неї отримують цільові продукти у вигляді екзометаболітів. У разі, якщо культуральне середовище не використовується, воно є побічним продуктом.

Вибір способу очистки клітинної біомаси залежить від:

- характеристики клітин (розмір, маса, концентрація);
- характеристики культурального середовища (в'язкість, компоненти середовища та їх концентрація);
- область застосування (корм для тварин, харчові продукти, медицина або подальша переробка);
- рентабельність.

*Наприклад*, хлібопекарські дріжджі – сахароміцети – отримують на основі вуглеводів, концентрують флотацією, після чого клітини збирають фільтруванням на барабанних вакуум-фільтрах. Біомасу збирають з фільтру, пресують і отримують живу біомасу клітин, які здатні зброджуватися.

У разі необхідності очищення біомаси дріжджів, яку вирощують на метанолі, першим етапом очистки є сепарація. Клітини розрізняються за розмірами і масою, тому для отримання біомаси дріжджів 80–90 % чистоти сепарацію необхідно проводити 2–3 рази.

Очистка є досить складною якщо необхідно виділити дрібні клітини або спори бактерій. У цьому випадку вміст реактора упарюють за умов, що забезпечують біологічне збереження клітин (низька температура і вакуум).

Застосовують декілька стадій очистки, що дозволяє отримати продукт у чистому вигляді. Кількість стадій і способи очистки індивідуальні для кожного продукту. Так, наприклад, при отриманні амінокислот, цільовий продукт можна виділити тільки шляхом кристалізації із розчинів, що попередньо очищують, використовуючи хроматографію (катионообмінну з підбором рН середовища). При отриманні ферментів (що містяться в культуральному середовищі) застосовують екстракцію, осаджування з розчину, вилуговування, ліофілізацію.

Останнім часом найчастіше застосовують послідовну ультрафільтрацію крізь мембрани з необхідним розміром пор.

Досить часто в якості цільового продукту використовують **клітинні метаболіти** (гормони, інтерферон та інші БАР, які отримують біотехнологією рекомбінантних ДНК). Першим етапом у виділенні метаболітів клітин – порушення клітинних оболонок за допомогою детергентів (дезінтеграція біомаси). Для цього застосовують методи: механічні, хімічні, ферментативні, комбіновані.

- механічні – гомогенізація, ультразвукова обробка, заморожування-танення;
- хімічні – застосування різних розчинників.

### **Стабілізація і фасування цільового продукту**

Як вже було зазначено, вимоги до цільового продукту залежать від області застосування. Так, у разі використання біомаси в тваринництві в якості вітамінно-білкової добавки, вона висушується і фасується в мішки.

Якщо цільовий продукт використовується в якості харчових добавок, то він повинен пройти мікробіологічний контроль, оцінку специфічної поживної цінності й обґрунтування термінів зберігання. Стабілізація цільового продукту повинна вирішувати декілька завдань:

- забезпечення стерильності;
- збереження стабільності;
- рентабельність і зручність під час транспортування.

Найбільш поширеними способами стабілізації є:

- кристалізація;
- висушування – використовуються розпилювальні та вакуумні системи висушування продукту;
- заморожування з використанням кріопротекторів (гліцерину, глюкози, сахарози, лактози);
- заморожування-висушування (сублімаційна сушка), використовується для стабілізації фармацевтичних препаратів, діагностичних реагентів, які характеризуються низькою термостабільністю.

Цей спосіб стабілізації має ряд переваг перед методом заморожування-танення:

- дозволяє забезпечити дуже низький вміст вологи і високу стабільність продукту;

- продукт знаходиться в контейнері у вакуумі або енертному газі, що зводить до мінімуму окислювальні процеси.

Процес упаковки готової продукції повинен забезпечити збереження стерильності, стабільності, надійності, зручності при транспортуванні.

***Питання для самоконтролю:***

1. Сформулюйте основні завдання передферментаційного етапу мікробіологічного виробництва.
2. Які основні вимоги до продуцентів, що використовуються в мікробіологічних виробництвах?
3. Назвіть параметри, які контролюються в середовищі культивування.
4. Сформулюйте основні завдання ферментаційного етапу й особливості їх вирішення.
5. Назвіть причини втрати виробничої якості культур-продуцентів.
6. Сформулюйте основні завдання заключного етапу мікробіологічного виробництва.
7. Назвіть методи виділення цільового продукту.
8. Які способи концентрування культуральної рідини використовують у мікробіологічних виробництвах?
9. Назвіть групи методів виділення цільового продукту.
10. Охарактеризуйте групи методів очистки цільового продукту.
11. Які способи стабілізації є найбільш поширеними?

***Виберіть правильну відповідь:***

1. ***Основні завдання, що вирішуються на підготовчому етапі біотехнологічного процесу:***
  - А) підбір продуцентів;
  - Б) підбір умов культивування;
  - В) контроль умов росту культур;
  - Г) контроль якості середовища;
  - Д) контроль масо- і газообміну
2. ***Для підтримання умов стерильності культурального середовища необхідно:***
  - А) очищувати повітря за допомогою фільтрів;
  - Б) проводити аерацію свіжим повітрям;
  - В) проводити стерилізацію середовища;
  - Г) контролювати рівень піни;
  - Д) контролювати стерильність умов виробництва.
3. ***Забезпечення необхідного рівня масо- і газообміну досягається шляхом:***
  - А) перемішування культур;
  - Б) аерації;
  - В) підвищення парціального тиску кисню у газі;
  - Г) введення в біореактор інертного газу;

Д) активного піноутворення.

**4. Процес культивування, при якому до складу середовища не вводять додаткові компоненти – це:**

- А) періодичне культивування;
- Б) неперервне культивування;
- В) напівперервне культивування

**5. Умови культивування анаеробів:**

- А) постійне перемішування;
- Б) аерація;
- В) видалення кисню вуглекислою;
- Г) введення в біореактор інертного газу;
- Д) у товстому шарі середовища;

**6. Завершальний етап виробничого процесу – це:**

- А) очистка цільового продукту;
- Б) виділення цільового продукту;
- В) концентрування;
- Г) контроль якості сировини;
- Д) стабілізація та фасування.

**7. До методів концентрування продукту з використанням реагентів відносяться:**

- А) сепарація;
- Б) фільтрація;
- В) хроматографія;
- Г) коагуляція;
- Д) флотація.

**8. Для стабілізації фармпрепаратів, діагностичних реагентів, які характеризуються низькою термостабільністю, використовують:**

- А) кристалізацію;
- Б) сушку;
- В) заморожування з використанням кріопротекторів;
- Г) заморожування-висушування (сублімаційна сушка).

**9. Методи відділення клітин-продуцентів із культуральної рідини:**

- А) сепарація;
- Б) фільтрація або флотація;
- В) хроматографія;
- Г) осаджування.

**10. Зараження «чистої культури» іншими культурами бактерій чи грибів – це:**

- А) аутоелекція;
- Б) контамінація;
- В) інокуляція.



## Тематичний розділ 2. Мікробіологічне виробництво біологічно активних речовин і продуктів харчування

### Тема 5. Мікробіологічне виробництво біологічно активних речовин і препаратів

**Мета:** сформувати знання про використання мікроорганізмів для виробництва гормонів, вакцин та інших лікувальних засобів; шляхи підвищення біосинтезу антибіотиків.

#### План

1. Виробництво вітамінів, каротиноїдів і кормових препаратів вітамінів.
2. Виробництво ферментів і ферментних препаратів.
3. Виробництво антибіотиків.
4. Використання мікроорганізмів для виробництва гормонів і лікарських препаратів.

**Основні терміни і поняття:** біологічно активні речовини, антибіотики, вітаміни, вакцини, гормональні препарати, каротиноїди, кормові препарати, бактерицидна дія, бактеріостатичний 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.

#### 5.1. 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 **B<sub>12</sub>** (ціанкобаламін), **B<sub>2</sub>** (рибофлавін), ергостерин, каротиноїди.

Світове виробництво **вітаміну B<sub>12</sub>** становить 9–11 т/рік, з них 6,5 т використовують для медичних цілей, а решту – для тваринництва. Основними

продуцентами вітаміну  $B_{12}$  є пропіоновокислі бактерії – *Propionibacterium freudenreichii* та *Pseudomonas denitrificans*.

Сировиною для культивування продуцентів вітаміну  $B_{12}$  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  $B_{12}$  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  $B_{12}$  – 5,6 диметилбензімідазол. Без внесення цієї сполуки бактерії синтезують кобінамід і псевдовітамін  $B_{12}$  (азотистою основою є аденін), які не виявляють біологічної активності та не мають практичної цінності.

2. Через 72 години в клітинах нагромаджується  $B_{12}$  і ферментацію завершують. Проводять сепарування біомаси і екстракцію вітаміну з неї водою, підкисленою до рН 4,5–5,0 при 85–90<sup>0</sup>С протягом 60 хв. Як стабілізатор додають розчин 0,25 %  $NaNO_2$ . За таких умов вітамін  $B_{12}$  переходить у розчин.

3. Водний розчин охолоджують, доводять рН до 6,8–7,0 50 %  $NaOH$ . Для коагуляції білків до розчину додають  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$  і безводний  $FeCl_3$ , 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<sup>0</sup>С. 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 В<sub>12</sub> 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 В<sub>2</sub>) отримують за допомогою мікробіологічного синтезу, але основну частку виробництва становить хімічний синтез.

Промисловими продуцентами **вітаміну В<sub>2</sub>** 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, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, СаСО<sub>3</sub>, NaCl. Середовище стерилізують при 120–122<sup>0</sup>С протягом години. Культуру культивують періодичним способом у аеробних умовах при температурі 28–30<sup>0</sup>С до початку спороутворення. За таких умов утворюється 12 мг/мл вітаміну.

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

Рибофлавін використовують для лікування захворювання печінки і підшлункової залози, для вітамінізації деяких сортів хліба. Наявність вітаміну В<sub>2</sub> у кормах значно підвищує яйценосність курей, виживання курчат і ваговий приріст, тому препарати В<sub>2</sub> входять до складу комбікормів.

**Кормовий препарат рибофлавіну** – продуцент *Eremothecium ashbyii*. Ферментацію проводять глибинним способом у ферментерах за температури 28–30<sup>0</sup>С, 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 **В<sub>2</sub>**, 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 С:Н 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 В<sub>2</sub>).

## 5.2. 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.

Таблиця 5.1

**Ферменти, що виробляють у промисловості, та їх продуценти**

<b>Ферменти</b>	<b>Продуценти</b>
А-амілаза	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. orizae</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>Kluveromyces</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 – солому, висівки тощо.

У якості джерела вуглецю використовують кукурудзяне або пшеничне борошно, крохмаль, глюкозу, лактозу. Крохмаль є індуктором для  $\alpha$ -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. Сухой 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 м<sup>3</sup>/хв. При роботі з бактеріальними продуцентами потрібні механічні мішалки – 1-3 кВт/м<sup>3</sup>, а при роботі з міцеліальними продуцентами – 4–6 кВт/м<sup>3</sup>. 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 фільтрують, центрифугують 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.

### 5.3. Виробництво антибіотиків

До антибіотиків відносяться низькомолекулярні речовини, що різняться за хімічною структурою. Спільним для цих сполук є те, що вони є продуктами життєдіяльності мікроорганізмів, які в малих концентраціях специфічно порушують ріст мікроорганізмів і/або злоякісних пухлин.

Більшість антибіотиків відносяться до вторинних метаболітів. Їх також, як токсини й алкалоїди, неможна віднести до суворо необхідних для забезпечення росту мікроорганізмів речовинами. За цією ознакою вторинні метаболіти відрізняються від первинних.

Характерною особливістю розвитку більшості продуцентів антибіотиків є двофазність. У першій фазі розвитку культури спостерігається інтенсивне нагромадження біомаси продуцента, у другій – синтез антибіотика. Біосинтез антибіотиків, як і інших вторинних метаболітів, як правило відбувається в клітинах, що пройшли стадію інтенсивного росту (трофофазу), тобто у мікроорганізмів, які припинили ріст (ідіофаза). У зв'язку з цим антибіотики відносять до метаболітів-іділітів.

Біологічна роль їх у забезпеченні життєдіяльності клітин-продуцентів залишається до цього часу не вивченою. Вважається, що вони в несприятливих умовах стримують ріст конкуруючих мікроорганізмів, забезпечуючи тим самим більш сприятливі умови для виживання мікропродуцентів того чи іншого антибіотика. Значення процесу антибіотикоутворення в життєдіяльності мікробної клітини підтверджується тим, що у стрептоміцетів близько 1 % геномної ДНК відводиться на долю генів, що кодують ферменти біосинтезу антибіотиків, які протягом більшої кількості часу можуть не експресуватися.

Відомо близько 5000–6000 антибіотиків, продуцентами яких є в основному 6 родів грибів, три роди актиноміцетів (майже 4000 різноманітних антибіотиків) і два роди бактерій (близько 600 антибіотиків). Із міцеліальних грибів особливу увагу потрібно звернути на плісєневі гриби, які є продуцентами так званих лактамних антибіотиків (пеніцилінів і цефалоспоринів). Більша частина синтезуючих актиноміцетами антибіотиків, включаючи тетрацикліни синтезується родом *Streptomyces*.

Із відомих 5000-6000 природних антибіотичних речовин для реалізації споживачам виробляється тільки близько 100.

Пріоритет у відкритті антибіотиків належить видатному англійському мікробіологу О. Флемінгу (1929 р.). У фільтраті бульйонної культури плісєневого гриба *Penicillium notatum* він виявив антибіотик, який знищував культуру золотистого стафілокока. Цей антибіотик був названий «пеніциліном» від назви гриба-продуцента. У чистому вигляді пеніцилін виявився нестійким, тому Флемінгу не вдалося виділити його з фільтрату. У вигляді солі його виділили англійські хіміки Г. Флорі і Дж. Чейн у 1940 році.

У теперішній час багато антибіотиків отримують промисловим способом. Відомо понад 2000 антибіотиків, але враховуючи високу токсичність більшості з них для людини, використовують лише близько 50.

Продуцентами антибіотиків є:

- бактерії (граміцидин, бацитрацин, едеїн, тиротрицин, субтилін);
- актиноміцети (стрептоміцин, тетрациклін, мономіцин, левоміцетин, ністатин);
- гриби (пеніцилін, цефалоспорини, грізеофульвін, мікроцид, фумагілін).

Із міцеліальних грибів особливу увагу потрібно звернути на плісєневі гриби, які є продуцентами так званих лактамних антибіотиків: пеніцилінів і цефалоспоринів. Найбільш активними продуцентами антибіотиків є актиноміцети роду *Streptomyces* (тетрациклін).

Антибіотики класифікуються за трьома основними ознаками: за спектром і спрямованістю біологічної дії, за хімічною структурою та за молекулярним механізмом дії на мікробну клітину.

***За спектром дії*** розрізняють антибіотики вузького і широкого спектру:

- антибіотики вузького спектру дії пригнічують ріст певної групи мікроорганізмів (бензилпеніцилін, еритроміцин, грізеофульвін, новобіцин), активні переважно до грампозитивних мікроорганізмів;



- антибіотики широкого спектру дії (цефалоспорини, тетрацикліни, трихотецин) пригнічують ріст і розмноження грампозитивних і грамнегативних форм бактерій.

**За ефектом протимікробної дії** антибіотики поділяють на:

- бактерицидні, що спричиняють загибель певних видів мікроорганізмів;
- бактеріостатичні, що пригнічують ріст і розмноження мікроорганізмів, але не знищують їх.

**За спрямованістю дії** антибіотики поділяють на чотири основні групи:

- антибактеріальні (більшість відомих антибіотиків);
- протигрибкові (ністатин, леворин);
- противірусні (інтерферон, інтерлейкіни);
- протипухлинні (рубоміцин, актиноміцин).

**За молекулярним механізмом дії** антибіотики поділяють на групи залежно від мішені в бактеріальній клітині:

- порушують синтез клітинної стінки бактерій (пеніциліни, ристоміцин, новобіоміцин). Порушуючи синтез пептидоглікану вони сприяють перетворенню нормальної бактеральної клітини в L-форму.
- порушують синтез білків на рівні 70S рибосом (тетрацикліни, макроліди, левоміцетин);
- пригнічують синтез білків у бактеріальній клітині і порушують трансляцію генетичного коду (аміноглікозиди);
- пригнічують синтез нуклеїнових кислот, трансляцію і реплікацію ДНК (актиноміцини, міаміцин);
- порушують цілісність цитоплазматичної мембрани бактерій (поліміксини), протигрибкові (ністатин);
- пригнічують окисно-відновні ферменти у мікобактерій (стрептоміцин), активність декарбоксилази стрептококів, найпростіших, колі-бактерій (хлортетрациклін).

До антибіотиків рослинного походження належать **фітонциди**, які використовують у медицині та рослинництві, а також **фітоалексини** – речовини, які утворюються в тканинах вищих рослин унаслідок потрапляння туди паразитів.

Антибіотиками тваринного походження є лізоцим, еритрин, екмолін, спермін, спермідин тощо. Найбільш ефективний з них – **інтерферон**, який належить до антибіотиків широкого спектру дії.

## Біотехнологія виробництва антибіотиків

Промислове виробництво антибіотиків включає кілька стадій:

1. Виготовлення середовища для культивування продуцента і посівного матеріалу. Для кожного продуцента використовується своє оптимальне середовище, яке забезпечує ріст продуцента і максимальне утворення антибіотика, містить доступні та дешеві компоненти, забезпечує застосування економічно вигідних способів виділення і очищення антибіотика. У деяких випадках для значного підвищення біосинтезу антибіотика в середовище вносять попередників синтезу певного антибіотика.

2. Біосинтез антибіотика. Ферментацію проводять у спеціальних ферментерах, які забезпечують оптимальні умови для росту продуцента і максимальне утворення антибіотика.

3. Попереднє оброблення культуральної рідини. Залежно від того, виділяється антибіотик у культуральну рідину частково чи є в середині клітин, використовують різні способи його виділення. Для антибіотиків, які виділяються з культуральної рідини, застосовують методи екстракції розчинниками, осадження або сорбції іонообмінними смолами. Внутрішньоклітинні антибіотики екстрагують органічними розчинниками. Відділення розчину від біомаси та інших баластних речовин проводять методом фільтрації або центрифугуванням.

4. Виділення і очищення антибіотика. Основними методами є екстракція, осадження, сорбція на іонообмінних матеріалах, упарювання, сушіння.

5. Отримання готової продукції, приготування лікарських форм, фасування. До антибіотиків, що використовують у медицині, ставлять високі вимоги (високий ступінь очищення, стерильність препарату тощо), тому стадії очищення і стандартизації проводять у стерильних умовах. Найчастіше для сушіння використовують ліофілізацію при температурі  $-8, -12^{\circ}\text{C}$ .

Готовий продукт піддають біологічному і фармакологічному контролю. Біологічний контроль включає визначення стерильності, фармакологічний – токсичності, пірогенності, токсикогенності тощо. Встановлюють максимальну дозу антибіотика, дози, що викликають повну і 50 % загибель експериментальних тварин. Готова форма лікарського засобу надходить до споживача із зазначенням біологічної активності і дати виготовлення.

**Антибіотики немедичного призначення**, що застосовують у сільському господарстві, одержують також в умовах стерильності, проте готовий продукт – це висушена біомаса продуцента або культуральне середовище, яке містить також біологічно активні речовини (вітаміни, ферменти, амінокислоти).

Для виробництва одного з найбільш розповсюджених антибіотиків – пеніциліну, використовується високопродуктивний промисловий штам *Penicillium notatum* (syn. *chrysogenum*). Його культивують у 100 – 1000-літрових ємностях – ферментерах, у присутності фенілоцтової кислоти на багатому

поживному середовищі. Для забезпечення безперервного виходу пеніциліну декілька ферментерів працюють у змінному режимі.

По закінченні ферментації культуральну рідину відокремлюють фільтруванням, клітини плісняви промивають. Із одержаного фільтрату промиванням за допомогою бутанолу і джерела іонів калію в спеціальних установках-кристалізаторах одержують кристалічну калієву сіль пеніциліну 99,5 % чистоти. Виділений і очищений антибіотик пеніцилін є вихідною речовиною для наступних хімічних модифікацій. Оброблений ферментом пеніцилінамідазою (продуцентом якого є спеціальний бактеріальний штам), пеніцилін у результаті видалення із молекули бензольної групи при 37<sup>0</sup>С у водному середовищі перетворюється в 6-амінопеніцилову кислоту (6-АПК). Ця кислота як антибактеріальний засіб має слабку активність, однак, структура ядра 6-АПК є зручною основою для модифікаційних маніпуляцій, у результаті яких, при приєднанні бічних груп антибактеріальна ефективність препарату значно зростає.

Отримання 6-амінопеніцилової кислоти (6-АПК) хімічним синтезом є досить складним завданням. Отримання нових аналогів пеніциліну пов'язано зі зміненням його бічного ланцюга при збереженні цілісності «ядра» антибіотика, яким є 6-АПК. Найпростіший шлях отримання антибіотиків цього класу – отримання 6-АПК з подальшим ацилюванням її аміногрупи з отриманням напівсинтетичних аналогів. У теперішній час для отримання 6-АПК використовують іммобілізовані бактеріальні клітини, які містять пеніцилінамідазу, або чистий фермент пеніцилінамідазу. Більшість 6-АПК отримують за допомогою іммобілізованих ферментів.

Більшість антибіотиків добре розчинні в органічних кислотах і нерозчинні у воді. Для отримання антибіотиків, як правило використовують екстракцію, яку проводять у декілька стадій. На першій стадії із водної фази переводять сполуки в органічну фазу, потім з цієї фази знову переводять у водну фазу, при цьому забезпечується як концентрування, так і очищення цільового продукту.

При отриманні пеніциліну (в 1 л поживного середовища міститься 35 г антибіотика) видаляють біомасу міцелію фільтруванням. Оскільки рН пеніциліну знаходиться у діапазоні 2,5–3,1, то культуральне середовище доводять до рН 2,0-3,0, після чого проводять екстракцію органічними розчинниками. Для цього використовують систему культуральне водне середовище-амілацетат (або бутилацетат) у співвідношенні 10:1 (v/v)/ При цьому в органічну фазу переходить майже весь пеніцилін. Для додаткового очищення проводять повторну екстракцію водним розчином фосфатного буферу (рН 5-7,5). Антибіотик отримують у вигляді натрієвої солі осадженням із водно-бутанолової суміші.

Крім пеніцилінів і цефалоспоринів до  $\beta$ -лактамних антибіотиків належать цефаміцини, продуцентами яких є актиноміцети, що відносяться до роду стрептоміцетів (*Streptomyces*).

## Шляхи підвищення біосинтезу антибіотиків

Існує два способи підвищення біосинтетичної активності продуцентів антибіотиків:

1. Отримання з вихідних штамів мутантних форм, які мають підвищену активність до синтезу антибіотика.
2. Підбір умов культивування, найбільш сприятливих для максимального утворення антибіотиків.

Виділяють декілька шляхів підвищення ефективності штамів-продуцентів антибіотиків:

1. **Спонтанні мутації (класичний).** У той час, коли встановили антибактерійну дію пеніциліну і можливість його використання в якості лікарського засобу (Х.У. Флорі, Е.Б. Чейн та ін., 1941), продуктивність лабораторного штаму плісені (2 мг препарату на 1 л культуральної рідини) була недостатньою для налагодження промислового виробництва антибіотика. Багаторазовими систематичними впливами на вихідний штам *Penicillium chrysogenum* такими мутагенами як рентгенівське та ультрафіолетове опромінення, азотистий іприт у сполученні зі спонтанними мутаціями і відбором найкращих продуцентів, вдалося збільшити продуктивність гриба в 10000 разів і довести концентрацію препарату в культуральній рідині до 2 %.

Шлях підвищення ефективності штамів-продуцентів антибіотиків, заснований на спонтанних мутаціях, що став класичним, не дивлячись на трудомісткість і дуже великі витрати часу, використовується до цього часу. Антибіотик, на відміну від білка, не є продуктом вираження певного гену, біосинтез антибіотика відбувається в результаті спільної дії 10-30 різних ферментів, які кодується відповідною кількістю різних генів. Крім того, для багатьох антибіотиків, мікробіологічне виробництво яких налагоджене, молекулярні механізми їх біосинтезу до цього часу не вивчені. Полігенний механізм, на якому базується біосинтез антибіотиків, є причиною того, що зміни окремих генів не можуть бути успішними.

2. **Генноінженерний підхід** передбачає конструювання продуцентів з використанням плазмід у якості вектора для створення рекомбінантних ДНК, які включають гени, що контролюють біосинтез ферментів, які каталізують реакції синтезу антибіотиків, поки встановлено тільки у продуцентів метиленоміцину. В інших випадках плазмідам відводиться роль регуляторів активності генів, локалізованих у хромосомах. Однак у більшості штамів мікроорганізмів, що використовуються для отримання антибіотиків у промислових масштабах, плазміді поки виявити не вдалося.

3. **Мутасинтез (мутаційний біосинтез).** Мутанти мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків інколи утворюють біологічно активні проміжні продукти якогось певного шляху біосинтезу антибіотика або речовини, які можуть бути корисними як попередники при створенні нових аналогів антибіотиків. «Блоковані» мутанти цього типу не здатні утворювати потрібний антибіотик, якщо у середовищі культивування немає метаболічного

попередника, який в нормі утворюється за участю фермента. Оскільки ферменти, що беруть участь у вторинному метаболізмі, часто мають відносно низьку субстратну специфічність, то аналоги попередників антибіотиків можуть бути легко перетворені мутантом в аналоги самого антибіотика в ході мутаційного біосинтезу.

#### 5.4. Використання мікроорганізмів для виробництва гормонів і лікарських препаратів

За допомогою мікроорганізмів можна отримати речовини, які не належать до природних метаболітів мікроорганізмів. Це **стероїдні гормони** і окремі поліпептиди людини. У промислових умовах випускають **кортикостероїди**: кортизон, гідрокортизон, преднізон, преднізолон, дексаметазон, які застосовують для лікування гормональних порушень і хвороб шкіри; **андрогени й естрогени** – тестостерон та естрадіол, які використовують як протизаплідні засоби тощо.

Сировиною для культивування мікроорганізмів-модифікаторів гормонів є складні спирти – стероли, присутні у відходах соєвої олії.

**Кортизон** (секретується наднирками людини) синтезували хімічним шляхом. У 1952 р. було виділено штам гриба *Rhizopus arrhizus*, здатний гідроксилувати і вводити у третє положення атом кисню другий стероїд – прогестерон, що надалі перетворюється у кортизон. Завдяки цій здатності з 37 стадій хімічного синтезу кортизону залишилось 11, а ціна знизилась у 33 рази.

**Інсулін, соматостатин, соматотропін, інтерферон людини** синтезовані генетично сконструйованими штамми *E. coli*, *Bacillus subtilis*.

До лікувальних засобів, які отримують за допомогою мікроорганізмів, належать **вакцини і препарати бактеріофагів**.

Створені **вакцини** можна розподілити на чотири групи:

1. Живі вакцини – це ослаблені або генетично змінені збудники захворювань. До них належать: спиртова черевнотифозна вакцина на основі *Salmonella typhii*, збагачена Ві-антигеном; вакцина БЦЖ (BCG) – на основі *Mycobacterium bovis*; туляремійна вакцина; вакцина проти кору та поліомієліту.
2. Вакцини отримані з убитих різними способами (нагріванням, оброблення хімічними речовинами – фенолами, спиртом, ацетоном тощо) збудників захворювань (вакцини проти вірусів грипу).
3. Анатоксини – це токсини – продукти життєдіяльності мікробів, оброблені формаліном і прогріті високою температурою (анатоксин проти токсину *Clostridium tetani*).
4. Штучні вакцини, що містять різні компоненти мікробних клітин.

Етапи створення вакцин:

1. Накопичення біомаси збудника або продуктів їх життєдіяльності.
2. Інактивація мікроорганізмів.
3. Концентрування.
4. Очищення та ліофілізація.

Для створення вакцин часто використовують методи генної інженерії. Виділивши антиген, або створивши його штучно, можна одержати вакцину. Вже отримано вакцини проти грипу, мишачого тифу, холери свиней.

Створення вакцин за допомогою методів генної інженерії ведеться в кількох напрямках:

1. Метод, що базується на вмонтовуванні гена антигену в мікроорганізм-продуцент, його вирощування і створення на його основі вакцини (**вірус гепатиту А і В, герпесу**);
2. Метод, що базується на одержанні штамів, які продукували б одночасно кілька антигенів – полівалентні вакцини – (вакцини, що містять антигени **гепатиту А і В з вірусом грипу і герпесу**).

Незалежно від способу одержання, всі вакцини мають відповідати таким вимогам:

1. Бути стерильними, не містити жодних агентів, крім ослаблених, вбитих збудників чи компонентів.
2. Бути нешкідливими;
3. Бути стандартними за імуногенністю і антигенністю (здатність антигену чи антигенів викликати утворення антитіл).
4. Мати помірну реактогенність.

Лікувально-профілактичні **препарати бактеріофагів** мають специфічність до патогенних і умовно-патогенних бактерій. Застосовують для лікування деяких інфекційних захворювань, оскільки вони не впливають на нормальну мікрофлору (препарати проти кишкових інфекцій: дизентерії, черевного тифу, сальмонельозу, ешерихіозів тощо).

Технологічна схема виробництва препаратів бактеріофагів:

1. Вибір штамів мікроорганізмів для виробництва даного виду фага.
2. Одержання посівних культур.
3. Приготування серій рідкого бактеріофага.
4. Контроль готового препарату на стерильність, нешкідливість, літичну активність.
5. Упаковка препарату.

### ***Питання для самоконтролю:***

1. Як здійснюється мікробіологічний синтез вітамінів В<sub>2</sub> і В<sub>12</sub>?
2. Що таке кормові препарати вітамінів і як їх отримують?
3. Які ферменти одержують за допомогою мікробного синтезу?
4. Охарактеризуйте основні стадії виробництва ферментів.
5. Які антибіотики отримують за допомогою плісневих грибів?
6. Назвіть антибіотики, які отримують за допомогою бактерійних клітин.
7. Назвіть антибіотики немедичного призначення.
8. Які лікувальні засоби отримують за допомогою мікроорганізмів?
9. Розкрийте механізми біологічної дії антибіотиків.

10. Охарактеризуйте основні стадії отримання антибіотиків.
11. Назвіть шляхи підвищення біосинтезу антибіотиків.
12. Які лікувальні засоби, крім антибіотиків, отримують за допомогою мікроорганізмів?

**Виберіть правильну відповідь:**

**1. За допомогою мікробіологічного синтезу одержують препарати:**

- А) вітаміну B<sub>12</sub> та B<sub>2</sub>;
- Б) вітаміну А, вітаміну B<sub>2</sub>, ергостерину;
- В) ергостерину, каротиноїдів;
- Г) біотину та вітаміну К.

**2. Основними продуцентами вітаміну B<sub>12</sub> є:**

- А) *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* та *Pseudomonas denitrificans*;
- Б) *Eremothecium ashbyii*, *Ashbyii gossypii*;
- В) *Aspergillus* і *Penicillium*.;
- Г) *Candida famata*.;
- Д) *Bacillus subtilis*.

**3. Як називають ферментні препарати, що поряд із основним ферментом містять ряд інших?**

- А) складними;
- Б) простими;
- В) комплексними.

**4. Для розділення і очищення ферментів, після концентрування фільтратів, центрифугатів і екстрактів використовують методи:**

- А) вакуум-випарювання, ультрафільтрація, осадження органічними розчинниками;
- Б) вакуум-випарювання;
- В) осадження органічними розчинниками;
- Г) діаліз;
- Д. адсорбцію за допомогою гелів кальцій фосфату, алюміній гідроксиду й афінних адсорбентів.

**5. З якою метою при стабілізації деякі ферменти капсулюють?**

- А) фермент захищений від зовнішнього впливу;
- Б) фермент використовують багаторазово;
- В) усувається алергенний вплив ферменту на працівників.

**6. Які мікроорганізми продукують антибіотики поліміксини і бацитрацини?**

- А) *Bacillus polymyxa*;
- Б) *Bacillus licheniformis*;
- В) *Streptomyces aureofaciens*;
- Г) *Penicillium chrysogenum*;
- Д) *Penicillium notatum*..

**7. Для яких позаклітинних ферментів налагоджене промислове виробництво?**

- А) протеази, амілази;
- Б) інвертаза, глюкозооксидаза;
- В) каталаза, целюлаза;
- Г) дегідрогенази, пероксидаза;
- Д) целюлази, ліпази.

**8. Який фермент відповідно є основним у ліполітичних ферментних препаратах?**

- А) дегідрогенази;
- Б) протеази;
- В) ліпази;
- Г) амілази;
- Д) глюкозидази.

**9. Екзогенні (екзоцелюлярні) ферменти – це:**

- А) ферменти, які мікроорганізми виділяють у культуральну рідину;
- Б) ферменти, що мікроорганізми нагромаджують внутрішньоклітинно.

**10. Яку фізіологічну роль має продукування антибіотиків для продуцентів?**

- А) пригнічують функцію 50S-субодиниць рибосом;
- Б) викликають мікробіцидний або мікробостатичний ефект;
- В) забезпечують виживання продуцентів за умов конкуренції.

**Виконайте завдання:**

Заповніть таблицю «Властивості деяких антибіотиків».

Клас хімічних сполук	Назва	Продуцент	Спектр дії	Механізм дії

**Теми рефератів:**

- Ферменти мікроорганізмів, їх отримання і використання в промисловості?
- Мікробіологічний синтез гіберелінів.
- Обасті застосування вітамінів мікробіологічного походження.
- Історія відкриття антибіотиків.
- Антибіотики немедичного призначення.
- Використання мікроорганізмів для виробництва гормонів та інших лікувальних засобів.
- Біотехнологія отримання вакцин.



## Тема 6. Промислове виробництво амінокислот, органічних кислот

**Мета:** сформувати знання про особливості біотехнології отримання амінокислот, органічних кислот, оцту за допомогою мікроорганізмів-продуцентів у промислових умовах; шляхи підвищення їх біосинтезу.

### План

1. Біосинтез амінокислот.
2. Промислове виробництво органічних кислот.

**Основні терміни і поняття:** ауксотрофні мутанти, прототрофні мутанти, регуляторні мутанти, узгоджене інгібування.

### 6.1. Виробництво амінокислот

Амінокислоти широко використовують як добавки до продуктів харчування, приправи, підсилювачі смаку, добавки до кормів, а також як сировину для фармацевтичної і парфюмерної промисловостей. Усі амінокислоти, з яких складаються білки, є L-формами. З 20 амінокислот 8 (ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан, валін, фенілаланін) є незамінними для людини. Для сільськогосподарських тварин цей список доповнюють гістидин і аргінін, а для молодняка птиці – ще й пролін.

Одержання амінокислот можливе декількома способами: хімічним синтезом, гідролізом природної білкової сировини і в біотехнологічних (мікробіологічних) процесах. Сучасними методами хімічного синтезу можна синтезувати D- і L-ізомери амінокислот, проте D-ізомери амінокислот не засвоюються організмом людини і можуть бути токсичними. Мікроорганізми синтезують тільки L-ізомери амінокислот. Біотехнологічні процеси включають як пряму мікробну ферментацію, так мікробіологічний або ферментативний синтез із попередників.

На сучасному етапі в практику впроваджують комбіновані хіміко-мікробіологічні способи одержання амінокислот. Спочатку хімічним синтезом одержують суміш D- і L-ізомерів амінокислот, яку пропускають через колонки з іммобілізованими мікробними ізомерами, які перетворюють D-ізомери в L-ізомери. Вибір способу одержання продукту залежить від економічної ефективності.

### Біосинтез глутамінової кислоти

**Глутамінова кислота** не належить до незамінних амінокислот, але на її основі відбувається синтез багатьох фізіологічно активних сполук, необхідних для нормального функціонування організму людини і тварин. Це перша амінокислота, яку отримали за допомогою мікробіологічного синтезу.

Глутамат натрію широко застосовують як смакову речовину в харчовій промисловості і кулінарії.

Продуцентами L-глутамінової кислоти є бактерії родів *Corynebacterium* (*C. glutamicum*), *Brevibacterium* (*B. flavum*) та деякі штами із родів *Micrococcus*, *Microbacterium*.

Надсинтез у «диких» штамів зумовлений особливими фізіологічними умовами, коли ріст клітин гальмується. Такі умови для *Corynebacterium glutamicum* створюються при дефіциті в середовищі біотину, або в присутності деяких антибіотиків і детергентів. При цьому в клітинній стінці відбуваються структурні і функціональні зміни, які призводять до їхньої надмірної проникності й виділення глутамінової кислоти в середовище (до 50 % використаного джерела вуглецю).

В основі біосинтезу глутамінової кислоти лежать два біохімічних принципи:

1. нестача ферменту  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази;
2. блокування біосинтезу біотину.

Селекційна робота з продуцентами проводиться в таких напрямках:

- одержання мутантів зі зниженою  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогеназною активністю;
- одержання регуляторних мутантів зі зниженою чутливістю ферменту L-глутаматдегідрогенази до інгібування кінцевим продуктом;
- одержання мутантів, здатних утворювати амінокислоту в присутності надлишку біотину.

При біосинтезі глутамінової кислоти безпосереднім метаболітом-попередником є 2-оксоглутарат, який утворюється в циклі трикарбонових кислот (ЦТК).

При промисловому культивуванні ростучих культур клітин-продуцентів глутамінової кислоти джерелом вуглецю є м'яса або гідролізати крохмалю. Джерелом азоту є сечовина, рідше амоній хлорид або сульфат, рН розчину має бути у межах 6,8–7,8. Дефіцит азоту в середовищі знижує вихід глутамінової кислоти і сприяє нагромадженню у великій кількості  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти.

Всі продуценти глутамінової кислоти є біотинзалежними, а деякі з них і тіамін залежні, проте, кількість вітамінів не повинна перевищувати 2-5 мкг/л середовища, адже висока концентрація цих вітамінів занадто стимулює ріст клітин, сприяє підвищеному синтезу аланіну, молочної, янтарної, аспарагінової кислот, а вихід глутамінової кислоти значно знижується.

У Японії одержують глутамінову кислоту на м'ясних середовищах за допомогою мутантів, у яких нагромадження амінокислоти контролюється температурним режимом (вихід глутамату 20–26 г/л).

Схема отримання глутамінової кислоти на середовищі з глюкозою або з гідролізованим крохмалем:

1. Культивування. Здійснюють у ферментері, після чого біомасу видділяють від культуральної рідини центрифугуванням, потім проводять вакуум-випаровування до вмісту сухих речовин 40–50 %.

2. Кристалізація глутамінової кислоти. При цьому концентрат підкислюють хлоридною кислотою до рН 3,2; охолоджують до  $-15^{\circ}\text{C}$  і відділяють кристали глутамінової кислоти зі ступенем чистоти 80 %.

3. Повторна кристалізація (отримані кристали розчиняють у воді (1:5) і фільтрують, отримують глутамінову кислоту зі ступенем чистоти 99 %. Готовий продукт висушують.

### Біотехнологія отримання лізину

**Лізин** в організмі людини і тварин не синтезується, але він є не тільки структурним елементом білка, але й виконує ряд найважливіших біохімічних функцій: сприяє секреції травних ферментів, є попередником каротину та оксилізину, забезпечує транспортування кальцію і стронцію в клітини, поліпшує загальний баланс азоту в організмі, визначає біологічну цінність білка тощо.

Синтез L-лізину у мікроорганізмів здійснюється різними шляхами. Дріжджі, гриби і мікрободорості синтезують лізин з  $\alpha$ -кетоглутарової кислоти через  $\alpha$ -аміноадипінову кислоту.

У бактерій біосинтез L-лізину здійснюється із аспарагінової кислоти (аспартату) через  $\alpha$ -діамінопімелінову кислоту. Крім L-лізину, за розгалуженим шляхом з аспартату утворюються також L-метіонін, L-треонін і L-ізолейцин (рис. 6.1).

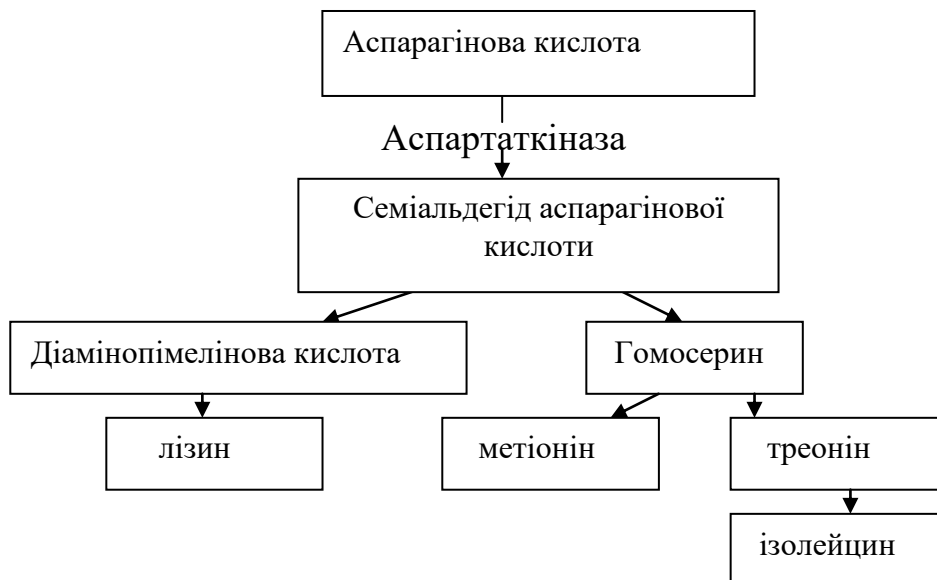


Рисунок 6.1 – Схема біосинтезу лізину у бактерій через діамінопімелінову кислоту.

Контроль за біосинтезом амінокислот групи аспартату здійснюється ферментом  $\beta$ -аспартаткіназою. Продукенти лізину *B. flavum* і *C. glutamaticum* – мають одну  $\beta$ -аспартаткіназу, активність якої регулюється шляхом **узгодженого інгібування** за принципом зворотного зв'язку треоніном і лізином. Синтез

лізину каталізує фермент дигідропіколінатсинтетаза. Спільним попередником у синтезі лізину і треоніну є напівальдегід аспарагінової кислоти (семіальдегід). У деяких штамів коринебактерій він використовується головню для синтезу треоніну, оскільки активність гомосериндегідрогенази у 15 разів вище, ніж активність дигідропіколінатсинтетази. Біосинтез лізину починається після насичення клітин треоніном, метіоніном і İzoleyцином. У зв'язку з цим для отримання клітин, здатних до надсинтезу лізину, необхідно заблокувати біосинтез зазначених метаболітів шляхом зниження активності гомосериндегідрогенази або гомосеринкінази. Таким чином, усувається накопичення гомосерину, треоніну і метіоніну. Якщо до середовища додати в необхідних для росту культури дозах треонин, метіонін або гомосерин, то відбувається інтенсивний синтез лізину.

Промислові штами-продуценти лізину – це ауксотрофні штами глутаматсинтезуючих коринебактерій (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*). Використовують три типи ауксотрофних мутантів:

1. Гомосеринові ауксотрофи з відсутньою активністю гомосериндегідрогенази.
2. Треонінові ауксотрофи, у яких пригнічена активність гомосериндегідрогенази.
3. Метіонін і треонінчутливі прототрофні штами *B. flavum*, у яких активність гомосериндегідрогенази знижена в 20–50 разів, але цей фермент забезпечує потреби клітин у гомосерині.

Створено штами р. *Brevibacterium*, що здатні забезпечувати 40 % конверсію субстрату в амінокислоту і вихід лізину на м'ясних середовищах до 40-50 г/л, а на середовищах з оцтовою кислотою – до 70 г/л.

Існує два способи біотехнологічного процесу отримання лізину за допомогою мікроорганізмів:

- одноетапний спосіб – це вирощування мікроорганізмів із надсинтезом лізину;
- двоетапний – передбачає використання синтетичних попередників, одержаних хімічним або біологічним методами та виділення ферментів, за допомогою яких здійснюється біотрансформація, другий етап – власне процес трансформації.

Схема отримання лізину на м'ясному середовищі:

1. Середовище для одержання лізину готується із м'яси, кукурудзяного екстракту, солей амонію, одно- і двозаміщеного фосфату калію. Кукурудзяний екстракт іноді замінюють дріжджовим гідралізатом, концентратом клітинного соку картоплі або витяжкою із пшеничних висівків. Після стерилізації таке середовище використовують для вирощування посівного матеріалу і для головної ферментації.

2. Спочатку культуру розмножують у колбах на качалках, потім у ферментерах об'ємом 100 і 3000 л. Кількість посівного матеріалу 5–10 % оптимальна температура 30–35°C і рН 7,4. Тривалість ферментації для кожної стадії близько 24 години. Головна ферментація триває 50–70 годин при

аналогічних режимах. Концентрація лізину в розчині 20–60 г/л, концентрація клітинної біомаси 15–20 г/л у перерахунку на суху масу. Високу концентрацію лізину 60–80 г/л можна одержати на мелясному середовищі, якщо під час ферментації вводити дробну підкормку частиною живильного середовища при дотриманні точної регуляції культивування. Мелясу можна замінити сахарозою, соком цукрового буряка, глюкозою або гідролізатом крохмалю, а також оцтовою кислотою і підняти концентрацію лізину до 100 г/л.

3. Для одержання кристалічного лізину клітинну масу центрифугують, а культуральну рідину пропускають через катіоніт КУ-2 або КВ-4-Р-2.

Лізін елюють 2,0–3,5 % розчином. Елюат упарюють у вакуумі при температурі 60°С до 1/20 – 1/70 частини вихідного об'єму, потім, за допомогою НСІ встановлюють рН 4,5–5,0; охолоджують до 14–18°С і кристалізують.

4. Після фільтрації і центрифугування кристалів одержують технічний лізін – 94–96 % лізину монохлоргидрат. Для одержання чистого лізину кристали технічного лізину піддають нагріванню в невеликій кількості води 70°С, додають активоване вугілля, перемішують і фільтрують. За допомогою НСІ встановлюють рН 4,9, розчин упарюють і кристалізують. Кристали сушать при 60°С. Одержаний лізін містить 99,9 % лізину монохлоргидрату, і 0,1 % золи і не більше 0,001 % солей важких металів.

Для кормових потреб одержують концентрат лізину. Концентрат лізину можна використовувати в рослинництві як стимулятор росту культурних рослин і атрактант ґрунтових шкідників насіння.

## 6.2. Промислове виробництво органічних кислот

Органічні кислоти використовують у харчовій і фармацевтичній, у техніці і в якості хімічної сировини. Деякі органічні кислоти отримують шляхом екстракції з природної рослинної сировини (лимонну, яблучну); інші (молочну, оцтову) – у процесах органічного синтезу. На сьогодні в промислових масштабах мікробіологічним шляхом можна отримувати понад 50 органічних кислот, проте отримують близько 20 кислот. Для технічних потреб органічні кислоти отримують хімічним шляхом; кислоти, які використовуються у фармацевтичній і харчовій промисловості – у різних біотехнологічних процесах. До таких належить виробництво лимонної, ітаконової, пропіонової, глюконової кислот; молочна і оцтова кислоти виробляються мікробіологічним і хімічним шляхами.

Біотехнологія отримання органічних кислот налагоджена в багатьох країнах. Продуцентами є різні штами плісневих грибів і бактерій. Сировиною для виробництва органічних кислот є сахароза та глюкоза, відходи різних виробництв (бурякова і тростина меляси, гідролізати деревини, крохмалевмісні матеріали).

Мікробіологічні процеси одержання органічних кислот поділяють на дві групи:

- 1) анаеробні (молочна, пропіонова);
- 2) аеробні (оцтова, лимонна, ітаконова, глюконова).

Всі органічні кислоти є проміжними або кінцевими продуктами метаболізму. Основним механізмом регуляції їх утворення є лімітація росту продуценту факторами середовища. Наприклад, утворенню таких органічних кислот, як глюконова,  $\alpha$ -кетоглутарова сприяє лімітація росту культур по азоту, тобто при надлишку в середовищі джерела вуглецю.

При одержанні лимонної кислоти на вуглеводному середовищі важливе значення має лімітація росту продуцентів по залізу і фосфору. У мелясі є багато заліза, яке на стадії приготування живильного середовища осаджують за допомогою жовтої кров'яної солі.

Для аеробних процесів факторами, що лімітують ріст може бути ступінь аерації і рН середовища. Аеробні процеси реалізують як глибинним, так і поверхневим способом ферментації, анаеробні – тільки глибинним.

### Виробництво оцтової кислоти і оцту

**Оцтова кислота** – широко використовується у харчовій, хімічній, мікробіологічній промисловості, у медицині.

Оцет у вигляді перекислового вина був відомий за 7 тис. років до нашої ери, але тільки у 1986 році Л. Пастер установив фізіологічну природу оцтовокислового бродіння, який можна викликати за допомогою оцтовокислих бактерій.

Оцтовокисле бродіння засновано на здатності оцтовокислих бактерій окислювати спирт за участі алкогольдегідрогенази до оцтової кислоти. Цей процес може бути реалізований багатьма оцтовокислими бактеріями, проте в промислових технологіях для одержання оцту використовують бактерії роду *Acetobacter*.

**Оцет** – це продукт, який містить не менше 4 % (маса/об'єм) оцтової кислоти у воді. Більшу частину оцту отримують, використовуючи розведений спирт. Процес виробництва реалізують як поверхневим, так і глибинним способами. Є два способи промислового одержання оцту:

- повільний (французький) – оцет одержують з легкого вина;
- швидкий (німецький) – зі спирту.

Щоб оцтовокисле бродіння проходило нормально, потрібно щоб цукор був перетворений в етанол, тому оцтовокислому бродінню передуює спиртове, але не з тими штамами, що використовуються у виробництві етанолу. У виробництві оцту спиртове бродіння краще за все здійснюють селекційні штами винних дріжджів (*Saccharomyces ellipsoideus*), які крім етанолу синтезують побічні продукти метаболізму, що поліпшують смак і аромат оцту.

Оцет, одержаний мікробіологічним шляхом (харчова оцтова кислота, столовий оцет), як і вино, розрізняють за сортами в залежності від зброджуваного субстрату. Відомі яблучний, виноградний, грушевий та інші сорти оцту, також бальзамічний оцет. Оцет, одержаний при бродінні, має приємний аромат і смак, які обумовлені побічними продуктами бродіння: складними ефірами (етилацетат та ін.), вищими спиртами, органічними кислотами.

Оцтова кислота була першим мікробіологічним продуктом, одержаним за допомогою іммобілізованих клітин. Протягом довгого часу застосовується адсорбування оцтовокислих бактерій на деревній стружці, деревному вугіллі, коксі та інших субстратах.

Пропускаючи розчин етанолу через генератори з іммобілізованими бактеріями, одержують 10-15 % розчин оцтової кислоти. Зі 100 літрів безводного етанолу теоретично може бути одержано 103 літри оцтової кислоти. На практиці зі 100 літрів етанолу вихід оцту рідко перевищує 90 літрів, що пов'язано з переокисленням і неповним окисленням етанолу оцтовокислими бактеріями, а також із його випаровуванням. Щорічно у світі виробляють 100 тис. т оцтової кислоти (половину одержують хімічним шляхом у вигляді технічної оцтової кислоти).

Оцтову кислоту широко використовують у харчовій промисловості. Технічну оцтову кислоту використовують для виробництва ацетону, ацетилену, синтетичних барвників, медичних препаратів (аспірин, антипірін, фенацетин), ароматизованих речовин (кумарін, ванілін), а також як субстрат для мікробіологічної біотрансформації.

Ферментацію сахарозних середовищ реалізують за допомогою двох стадій: на першій стадії за допомогою дріжджової інвертази одержують інвертазний цукор; на другій, за допомогою *Acetobacter xylinum* – оцтову кислоту. Друга стадія триває 60 годин, за цей час вуглеводи (їх міститься 6 %) зброджуються, рН зменшується до 2, на поверхні рідкої фази утворюється продукт – біофільм.

Встановлено, що продуцент оцтової кислоти із роду *Acetobacter*, розвиваючись на поверхні середовища, утворює слизову плівку, яка складається із целюлози (на 90 %) і клітин бактерій. Якщо цю плівку зняти, висушити і відповідно обробити, можна одержати досить міцні біофільми медичного призначення. Якщо опікові рани покрити таким біофільмом, вони загоюються протягом 7–8 діб.

### Одержання лимонної кислоти

**Лимонна кислота** – трьохосновна оксикислота, що міститься в деяких ягодах і фруктах, особливо в цитрусових. Лимонну кислоту завдяки її смаковим і фізико-хімічним властивостям широко використовують у харчовій промисловості при виготовленні кондитерських виробів і напоїв, а також як консервант; у фармацевтичній промисловості, при переливанні крові, для виготовлення косметичних засобів, у хімічній і текстильній промисловості. Світове виробництво лимонної кислоти становить понад 300 тис. т у рік.

Головним продуцентом у промисловому виробництві лимонної кислоти є штами плісневих грибів *Aspergillus niger*, а також *A. wentii*.

У виробництві лимонної кислоти застосовують три способи ферментації: культивування продуцентів на поверхні твердого середовища; поверхневе культивування на рідкому середовищі; глибинне культивування.

Технологія виробництва лимонної кислоти з меляси:

1. У окремому цеху вирощують посівний матеріал у вигляді спор (конідій) *Aspergillus niger*, потім розмножують його в три стадії – у пробірках, колбах і алюмінієвих кюветах. Тривалість кожної стадії 2–4 доби при температурі 32°C. Для вирощування в пробірках використовують тверде агаризоване сусло-середовище, для вирощування в колбах і кюветах – рідке поживне середовище. Під час культивування на поверхні розчину утворюється щільна плівка міцелію, яка потім вкривається конідіями. На останній стадії вирощування дозрілі й підсушені конідії збирають із кювет за допомогою спеціального вакуумного насосу. Для збільшення терміну зберігання конідії змішують з активованим вугіллям після висушування. Їх можна зберігати в такому вигляді 1–2 роки. З 10 дм<sup>2</sup> площі кювет можна одержати 3–4 г сухих конідій (площа 1-ї кювети дорівнює 8,5 дм<sup>2</sup>). Такий посівний матеріал є комерційним препаратом.

2. Лимоннокисле бродіння відбувається в камерах при 34–35°C. На полицях розміщують металеві кислотостійкі кювети висотою 7–10 см, при висоті шару, який живиться 6–12 см. До кожної з них подається свіже живильне середовище і від кожної після зброджування відводиться маса. У камері передбачена система стерильного кондиціонування повітря, яке рівномірно розподіляється по всьому об'єму середовища.

При роботі за безобмінним методом цикл бродіння закінчується через 6–8 діб. Максимальне кислотоутворення відбувається на 5-ту добу 100 г /м<sup>2</sup>/г.

Продуктивність бродильних камер можна збільшити, додаючи до міцелію свіже живильне середовище. Це можна здійснити двома методами:

1) **обмінний метод**. Він полягає в тому, що після видалення із кювет зброженого розчину і промивання міцелію стирильною водою під плівку заливають свіже стерильне середовище і продовжують процес зброджування.

2) **метод доливок**. Цей метод полягає в тому, що через 3–4 доби культивування, коли початкова концентрація цукрів із 7–10 % зменшується до 3–4 % в результаті зменшення об'єму живильного середовища, під плівку міцелію доливають свіжий розчин меляси в кількості 30–35 % від початкового об'єму. Таким чином, у ході одного циклу вдається переробити на 30–40 % більше живильного середовища.

3. У кінці бродіння культуральну рідину зливають, міцелій промивають і після висушування використовують для потреб тваринництва або для одержання ферментного препарату – пектинази. У 1 літрі культуральної рідини міститься приблизно 40–50 г/л лимонної кислоти, 3 г глюконової кислоти, 1 г щавлевої кислоти і 7 г незброженого цукру. Лимонна кислота складає 90 % від загальної маси. Її виділяють із розчину хімічним шляхом.



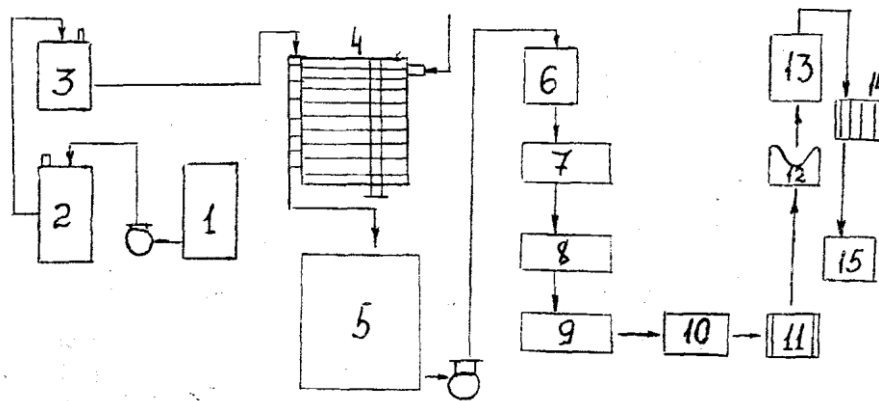


Рисунок 6.1 – Апаратурно-технологічна схема одержання лимонної кислоти:

- 1 – сховище меляси; 2 – ємність для розчинення меляси; 3 – стерилізатор;  
 4 – камера для бродіння; 5 – збірник зброженої рідини; 6 – нейтралізатор;  
 7 – фільтр; 8 – вакуум-випарювальний апарат; 9 – збірники;  
 10 – повторювальний розчинник; 11 – фільтр-прес; 12 – кристалізатор;  
 13 – центрифуга; 14 – сушарка; 15 – збірник.

Розроблено метод одержання лимонної кислоти з *n*-парафінів за допомогою *Candida lipolytica*. Це процес глибинної ферментації. Вихід лимонної кислоти складає 130–140 % від концентрації внесених парафінів. Вихід лимонної кислоти при переробці вуглеводів складає 85 %. Однак останнім часом найбільшого поширення отримала технологія синтезу лимонної кислоти з меляси.

### Виробництво яблучної кислоти

**Яблучна кислота** – дикарбонова оксикислота, яку використовують як підкислювач у харчовій промисловості. Її можна одержати з фумарової кислоти або шляхом ферментації за участю мікроорганізмів роду *Paracolobactrum*, або за допомогою іммобілізованої фумарази. Описані також способи одержання яблучної кислоти з *n*-парафінів за допомогою дріжджів.

Як відомо, у результаті хімічного синтезу утворюється рацемічна суміш DL-яблучної кислоти. L-ізомер яблучної кислоти почали одержувати із фумарової кислоти за допомогою іммобілізованої фумарази. Цей фермент каталізує приєднання до фумарової кислоти по подвійному зв'язку молекули води з утворенням L-яблучної кислоти. Для цих цілей потрібно не ізольований фермент, а клітини, що містять фумаразу.

Фірма “Танабе Сейяку” (Японія) у ролі носія клітин використовує гель карагінану – полісахарид морських водоростей. Гранули іммобілізованих клітин занурюють у колонку, через яку пропускають розчин фумарової

кислоти, при виході із колонки в розчині знаходиться L-яблучна кислота. Період напівінактивації ферменту 160 діб.

***Питання для самоконтролю:***

1. Які мікроорганізми використовують при промисловому виробництві амінокислот?
2. У чому полягає перевага мікробного синтезу амінокислот над хімічним?
3. Назвіть галузі, де використовують амінокислоти.
4. Які органічні кислоти одержують за допомогою мікробного синтезу?
5. Назвіть продуцентів органічних кислот, що використовують у промисловості.
6. Яким способом одержують лимонну кислоту?
7. Які особливості технології виробництва оцтової кислоти і оцту?

***Виберіть правильну відповідь:***

1. Для селекції мікроорганізмів-продуцентів амінокислот використовують... (виберіть найповнішу відповідь):
  - А) ауксотрофні мутанти;
  - Б) регуляторні мутанти;
  - В) генетично сконструйовані мікроорганізми;
  - Г) ауксотрофні мутанти, регуляторні мутанти, генетично сконструйовані мікроорганізми.
2. Перша амінокислота, яку отримали шляхом мікробіологічного синтезу – це:
  - А)  $\alpha$ -Глутамінова кислота;
  - Б) аспарагінова кислота;
  - В)  $\alpha$ -Кетоглутарова кислота.
3. Мікроорганізм-продуцент лимонної кислоти з м'яси:
  - А) *Candida lipolytica*;
  - Б) *Aspergillus niger*;
  - В) *Saccharomyces ellipsoideus*;
  - Г) *Brevibacterium flavum*.
4. Від активності якого ферменту залежить мікробний синтез лізину?
  - А. Глутаматсинтетази.
  - Б. Гомосериндегідрогенази.
  - В. Каталази.
5. До аеробних процесів одержання органічних кислот відноситься синтез:
  - А) молочної і пропіонової;
  - Б) оцтової і лимонної;
  - В) ітаконової і глюконової.

**6. Яка кислота була першим мікробіологічним продуктом, одержаним за допомогою іммобілізованих клітин?**

- А) оцтова;
- Б) лимонна;
- В) ітаконова;
- Г) яблучна.

**7. До мікробіологічних виробництв тонкого синтезу відносять виробництво:**

- А) етенолу;
- Б) медичних (очищених) ферментів;
- В) органічних кислот, органічних розчинників;
- Д) антибіотиків;
- Г) біохімічних реактивів.

**8. Надсинтез у «диких» штамів продуцентів L-глутамінової кислоти обумовлений:**

- А) надлишком у середовищі біотину;
- Б) дефіцитом у середовищі біотину;
- В) впливом антибіотиків;
- Г) впливом детергентів.

**9. Продуценти лізину є:**

- А) біотин залежними;
- Б) тіамін залежними;
- В) гомосерин залежними.

**10. Промислові штами *Aspergillus niger* використовують для виробництва...**

- А) лізину;
- Б) проліну;
- В) глутамінової кислоти;
- Г) лимонної кислоти.

**Виконайте завдання:**

Заповніть таблицю «Продуценти органічних кислот».

Кислота	Мікроорганізми-продуценти

**Теми рефератів:**

1. Одержання амінокислот з допомогою іммобілізованих клітин та ферментів.
2. Технологія виробництва яблучної, ітаконової кислот.
3. Виробництво оцту.

## Тема 7. Виробництво етилового спирту і розчинників

**Мета:** сформувати знання про особливості біотехнології отримання етилового спирту і органічних розчинників, мікроорганізмів-продуцентів, що використовуються в промисловому виробництві; поглибити знання студентів щодо фізіології мікроорганізмів-збудників спиртового бродіння, хімізму спиртового бродіння, засвоєних з курсу «Мікробіологія».

### План

1. Виробництво етилового спирту.
2. Використання мікроорганізмів для отримання розчинників.

**Основні терміни і поняття:** етанол, бродильні технології, дріжджі, меляса, оцукрювання сировини, ректифікація, органічні розчинники.

### 7.1. Виробництво етилового спирту

Виробництво етанолу – це найбільше біотехнологічне виробництво за витратами сировини в світі. Однак за вартістю продукту займає 3 місце серед крупнотонажних.

Етанол широко використовують у якості розчинника, як сировину для хімічного синтезу, у медицині. Етанол можна застосовувати як екстрагент і антифриз, він є субстратом для виготовлення барвників, мастильних матеріалів, миючих засобів, смол, синтетичних волокон тощо.

Одержання етанолу – одна з найстаріших біотехнологій. Добре вивчена біохімія спиртового бродіння. Енергія субстрату в процесі бродіння розподіляється таким чином: 90 % переходять в етанол і по 5 % у біомасу і тепло.

Спиртове бродіння здійснюють дріжджі-сахароміцети (*Saccharomyces cerevisiae* S. *rosei*), деякі міцеліальні гриби (*Aspergillus oryzae*), бактерії (*Zymomonas mobilis*, *Z. anaerobia*, *Sarcina ventricula*, *Ervinia amylovora*, *Clostridium thermocellum*). Проте в якості продуцентів у спиртовому виробництві використовують тільки дріжджі.

Сировина для виробництва спирту:

- крохмалевмісна сировина – зерно (жита, пшениці, кукурудзи, ячменю, вівса, проса);
- картопля;
- меляса (відходи цукрової промисловості),
- солод, солодове молоко;
- сусло;
- гідролізат деревини.

Існує декілька технологій отримання етанолу. Виробництво спирту включає низку стадій.

1. Спочатку сировину подрібнюють і розварюють з метою розчинення крохмалю. Оскільки крохмаль не зброджується дріжджами (у них відсутня амілаза), розварену масу обробляють амілолітичними ферментами солоду або мікроорганізмів (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus subtilis*, *B. amyloletica*). В останні роки використовують готові ферментні препарати амілаз.

Оцукрена у такий спосіб суміш містить вуглеводи (мальтозу, глюкозу, декстрини). Крім того, у ній є пептиди, амінокислоти, фосфорорганічні сполуки, мінеральні солі, мікроелементи.

2. Наступна стадія – зброджування оцукреної маси. З цією метою використовують чисті культури дріжджів, які вирощують у спеціальних дріжджових відділеннях. Для пригнічення розвитку в них бактерій зброджувальну суміш, охолоджену до 30°C, підкислюють сульфатною водою до рН 3,8-4,0.

Продуценти – дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* раса XII. Добре зброджують фруктозу, сахарозу, мальтозу, дещо слабше рафінозу і галактозу (нагромаджують до 11 % спирту в середовищі).

Вимоги до дріжджів-продуцентів:

- вони повинні мати високу бродильну активність;
- швидко і повністю зброджувати цукри;
- використовувати інші компоненти середовища в анаеробних умовах;
- бути стійкими до продуктів свого обміну (особливо до спирту);
- добре протистояти інфекції.

### **Одержання етанолу з меляси**

Схема двопоточного способу зброджування меляси передбачає приготування окремих середовищ для одержання дріжджів (вміст сухої речовини 8–12 %) і для зброджування (32–36 % сухої речовини).

1. У дріжджогенераторах застосовують аерацію. Об'єм повітря, що подається – 3–4 м<sup>3</sup> на годину. Це слабка аерація. Температура в дріжджогенераторах підтримується на рівні 28–30°C, а рН 4,2–4,5. Концентрація етанолу в дріжджогенераторах досягає 2,8–3,5%, дріжджів – 2,5–6,5% сухої речовини.

2. Вирощені дріжджі із дріжджогенератора за верхніми лініями відбору направляють до головного бродильного апарата, куди одночасно надходить поживне середовище з концентрацією сухої речовини 32–36 %.

3. Після заповнення головного апарата культуральна рідина послідовно проходить бродильні апарати і з останнього потрапляє на перегонку. Температура бродіння 29–31°C. Концентрація сухої речовини в першому бродильному апараті 7,5–8,5 %, у другому – 8–9 %, у третьому – 9–9,5 % і в останньому 5–6,5 %. Система працює без поновлення дріжджів 7–10 діб.

3. Перед перегонкою із бражки видділяють хлібопекарські або кормові дріжджі (рис. 7.1).

4. Спирт, отриманий у результаті дріжджового бродіння, містить сивушні масла (пропанол, 2-бутанол, 2-метилпропанол), аміловий та ізоаміловий спирти. Це побічні продукти обміну ізолейцину, лейцину і валіну. Відділити сивушні масла можна тільки шляхом *ректифікації*.

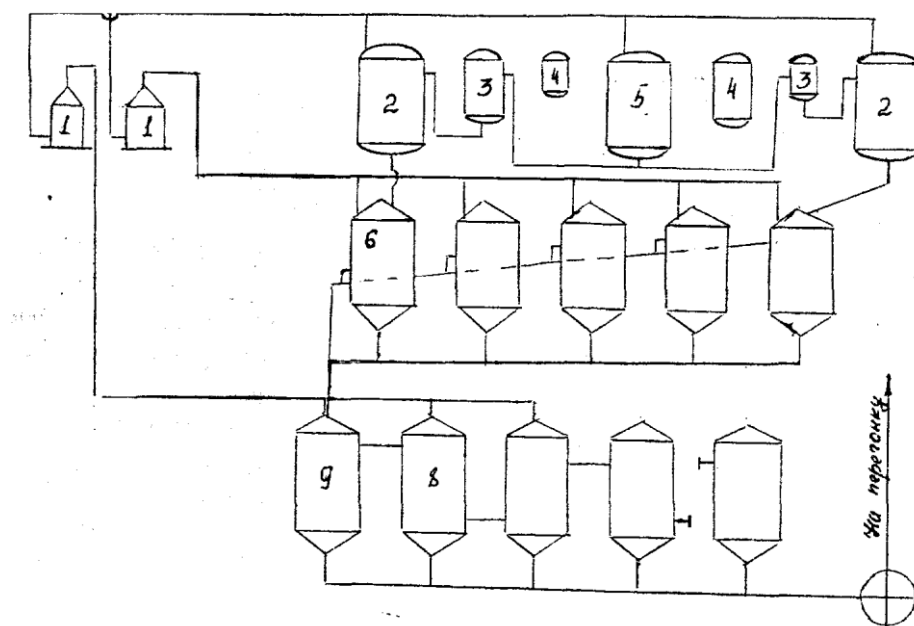


Рисунок 7.1 – Апаратурно-технологічна схема одержання етанолу з меляси: 1 – розсиропники; 2–4 – апарати чистої культури; 5 – стерилізатор; 6 – дріжджегенератор; 7 – насос; 8 – бродильний апарат; 9 – головний бродильний апарат.

### Одержання технічного спирту

**Технічний спирт** одержують на гідролізатах деревини та інших рослинних відходах. Деревина листяних і хвойних порід містить від 40 до 75% полісахаридів. Рослинну сировину гідролізують. Одержаний гідролізат містить 3,5% редукуючи цукрі (переважно глюкозу), целобіозу і манозу, а також пентози – ксилозу, арабінозу, рамнозу. У результаті бродіння утворюється до 1,5% етанолу. Гідролізний спирт (ректифікат) містить до 0,1% метанолу, дещо більшу кількість кислот, складних ефірів, альдегідів.

Відходами целюлозного виробництва є сульфітні гідролізати, які використовують для одержання сульфітного етилового спирту. Гідролізний етанол може містити до 8 % метанолу.

Ямомото (Японія) довів, що одержаний із мікроміцетів роду *Rhizopus* ферментний препарат, володіє амілазною і пектиназною активністю, добре

переводить крохмаль з розтертої маси картоплі в етанол. Процес відбувається при рН 4,2 і температурі 25°C. Тут не вимагається розварювати картоплю і оцукрювати масу.

Значний інтерес, як продуценти етанолу, представляють аеротолерантні бактерії *Zymomonas mobilis*. Вони, на відміну від дріжджів, характеризуються низькою чутливістю до етанолу. Крім того, гранична швидкість споживання глюкози і утворення етанолу в 2–3 рази вища. Ця бактерія здатна утилізувати глюкозу, сахарозу. Недолік – повільне зростання біомаси, що знижує продуктивність системи. Значних успіхів при культивуванні *Z. mobilis* для одержання етанолу було досягнуто в Канаді, де в результаті селекції одержані штами, що дають 200 г/л. При одержанні етанолу хімічним шляхом із етилену продуктивність складає 80 г/л.

Сировина при виробництві спирту (зерно, картопля) можуть бути контаміновані мікроорганізмами, які за певних умов можуть мати негативний вплив на якість продукту, а при інтенсивному розвитку перетворити її у непридатну до використання.

**На зерні злакових культур** міститься велика кількість епіфітної мікрофлори (з ґрунту, повітря, при зборі врожаю, транспортуванні), серед якої є шкідливі для процесу бродіння – аеробні та анаеробні бактерії.

**На картоплі** – при зберіганні бульб, уражених шкідниками, розвиваються гриби і гнильні бактерії, спори яких терmostійкі та здатні проростати в кислому середовищі.

**Мікрофлора м'яса** залежить від особливостей технології цукробурякового виробництва, способів транспортування і її зберігання. У концентрованій м'ясі (близько 50 % цукру і 76–80 % СР) мікроорганізми перебувають у латентному стані і не розмножуються. При розведенні водою м'яса стає сприятливим середовищем для розмноження мікроорганізмів. Це призводить до втрати цукру та відновлення нітратів до нітритів, які пригнічують ріст і розвиток дріжджових клітин.

**Солод** – це продукт отриманий в результаті пророщування зерна. У період пророщування зерна мікрофлора активізується (загальна кількість збільшується у 10–15 разів). У солоді трапляються плісєневі гриби, дріжджі та бактерії, однак шкідливими для виробництва спирту є лише молочнокислі бактерії.

У **солодовому молоці** найчастіше зустрічаються молочнокислі, оцтовокислі, маслянокислі бактерії, плісєневі гриби.

У **суслі** розвиток шкідливих мікроорганізмів відбувається при зупинці оцукрювання більш як на 2–3 години, дефектах в устаткуванні, їх недосконалому митті та нерегулярній дезінфекції. У таких випадках розвиваються молочнокислі, маслянокислі бактерії та бактерії гниття, дріжджі, іноді плісєневі гриби.

Під час бродіння в суслі утворюється брага, яка також інфікується сторонньою мікрофлорою, ознакою чого є зниження темпу бродіння сусла і збільшення кислотності більше ніж на 0,2<sup>0</sup>, а також наявність плівки. Причиною

підвищення кислотності на початкових стадія бродіння є розвиток бактерій (молочнокислих коків). З часом у бражці починають переважати молочнокислі бактерії, які активно виділяють кислоти і використовують цукри. Леткі кислоти затримують брунькування дріжджових клітин, інактивують ферменти солоду і культур грибів, що сприяє додатковим втратам у вигляді незброджених вуглеводів. Оцтовокислі бактерії, що розвиваються в бродильних апаратах на поверхні бражки вже під кінець бродіння, можуть окислювати до 20–25 % спирту в оцтову кислоту. Іноді трапляються маслянокислі бактерії роду *Clostridium*, які легко гідролізують крохмаль і цукри з утворенням масляної кислоти, яка пригнічує розмноження дріжджових клітин.

## 7.2. Використання мікроорганізмів для отримання розчинників

Органічні розчинники – **ацетон і бутанол** широко використовуються не тільки в хімічній промисловості, але й в інших областях народного господарства.

Ацетоно-бутилове бродіння є анаеробним процесом і викликається бактеріями *Clostridium acetobutylicum*.

Сировина для ацетоно-бутилового бродіння – м'яса і рослинні гідролізати. Ацетон і бутанол одержують зброджуючи зернові, м'ясно-зернові суміші або м'ясу.

Схема отримання ацетону і бутанолу:

1. Якщо готують із зерна (кукурудзи), борошно грубого помелу спочатку змішують із водою (6-8 кг борошна на 100 л води). Потім суміш варять 2 години під тиском 200 кПа і стерилізують.

2. Охолоджену до 37–42<sup>0</sup> С масу зброджують протягом 2-х діб при рН 5–7. У процесі бродіння з глюкози утворюється суміш, яка містить 6 частин бутанолу, 1 частину етанолу і 3 частини ацетону. З 3-х кг крохмалю можна одержати 1 кг органічних розчинників.

3. У перший період ацетоно-бутилового бродіння утворюються оцтова і масляна кислоти, водень і CO<sub>2</sub>. Потім масляна кислота відтворюється до бутилового спирту. Ацетон утворюється з ацетоуксусної кислоти при її декарбоксилюванні.

4. Основну ферментацію проводять у періодичному, напівперіодичному і безперервному режимах. Через 12 годин рН з 6,0 знижується до 4,5–4,2. Встановлено, що при низьких значеннях рН активуються ферменти, що каталізують трансформацію ацетоацетил-СоА в ацетон.

5. Після завершення процесу ацетоно-бутилову барду піддають сепаруванню, дистилят наполовину упарюють, після чого ацетон відділяють від етанолу і бутанолу перегонкою при різних температурах. Ацетон кипить при 56,2°C, етанол – 78,4°C, чистий бутанол при 117,7°C.

Ацетон і бутанол широко застосовується в хімічній промисловості. Відходами виробництва є водень і диоксид вуглецю, а також ацетоно-бутилова барда. Газу уловлюють і використовують для синтезу аміаку і метанолу. Барду



після відділення розчинників концентрують десятиразово у вакуум-випарювальних апаратах і висушують у розпилювальних сушарках. Одержують сухий концентрат, що містить 60-100 мгк/л рибофлавіну. Вміст сухих речовин, переважно азотистих, у барді складає 3–5 %, тому її використовують для вирощування кормових дріжджів.

Зараз розроблений метод біосинтезу органічних розчинників на основі синтетичного газу. Реалізований двоступіневий безперервний процес. Спочатку із  $\text{CO}_2$  утворюють органічні кислоти за допомогою *Butyribacterium methylotropicum*. Потім кислоти і водень газу перетворюється в бутанол, етанол, ацетон. На першій стадії процес регулюється вимірюванням рН. Він повинен бути в інтервалі 6,5–5,0. При більш низькому рН утворюється більше бутанолу, ніж ацетону. Одержано мутант, який дає вихід розчинників 22,7 %, концентрація бутанолу в середовищі 13 г/л.

Ацетано-бутилова брага, крім ацетону, бутилового і етилового спиртів, містить ряд побічних продуктів, для розділення яких застосовують ректифікацію. Основний відхід – барда, містить до 3 % сухих речовин, їх використовують для отримання кормових дріжджів і кормового перепарату вітаміну  $\text{B}_{12}$ .

### **Питання для самоконтролю:**

1. Дайте характеристику основних продуцентів спирту.
2. Яку сировину використовують для виробництва спирту?
3. Охарактеризуйте основні стадії промислового одержання спирту за допомогою дріжджів.
4. Поясніть, що таке технічний спирт? Яка технологія його отримання?
5. Для чого проводять ректифікацію спирту?
6. Назвіть мікроорганізми, що контамінують сировину для виготовлення спирту.
7. Поясніть, за яких умов відбувається мікробіологічний синтез ацетону, бутанолу і масляної кислоти?
8. Назвіть продуцентів, що використовують для отримання розчинників.

### **Виконайте завдання:**

1. Складіть технологічну схему виробництва спирту з меляси.
2. Заповніть таблицю «Мікрофлора, що контамінує сировину для одержання спирту».

Сировина	Мікрофлора

## Тема 8. Використання мікроорганізмів для виготовлення харчових продуктів

**Мета:** сформувати уявлення щодо використання мікроорганізмів у виробництвах харчової промисловості, заснованих на процесах бродіння, для отримання продуктів харчування, способах їх біологічного консервування; поглибити знання студентів щодо хімізму різних видів бродіння.

### План

1. Виробництво пива і вина.
2. Виробництво хлібного квасу.
3. Хлібопечення.
4. Виробництво кисломолочних продуктів.
5. Квашення овочів.

**Основні терміни і поняття:** бродильні виробництва, верхове бродіння, низове бродіння, закваски, виноградне сусло, солод, ординарні вина, марочні вина, молочнокислі продукти, біфідопродукти.

### 8.1. Виробництво пива і вина

**Пиво** – слабоалкогольний напій – одержують у процесі зброджування охмеленого сусла спеціальними расами дріжджів. Смак і аромат пива створюють екстрактні речовини, виділені з солоду, гіркі і ароматичні речовини хмелю, а також етиловий спирт, CO<sub>2</sub>, та інші продукти бродіння.

У центральній Європі пиво готують з ячменю, використовуючи сорти з найменшим вмістом білка і високим вмістом крохмалю. Оскільки дріжджі не утворюють амілаз, необхідно спочатку оцукрити крохмаль. Для цього ячмінь зволожують і пророщують. Проростки відділяють, а зерно сушать, подрібнюють і поміщають у чани з водою для оцукрення крохмалю. Крохмаль через деякий час розщеплюється до мальтози. До одержаного сусла додають хміль, варять, додають дріжджі та зброджують. Для усунення білків сусло фільтрують. За допомогою сахариметра у ньому визначають концентрацію цукрів у градусах Балінга (°Б), які приблизно відповідають відсотковому вмісту цих речовин.

Здебільшого використовують раси дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* низового бродіння. Для насичення пива вуглекислотою бродіння повинно відбуватися при понижених температурах (+14–17°C).

Технологія виробництва пива включає такі стадії:

1. Виробництво солоду.
2. Приготування пивного сусла, додавання хмелю.
3. Внесення дріжджів.
4. Зброджування пивного сусла (основне бродіння – молоде пиво і доброджування – дозріле пиво).

5. Освітлення.

6. Розлив.

Мікрофлора пива представлена різними групами мікроорганізмів, зокрема грампозитивними бактеріями родів *Lactobacillus*, *Sarcina*, *Streptococcus* і *Leuconostoc*. Представники роду *Lactobacillus* потрапляють у пиво із суслом, засівними дріжджами, з брудного одягу, утворюючи в готовому пиві муть, а деякі – слиз. Бактерії родів *Sarcina* і *Pediococcus* розмножуються у пиві низового бродіння, викликаючи «сарцинне» захворювання: пиво стає каламутним, далі слизоподібним, набуває неприємного смаку і медового запаху. Грамнегативні оцтовокислі бактерії родів *Acetobacter*, *Gluconobacter*, які інтенсивно розвиваються в недостатньо герметичних і стерильних умовах, утворюють на поверхні пива плівку, викликаючи швидке його прокисання, помутніння, псування аромату.

Шкідниками пивоваріння є також «дикі» штами дріжджів (у молодому пиві), міцеліальні гриби родів *Penicillium* і *Mucor*, які надають пиву запаху плісені.

**Вино** – це напій, який одержують у результаті зброджування соку, здебільшого виноградного, дріжджами з утворенням етилового спирту і вуглекислого газу. Сік з винограду називають **виноградним суслом**. Вино містить цукри – 10–25 % (глюкозу і фруктозу), амінокислоти, поліпептиди і білки, органічні кислоти (винну, яблучну, лимонну), мінеральні сполуки. Мезга (шкірка і насіння, відокремлені від м'якоті) містить целюлозу, пектинові речовини, органічні кислоти, фенольні сполуки (пігменти – флавонолони і антоціаніди), які зумовлюють її забарвлення. Похідні терпенів, які містяться у шкірці, зумовлюють аромат різних сортів вин.

Виноградні вина поділяють на:

- сортові – виготовляють з одного сорту винограду;
- купажні – виготовляють з різних сортів винограду.

Сухі (тихі) вина – це вина в яких цукор зброджено повністю «насухо». Розрізняють ординарні вина (витримують до 1 року) і марочні вина (витримують не менше 1,5 років, зберігають з року в рік свої якості).

Продуценти – різні штами *Saccharomyces cerevisiae*. Технологія виготовлення вин різна.

Шампанські (ігристі) вина – це продукт вторинного бродіння вина в герметично закритих ємностях (пляшках), коли відбувається насичення його вуглекислою. Для приготування шампанських вин використовують високоякісні сухі білі вина, до яких додають лікер або коньячний спирт (2,2 % цукру).

Відомо чотири способи виготовлення ігристих вин: класичний, резервуарний, метод трансформера та метод інжекції.

- класичний (французький) спосіб – вино з доданим лікером зброджують у товстостінних пляшках. Процес триває 3 роки.
- резервуарний метод – виробництво здійснюють періодичним або безперервним способом впродовж 3-х тижнів.

- метод трансформера – полягає у тому, що другу ферментацію проводять у пляшках. Після завершення бродіння пляшки з ігристим вином охолоджують, вміст виливають у великий резервуар, фільтрують під тиском і розливають у інші пляшки.
- метод інжекції – у охолоджене вино вводять під тиском вуглекислоту.

## 8.2. Виробництво хлібного квасу

**Хлібний квас** – продукт неповного спиртового і молочнокислого бродіння. Сировиною для виробництва квасу є житній і ячмінний солод, житня мука, вода цукор. Житній солод і житню муку запарюють і додають ячмінний солод, ферменти якого гідролізують некрохмальні полісахариди, білки і крохмаль. Отримане сусло після фільтрації упарюють і нагрівають до 105–115°C, при цьому утворюються меланоїдини, що надають йому інтенсивного темно-коричневого забарвлення й аромату житнього хліба.

Для зброджування сусла застосовують змішані культури дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і молочнокислих бактерій.

Закваску змішаної культури попередньо вирощують окремо на стерильному квасному суслі, пізніше переводять у чан, заповнений пастеризованим суслом із цукровим сиропом. Спочатку вносять молочнокислі бактерії, а пізніше – дріжджі. У процесі бродіння у квасі нагромаджується 0,3–0,5 % спирту. Квас охолоджують, знімають з осаду, додають цукровий сироп і подають на розлив. У готовому квасі при зберіганні кількість спирту не повинна перевищувати 1,2 об.%.

Помутніння і скисання квасу можуть спричиняти молочнокислі та оцтовокислі бактерії і деякі дріжджі (окислюють спирт, сприяють нагромадженню органічних кислот – неприємний присмак), плісневі гриби родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (неприємний запах і присмак). Основними шкідниками, що утворюють слиз у цукрових сиропах є *Leuconostoc mesenteroides*.

Мікробіологічний контроль квасу і безалкогольних напоїв включає визначення колі-титру (у нормі колі-титр не менше 10 мл).

## 8.3. Хлібопечення

**Приготування хліба** – одне з найстаріших біотехнологічних виробництв, що ґрунтується на складних мікробіологічних і біохімічних процесах, які відбуваються в тісті за наявності мікроорганізмів після змішування борошна з водою аж до його випікання.

Для випікання хліба використовують пшеничне і житнє борошно, до складу якого входять усі компоненти необхідні для розвитку багатьох мікроорганізмів. Визначальна роль у хлібопеченні належить дріжджам *Saccharomyces cerevisiae*, які мають високу піднімальну силу, що забезпечує пористість хліба. Крім того вони надають певних органолептичних властивостей (смак, аромат).

Основним компонентом борошна є крохмаль. Окрім нього, у борошні міститься 0,7–1,8 % зброджених цукрів (глюкоза, фруктоза, мальтоза, сахароза, рафіноза тощо), які утворюються з крохмалю під дією амілолітичних ферментів борошна.

Визначальним фактором, який впливає на стабільність випікання хліба, є наявність і кількість у борошні клейковини. Від її вмісту залежить газоутворювальна і формоутворювальна здатність тіста, а, отже, і його якість. Найбільшу кількість білків (14 %) містить борошно, виготовлене з твердих сортів пшениці. Крім того, у борошні міститься невелика кількість амінокислот і амідів, мінеральних сполук і мікроелементів (до 2 %).

Для випікання хліба здавна використовують закваски, які сприяють підніманню тіста. Раніше для розпушування тіста з житнього борошна застосовували шматок кислого тіста з попередньої випічки, що додавався як заміс до нового тіста. Використовували осадки, які утворювалися при виготовленні квасу, вина і пива. Лише в середині XIX ст. почали застосовувати пресовані дріжджі, які виготовляють на дріжджових заводах. Вологість пресованих дріжджів досить висока (75 %), тому довго зберігати їх не можна. На хлібозаводах поряд із пресованими пекарськими дріжджами використовують спиртові дріжджі – спеціальні раси того самого виду *Saccharomyces cerevisiae*.

На хлібопекарських підприємствах, які розміщені поблизу дріжджових заводів, застосовують дріжджове молоко. Воно містить 400-500 г дріжджів у 1 л продукту, що дає можливість одержати хліб із більшим питомим об'ємом і пористістю, ніж при застосуванні пресованих дріжджів. Проте, дріжджове молоко менш стійке при зберіганні через високу вологість.

Житній хліб готують на густих і рідких заквасках, що містять інші види дріжджів і молочнокислі бактерії (1:80). Густі закваски готують із дріжджів *Saccharomyces minor*, а рідкі – *S. cerevisiae* і *S. minor* та молочнокислих бактерій (найчастіше *Lactobacillus delbrueckii*).

Мікробіологічний контроль хлібопекарського виробництва передбачає контроль сировини і готової продукції.

#### 8.4. Виробництво кисломолочних продуктів

Виробництво кисломолочних продуктів займає друге місце серед продуктів, які одержують за допомогою мікроорганізмів.

Показниками якості кисломолочних продуктів є наявність активної мікрофлори (молочнокислі бактерії) і молочної кислоти. Саме вони пригнічують у кишечнику гнильну мікрофлору і захищають організм людини від накопичення токсичних речовин. Тому кисломолочні продукти вживають для нормалізації роботи кишечника, особливо після тривалої хіміотерапії, при дисбактеріозі.

У промисловому виробництві кисломолочні продукти отримують за допомогою спеціальних заквасок (чисті або змішані культури молочнокислих бактерій, деякі – лактозозасвоюючі дріжджі *Kluyveromyces lactis*).

Усі кисломолочні напої поділяються на дві групи:

- перша група – кисломолочні напої, отримані при використанні тільки молочнокислих бактерій (простокваші, ацидофільне молоко і йогурт);
- друга група – напої змішаного бродіння (молочнокислого і спиртового) при виготовленні яких використовують закваски на основі молочнокислих бактерій і дріжджів (кефір, кумис, ацидофільно-дріжджове молоко).

При виготовленні всіх видів простокваш закваску формують молочнокислі стрептококи та інші молочнокислі бактерії: ацидофільне молоко – *Lactobacillus acidophilus*; болгарська простокваша – *Lactobacillus bulgaricus*; йогурти – *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*; кефір – *Lactococcus lactis* або *Lactobacillus bulgaricus*.

Закваски деяких національних кисломолочних продуктів (кумис, пахта) – це сформовані симбіотичні комплекси молочнокислих бактерій і дріжджів. Бактерії здійснюють молочнокисле бродіння і зброджують лактозу, утворюючи 0,8–1 % молочної кислоти, а дріжджі в процесі спиртового бродіння зброджують лактозу, утворюючи 1 % етанолу.

Бактерії родів *Streptococcus* і *Pediococcus*, що викликають скисання вершків, використовуються для отримання вершкового масла. У процесі бродіння, крім молочної кислоти, вони утворюють ацетон і діацетил, що надають маслу характерні органолептичні властивості.

Останнім часом стали популярними питні (або перемішані) йогурти, десертні та біойогурти. Ці продукти мають термін придатності для вживання при температурі +4–6<sup>0</sup>С до 14 діб.

У виробництві ферментованих молочних продуктів використовують культури прямого заквашування (закваски) та сухі бактерійні концентрати.

**Культури прямого заквашування (бактерійні препарати прямого внесення)** – це препарати, призначені для безпосереднього внесення в молочну сировину. Це висококонцентровані та стандартизовані бактерійні препарати, що забезпечують отримання продукту. Бувають: ліофілізовані (сухі) та глибокозаморожені. Останні значно дешевші, але потребують спеціальних умов зберігання. Термін зберігання сухих ліофілізованих культур при температурі -18<sup>0</sup>С становить 1 рік, при температурі +5<sup>0</sup>С – 6 тижнів. Кількість життєздатних клітин у 1 г становить не менше 5х10<sup>10</sup> КУО.

Такі закваски мають ряд переваг:

- прості у використанні;
- внесення в молочну суміш без попередньої активації;
- зменшуються матеріальні витрати на виробництво, оскільки немає потреби в утриманні спеціальних закваскових відділень, оснащених спеціальним обладнанням, а також в обслуговуючому персоналі;
- гарантується збереження видового складу мікрофлори (відсутність пересівів і культивування мікроорганізмів);
- зменшується ризик контамінації іншими мікроорганізмами.

**Сухі бактерійні концентрати** ідентичні за складом мікрофлори відповідним сухим бактерійним закваскам, але містять більше живих активних клітин заквашу вальної мікрофлори.

Технологічний процес виробництва сухих бактерійних концентратів включає:

1. Приготування поживного середовища. Середовищем для нарощування клітин сухого бактерійного концентрату є сироватка, у яку додають препарати амінокислот, вітамінів, мікроелементи, а після цього стерилізують при 0,5 атм протягом 60 хв.

2. Приготування культур і внесення їх у поживне середовище. Культури вносять у стерильне знежирене молоко, витримують у термостаті до утворення згустку, потім готові культури вносять у поживне середовище (доза внесення 5 %).

3. Накопичування бактерійної маси.

4. Відділення бактерійної маси від культурального середовища (на суперцентрифугах).

5. Змішування бактерійної маси із захисним середовищем.

6. Сушіння. Суміш бактерійної маси (або суспензію) із захисним середовищем розподіляють в асептичних умовах у лотки тонким шаром, висота якого не перевищує 6–8 мм, або фасують у флакони. Заморожують при температурі  $-35 - -40^{\circ}\text{C}$  протягом 60 годин, потім висушують у сублімаційній сушарці за температури  $-44 - -45^{\circ}\text{C}$  44 години.

7. Пакування, маркування. Отриманий сухий бактерійний концентрат подрібнюють і фасують у флакони по 1 г, закривають гумовими прокладками і зверху алюмінієвими ковпачками.

**Біфідопродукти** – кисломолочні напої, які в кінці терміну придатності містять біфідобактерії в кількості не менше  $10^6$  КУО в 1 г (біфілайф, біовіт, лактім, біфівіт і йогурти питні). Їх виготовляють шляхом сквашування молочної суміші симбіотичними заквасками, що містять різні штами біфідобактерій і молочнокислих мікроорганізмів.

### Виготовлення сирів

Молочнокислі бактерії використовуються для отримання сирів. У основі сироваріння лежать процеси коагуляції білка молока (казеїну). Цей процес може відбуватися при зниженні рН до 4,6 у результаті підвищення концентрації молочної кислоти або під впливом протеолітичних ферментів, що значно пришвидшує коагуляцію. Як протеази традиційно використовували сичужний фермент, який одержують зі шлунку жуйних, переважно телят. У теперішній час його замінюють хімозином (реніном), промисловим продуцентом якого є плісневий гриб *Mucor sp.* Згустки казеїну відокремлюють від сироватки, пресують, витримують у розчині солі і залишають на дозрівання. У процесі дозрівання відбувається розщеплення казеїну до амінокислот (під дією гідролітичних ферментів мікроорганізмів) і затвердіння продукту.

Велика розмаїтість сирів пояснюється природою і властивостями мікроорганізмів, а також технологією виробництва (температурний режим, тривалість різних етапів).

М'які сири – домашній сир, бринза, камамбер, брі – містять багато вологи (50–80 %); їх дозрівання відбувається під дією ферментів дріжджів та інших грибів, які ростуть на поверхні головок сиру.

Тверді сири – естонський, чеддер, едам – містять вологи не більше 40 %. Ці сири дозрівають під дією мікроорганізмів, які ростуть у сирній масі. Щоб уникнути контамінації сторонньої мікрофлорою, головки сиру покривають воском або харчовим парафіном.

У виробництві деяких сирів (рокфор, камамбер) використовують цвілеві гриби (*Penicillium roqueforti*, *P. glaucum*, *P. camemberi*), зростання яких у пресованому сири надає йому характерного смаку, аромату і забарвлення.

При виготовленні швейцарського сиру до молока додають пропіоновокислі бактерії (*Propionibacterium freudenreichii* sp. *shermanii*), які в процесі бродіння збагачують його вітаміном В<sub>12</sub> і надають більш гострого і пікантного смаку.

### 8.5. Квашення овочів

Одним із способів тривалого зберігання овочів (капусти, томатів, огірків) і шапинкових грибів є їхнє квашення. У домашніх умовах цей процес здійснюється за допомогою культур бактерій і грибів, що заселяють поверхню листя і плодів. Серед них є різні види молочнокислих бактерій, що викликають гомо- і гетероферментативне молочнокисле бродіння. Вони зброджують цукор в основному до молочної кислоти, що надає продукту специфічний смак і запобігає його псуванню.

При консервуванні овочів їх подрібнюють і додають сіль або заливають сольовим розчинів (2–3 %) цілі плоди. Обмежують доступ повітря, що сприяє процесу бродіння. На початкових етапах розвиваються в основному факультативні анаероби р. *Enterobacteriaceae*, що викликають бродіння змішаного типу. Утворені органічні кислоти знижують рН, тим самим пригнічуючи розвиток ентеробактерій, і стимулюють розвиток молочнокислих бактерій: спочатку розвиваються гетероферментативні молочнокислі бактерії (*Leuconostoc mesenteroides*), потім – гомоферментативні (*Lactobacillus delbrueckii*, *L. brevis*, *L. fermentum*; *Lactococcus lactis*, *L. plantarum*). У результаті бродіння накопичується молочна й оцтова кислоти, етанол та інші продукти. Бродіння припиняється з вичерпанням субстрату, а утворені кислоти створюють консервуючі умови.

Часто на поверхні квашених овочів розвиваються кислотостійкі мікроорганізми, переважно дріжджі р. *Candida*, *Pichia* і цвілеві гриби рр. *Aspergillus*, *Penicillium*, які можуть використовувати молочну кислоту і спричиняти псування продукту.



У деяких країнах при квашенні овочів застосовують селекційні штами молочнокислих бактерій, а після завершення бродіння з метою знищення сторонньої мікрофлори проводять пастеризацію.

***Питання для самоконтролю:***

1. Охарактеризуйте основні способи одержання вин.
2. Яка технологія виробництва пива і хлібного квасу?
3. Назвіть мікроорганізми, що контамінують сировину для виготовлення пива, квасу і вина.
4. Які наслідки забруднення виробничих дріжджів сторонніми мікроорганізмами?
5. Назвіть продуцентів, що використовують для отримання сирів.
6. Які мікроорганізми додають до молока при виготовленні швейцарського сиру?
7. Назвіть кисломолочні напої, які виготовляють шляхом змішаного бродіння молочнокислих бактерій і дріжджів.
8. Які мікроорганізми беруть участь у процесі квашення овочів?
9. Яка роль мікроорганізмів при випіканні хліба?
10. Назвіть причини псування харчових продуктів і напоїв.

***Виберіть правильну відповідь:***

***1. Які напої одержують за участю мікроорганізмів?***

- А) горілку, пиво, вино, квас;
- Б) фруктові сиропи;
- В) безалкогольні напої;
- Г) соки, квас;
- Д) мінеральні води, соки, пиво.

***2. Продукт вторинного бродіння вина, коли відбувається його насичення вуглекислою – це:***

- А) шампанські вина;
- Б) французькі вина;
- В) пиво.

***3. Які змішані культури використовують для зброджування суслу при одержанні хлібного квасу?***

- А) дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* і молочнокислі бактерії;
- Б) дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* і бактерії *E. coli*;
- В) дріжджі *Candida utilis* і оцтовокислі бактерії.

***4. Виберіть кисломолочні напої, які виготовляють тільки за участі культур молочнокислих бактерій:***

- А) простокваші, ацидофільне молоко і йогурт;
- Б) кефір, кумис;
- В) сметана, масло, вершки.

**5. Виберіть кисломолочні напої, які виготовляють шляхом змішаного бродіння молочнокислих бактерій і дріжджів:**

- А) кефір, кумис, ацидофільно-дріжджове молоко;
- Б) простокваші;
- В) ацидофільне молоко і йогурт;
- Г) сметана;
- Д) масло, вершки.

**6. Які мікроорганізми містять біфідопродукти?**

- А) біфідобактерії (біфілайф, біовіт, біфівіт);
- Б) лактобактерії (лактобактерин, біфідумбактерин).

**7. За допомогою якого фермента виготовляють сири?**

- А) хімозину (реніну);
- Б) амілази;
- В) каталази.

**8. Які мікроорганізми додають до молока при виготовленні швейцарського сиру?**

- А) пропіоновокислі бактерії (*Propionibacterium freudenreichii*, *P. freudenreichii* sp. *shermanii*);
- Б) молочнокислі бактерії (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*);
- В) оцтовокислі бактерії (*Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxydans*).

**9. Які мікроорганізми використовують для випікання хліба?**

- А) *Saccharomyces cerevisiae*;
- Б) *Escherichia coli*;
- В) *Aspergillus niger*.

**10. Які умови сприяють розвитку шкідливих мікроорганізмів у суслі?**

- А) використання інфікованих оцукрюючих матеріалів;
- Б) зупинка оцукрювання більш як на 2–3 години;
- В) недосконале миття устаткування і нерегулярна дезінфекція.

**Виконайте завдання:**

Заповніть таблицю «Мікрофлора і процеси, які використовують для виробництва кисломолочних продуктів».

Продукт	Мікрофлора	Процес

**Теми рефератів:**

1. Мікроорганізми, що викликають псування сировини і продуктів харчування.
2. Пропіоновокислі бактерії у виробництві продуктів харчування.
3. Молочнокисле бродіння як спосіб біологічного консервування.

## Тема 9. Біологічні методи очищення води

**Мета:** сформувати знання про сучасні досягнення біотехнології в очищенні стічних вод, методи контролю за якістю води, біологічні методи очистки стічних вод.

### План

1. Очисні споруди, принципи та методи їх роботи.
2. Екстенсивні способи очищення стічних вод.
3. Інтенсивні способи очищення стічних вод.

**Основні терміни і поняття:** стічні води, процеси аеробного очищення, процеси анаеробного очищення, хімічне споживання кисню, біохімічне споживання кисню, муловий індекс, активний мул, аеротенки, метантенки, біофільтрація, рециркуляція, біоконвеєр.

### 9.1. Очисні споруди, принципи та методи контролю їх роботи

Кількісний і якісний склад мікрофлори різних природних джерел води різноманітний. Він залежить, насамперед, від забруднення води. Особливо різноманітний склад мікроорганізмів у стічних водах. Загальна кількість у 1 мл активного мулу стічних вод становить 10–20 млрд. клітин.

У зв'язку з бурхливим розвитком промисловості і ростом населення міст різко зросла кількість різноманітних стічних вод (**СВ**), які неочищеними спускають у відкриті водойми. Саме цей фактор є основним джерелом забруднення води.

Стічні води можна поділити на дві категорії:

1. Води, які містять нетоксичні органічні речовини (побутові відходи разом з фекаліями; води підприємств харчової та целюлозної промисловості). Вони не несуть загрози для гідробіонтів.
2. Води, які містять токсичні продукти, а також радіоактивні речовини (відходи з підприємств металургійної та хімічної промисловості, ксенобіотики). Вони створюють умови для гідробіонтів, несумісні з життям.

**За походженням** стічні води поділяються на природні, побутові і промислові.

Промислові та побутові стічні води є постійним джерелом забруднення довкілля. Тому їх очищення й утилізація є важливою складовою сучасної біотехнології. Застосування тільки хімічних методів очищення стічних вод і їх зливу до водойм без попереднього біологічного очищення абсолютно виключне. Метод такого очищення базується на використанні специфічних біологічних угруповань, що мають назву **активний мул**.

Хімічний склад СВ постійно змінюється, тому для їх очищення необхідно застосовувати складні угруповання мікроорганізмів, що включають різні бактерії, водорості, найпростіші тощо. Шляхом узгодженого метаболізму вони

поглинають домішки з води. У різних очисних спорудах використовують активний мул індивідуального складу.

Способи біологічного очищення стічних вод класифікують по-різному.

Розрізняють:

- екстенсивні (пасивні) та інтенсивні (активні) методи очищення;
- за використанням методів очищення – фізичні, фізико-хімічні, біологічні;
- всі процеси які йдуть за участі бактерій – аеробні і анаеробні.

**Процеси аеробного очищення :**

- ріст бактерій у суспензії (процеси активного мулу, нітрифікація та керовані лагуни);
- ріст бактерій на несучій поверхні (за допомогою різних біофільтрів).

**Процеси анаеробного очищення:**

- ріст бактерій у суспензії (процеси анаеробного засвоєння органічних сполук);
- ріст бактерій на несучій поверхні (за допомогою анаеробних біофільтрів).

### **Методи контролю за якістю води**

Методи контролю за якістю води: біологічні, хімічні, фізико-хімічні.

1. Методи біологічного контролю: спостереження за якісним і кількісним складом мікрофлори активного мулу, біоплівки (особливо грибною, що закупорює отвори між наповнювачами, зменшує аерацію і призводить до загибелі біоплівки);

2. Хімічні методи контролю: хімічне споживання кисню (ХСК), біохімічне споживання кисню (БСК), муловий індекс (МІ).

**Хімічне споживання кисню** – характеризує загальний вміст у воді органічних та неорганічних речовин, які здатні реагувати зі сильними окислювачами, і виражається в одиницях кількості кисню, який втрачається на їх окислення.

**Біохімічне споживання кисню** – кількість кисню (мг), яка необхідна для окислення органічних речовин, що містяться у 1 л стійкої води в результаті аеробних процесів.

**Муловий індекс** – показує об'єм, який займає 1 г активного мулу після повторного відстоювання. Його зростання свідчить про набухання активного мулу, тобто про негативні зміни його структури.

### **9.2. Екстенсивні способи очищення стічних вод**

До екстенсивних способів належить очищення **СВ** у біологічних ставках, полях зрошення і полях фільтрації, які забезпечують ефективність очищення

води до 99,9%. У таких випадках додаткова дезінфекція, як правило, не потрібна.

**Біологічні ставки** – належать до споруд біологічного очищення, у яких під дією природного біоценозу активного мулу проходить окислення органічних забруднень. Як правило, вода, що виходить зі ставків, не містить патогенну мікрофлору.

Ставки можуть застосовуватись як для попереднього, так і для глибинного очищення стічних вод, які вже пройшли біологічне очищення. Розрізняють ставки з природною і штучною аерацією. Найбільш ефективно окислювальні процеси в ставках відбуваються в літній період. Крім того, у цей час вода, що виходить зі ставків, не містить патогенної мікрофлори. Бактерицидну дію щодо патогенів проявляють метаболіти одноклітинних водоростей і вищої водної рослинності. Застосування штучної аерації значно пришвидшує процеси очищення води. Біологічні ставки застосовуються для очищення **СВ** заводів органічного синтезу, нафтохімічних підприємств.

**Поля фільтрації** – використовують винятково для очищення **СВ**. На них подають максимальну кількість рідини.

**Поля зрошення** – призначені для вирощування сільськогосподарської продукції, тому вода на них подається за необхідності (періодично, через 5–6 діб). **СВ** підвищують якість ґрунту, вони містять доступні для рослин форми азоту, фосфору, калію.

Недоліками цих споруд є низька окиснювальна здатність, сезонність роботи, потреба у великих територіях, некерованість процесу тощо.

### 9.3. Інтенсивні способи очищення стічних вод

#### Очисні споруди з аеробними процесами

Традиційний метод штучного біологічного очищення **СВ** за допомогою активного мулу аеротенків (запропонований ще в 1914 р. Е. Ардерном і В.Т. Локкетом).

**Аеротенки** – резервуари, у яких **СВ**, що очищається, і активний мул насичуються повітрям і перемішуються (рис. 9.1 – 9.2).

**СВ** після ретельного механічного очищення від різного сміття, піску, домішок, що осідають чи спливають, потрапляє в споруду (глибина 4–6 м, довжина 50–250 м, ширина – 3–11 м.), де за постійної аерації очищається гідробіоценозом активного мулу. Після тривалого очищення (6–24 і більше годин) вода надходить у **вторинний відстійник**, у якому звільняється від активного мулу, а потім потрапляє для третинного фізико-хімічного доочищення (іноді після хлорування) у проміжні водойми (ставки) і, нарешті, у річку чи інше джерело. Частину активного мулу, що осідає, повертають до аеротенка.

Проблему за такої технології створює надлишковий мул, який містить віруси, мікроорганізми, яйця гельмінтів, а також іони і солі важких металів, біологічно стійкі, токсичні та мутагенні сполуки, які пригнічують

життєдіяльність мікроорганізмів активного мулу. Порушення роботи аеротенка переважно пов'язують із розбуханням мулу, коли флокули погано осаджуються у вторинному відстійнику, внаслідок чого вони виносяться разом з очищеною водою. Основною причиною цього явища є розвиток нитчастих бактерій або плісневих грибів, які заважають осадженню флокулів мулу.

**Біологічне очищення вважають** повним, якщо біохімічне споживання кисню повністю очищеної води становить менше 20 і неповним – більше 20 мг/л.

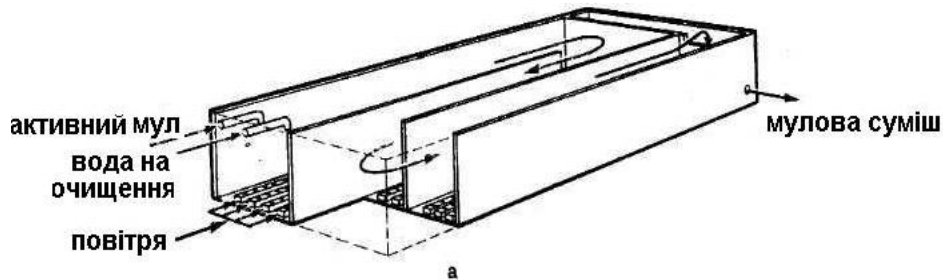


Рисунок 9.1 – Схема аеротенка-витискувача.

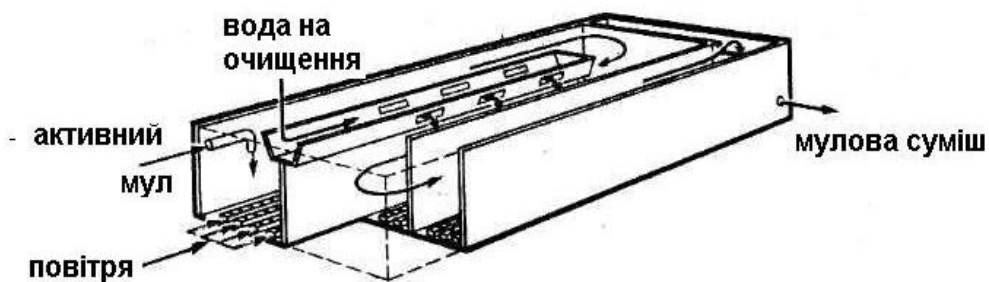


Рисунок 9.2 – Схема аеротенка з розподіленою подачею стічної води та регенератором активного мулу.

Іншим способом очищення води з аеробними процесами, які належать до інтенсивних, є **біофільтрація**. Для очищення виробничих **СВ** у штучних умовах застосовують **біологічні фільтри** (рис. 9.3).

Найважливішою складовою частиною біофільтру є завантажувальний матеріал. За типом завантажувального матеріалу всі біофільтри поділяють на дві категорії:

- з об'ємним завантаженням (краплинні, високо навантажувальні, баштові);
- з площинним завантаженням (з жорстким засипним, жорстким блоковим і м'яким завантаженням).

У біофільтрах з об'ємним завантаженням використовують гравій, керамзит, з площинним – шифер, листи пластмаси, синтетичні тканини.

Пропускна здатність біофільтрів визначається площею поверхні сорбційних процесів біоплівки і можливістю вільного доступу повітря.

Для того, щоб не відбувалося замулювання поверхні біофільтра, застосовують **рециркуляцію**.

**Рециркуляція** – це повернення частини очищеної води для розведення вихідної **СВ**. Це збільшує вміст розчинного кисню в суміші, що подається на біофільтр; вирівнює концентрацію біоплівки за висотою споруди, вирівнює піки концентрації забруднень, значно зменшує навантаження на біофільтр.

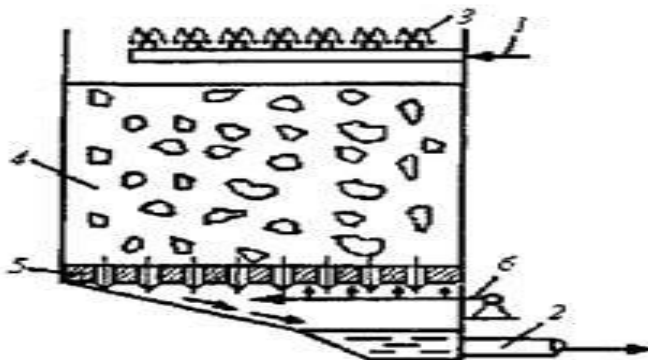


Рисунок 9.3 – Схема біофільтру: 1, 2 — труби для подачі і відведення води; 3 – розприскувачі; 4 – фільтраційне навантаження; 5 – дренаж; 6 – подача повітря.

Біофільтри класифікують на кілька категорій:

1. **Краплинні біофільтри** – використовують для очищення **СВ** різних виробництв.

2. **Занурюючі біофільтри** – очищають **СВ** каніфольно-екстракційних заводів, термічної переробки сланців, виробництва каучуку.

**СВ** у резервуарі аерується внаслідок занурення і обертання валу з дисками, на яких наростає біоплівка (товщиною до 4 мм). Це сприяє підтримувannya активного мулу в суспендованому стані.

Мікрофлора мулу представлена бактеріями родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Sarcina*, *Nocardia*.

3. **Біоменки – біофільтри**. Це споруда, що складається з корпусу і розміщених всередині нього один над одним шарів наповнювачів. Стічна вода стікає вниз. При цьому **СВ** омиває зовнішні частини елементів, на яких утворюється біоплівка.

На відміну від активного мулу, у якому якісний склад мікроорганізмів практично однаковий, в усіх частинах очищення, на різних рівнях біофільтра створюється специфічні мікробоценози, що сильно відрізняються за кількісним і якісним складом, що обумовлює поетапне очищення води. Спочатку утилізуються речовини, що більш легко засвоюються мікроорганізмами, потім – важкодоступні речовини.

Використання активного мулу і біофільтрів – інтенсивні методи очищення, які значною мірою залежать від температури, рН середовища, концентрації розчинного кисню.

### Очисні споруди з анаеробними процесами

До очисних споруд з анаеробними процесами відносяться анаеробні біофільтри, метантенки, септиктки та двоярусні відстійники (рис. 9,4).

1. **Анаеробні біофільтри** – закриті резервуари, через які вода профільтровується потоком без кисню. Анаеробні біофільтри за принципом роботи займають проміжне місце між звичайними біофільтрами і метантенками. Біоплівка в них закріплена на матеріалі завантаження, а процеси окислення супроводжуються метаноутворенням.

При анаеробному очищенні забруднених **СВ**, що складається в основному з осадів, частіше використовують метантенки, септиктки і двоярусні відстійники (система решіток і первинних відстійників).

У спорудах проходить мікробіологічне розкладання органічної речовини в анаеробних умовах, при цьому:

- відбувається зміна фізичної структури осаду і полегшується його висушування;
- зменшення маси осаду шляхом перетворення органічних речовин у газу бродіння і розчинні солі жирних кислот;
- утилізація горючих газів бродіння в паливо;
- утворення добрива;
- поліпшення санітарної безпеки осаду (важливо при використанні його як добрива на полях).

Залишок твердої фази **СВ** називається **септичним мулом**, його використовують як добриво та паливо.

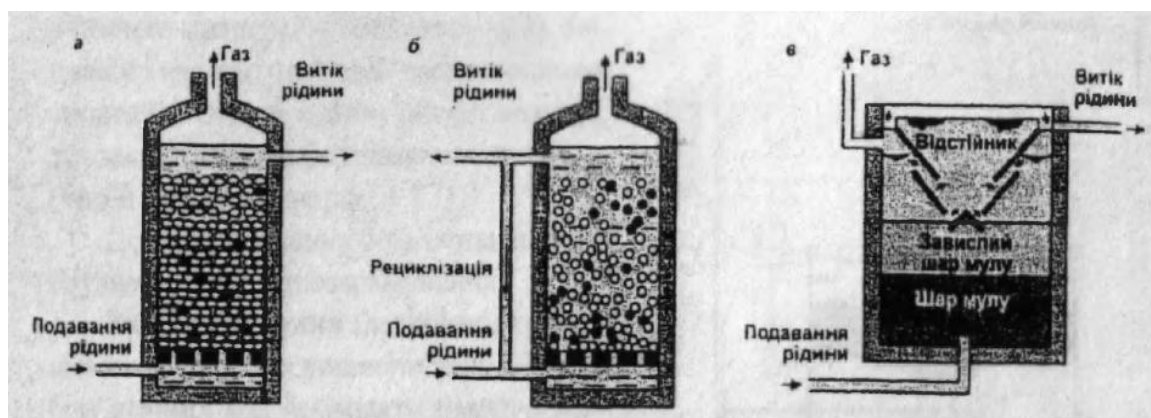


Рисунок 9.4 – Біореактори для анаеробного очищення стічних вод:

а – анаеробний біофільтр; б – циклічний анаеробний біофільтр; в – анаеробний біореактор.



2. **Метантенки** використовують для першого ступеня очистки висококонцентрованих СВ. У них відбувається інтенсивний метаногенез. Цей спосіб зброджування органічних відходів є найбільш перспективним у вирішенні екологічних і енергетичних проблем, що дає змогу агропромисловим комплексам перейти на самостійне енергопостачання завдяки **одержанню біогазу**. У метантенках здійснюється тільки збродження осадів з первинних відстійників, надлишкового активного мулу і біоплівки.

**Метантенк** – це закрыта камера різної конструкції, завантажена муловим осадом з відстійників (рис. 9.4). Процес відбувається завдяки швидкому перемішуванню і штучному підігріву цієї маси до  $+30\text{--}35^{\circ}\text{C}$ , внаслідок чого в ній розвиваються мезофільні мікроорганізми. Підвищення температури до  $+50\text{--}55^{\circ}\text{C}$  не тільки підвищує розпад, але й призводить до глибшого розвитку термофільних анаеробних мікроорганізмів, які мають швидкий обмін речовин унаслідок високої активності ферментів.

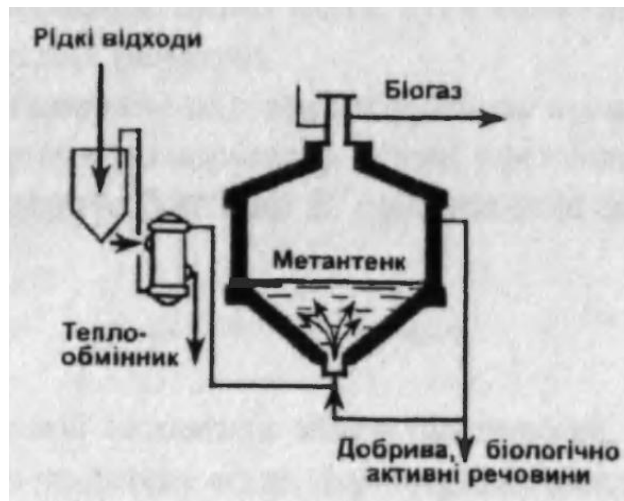


Рисунок 9.4 – Схема метантенка.

3. **Септиктенки і двохярусні відстійники** призначені для одночасного осадження речовин зі стічної рідини і анаеробного розкладу вихідного осаду (рис. 9.6).

При розкладанні осадів розрізняють дві фази: кислу (водневу) і лужну (метанову).

У **кислій фазі** (водневій) карбонвмісні речовини розкладаються з утворенням легких кислот (оцтова, молочна, масляна), спиртів, ацетону,  $\text{CO}_2$ , і  $\text{H}_2$ . У **лужній фазі** (метаногеновій) в основному відбуваються процеси, пов'язані з накопиченням метану. За участю анаеробних метанових бактерій відбувається метанове бродіння, у результаті якого утворюються  $\text{CH}_4$  і  $\text{CO}_2$ . Крім цього, метан утворюється в результаті відновлення  $\text{CO}_2$ , коли донором Гідрогену є масляна кислота або молекулярний водень – продукти розкладання речовин у кислій фазі.

**Септиктенк, або перегнівач** – це горизонтальний відстійник через який повільно протікає концентрована **СВ**, а осад, що випадає, перегниває протягом тривалого часу.

Процес очищення **СВ** у ньому відбувається значно повільніше. **СВ** підлягає освітленню протягом 1–4 діб, а осад зберігається 6-12 місяців. Гази, які виділяються при розкладанні осаду під час бродіння, піднімаються у вигляді бульбашок, забираючи у верхні шари частинки осаду, що злипаються й утворюють на поверхні септиктенка прошарок, який потім ущільнюється. На прошарку поселяються плісеневі гриби, які пронизують його своїми гіфами. Це сприяє встановленню анаеробних умов і частково зберігає тепло, що забезпечує оптимальні умови для мікроорганізмів, які здійснюють анаеробний розклад органічної частини осаду.

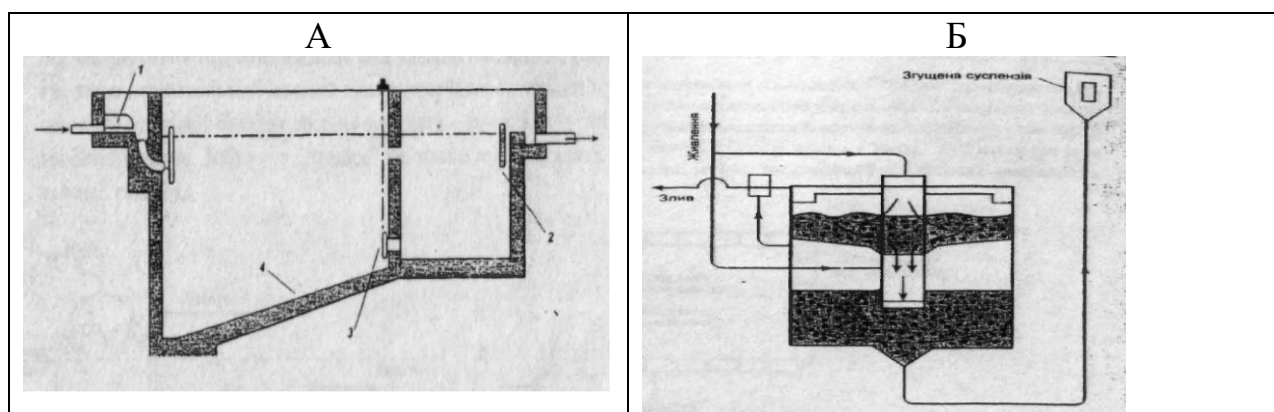


Рисунок 9.6 – Схема септиктенка (А) і двох'ярусного відстійника (Б).

**Двох'ярусні відстійники (емшери, або емшерські басейни)** – призначені для виділення осаду зі **СВ** і одночасно для його анаеробного розкладу тим же комплексом мікроорганізмів, що і в метантенку. В емшерах цей процес закінчується швидше, ніж у септиктенку, але повільніше, ніж у метантенку. **СВ** повільно протікає горизонтальним коридором, суспендовані частинки осідають, провалюються крізь щілини і попадають у нижню частину відстійника, де проходить їх біохімічне розкладання. Мул, який перегнив, періодично виводиться з дна відстійника через мулову трубу, а на його місце всмоктується мул із шару, розміщеного вище.

### Біоконвеср

**Біоконвеср** – прямотечійна багатоступінчаста система очищення води (рис. 9.7). Технологічна суть **біоконвесра** полягає в тому, що на шляху води, яку потрібно очистити, розміщуються гідробіоти – анаеробні бактерії, аеробні мікроорганізми (копіотрофи, оліготрофи), найпростіші, фільтратори, хижаки. Дані групи організмів населяють резервуари зі стічними водами і, перебуваючи на своїх «робочих місцях», використовують з води розчинені у ній органічні

сполуки і біомасу відмерлих організмів. У результаті на виході отримують чисту воду і в сотні разів меншу кількість біомаси.

Важливим є те, що у біоконвеєрі, на відміну від біологічного очищення іншими способами, кожен гідробіонт вільний у своєму виборі «місця проживання». Це дуже важливо, оскільки тільки вільний організм працює з максимальної продуктивністю.

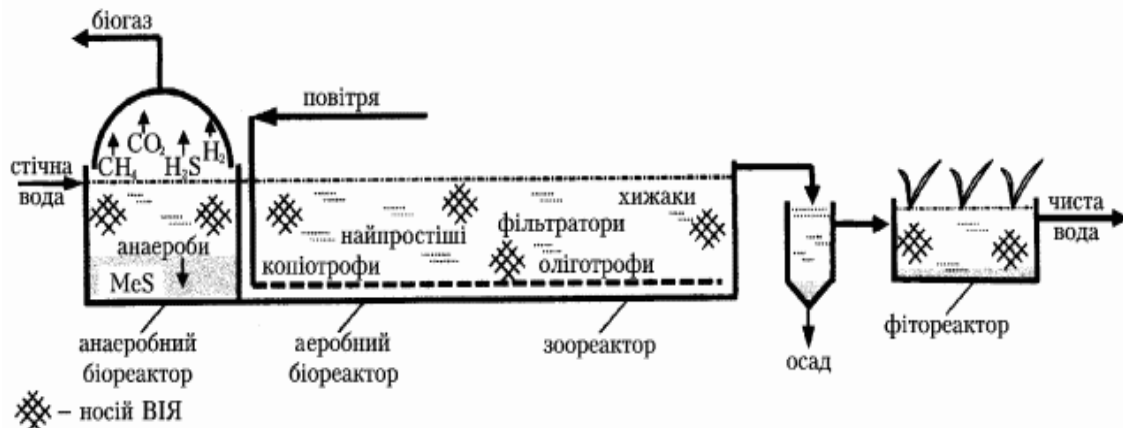


Рисунок 9.7 – Біоконвеєр: 1 – стічна вода; 2 – анаеробний біореактор; 3 – аеробний біореактор; 4 – зоореактор; 5 – осад; 6 – фітореактор; 7 – чиста вода; 8 – біогаз; 9 – повітря; 10 – носій типу «вія».

Основні переваги такої схеми очищення:

- У біоконвеєрі можна очищати будь-які (природні, зливові, побутові, промислові стічні) води, що містять надзвичайно отруйні сполуки або речовини, очистити воду від яких неможливо не тільки традиційними біологічними, а й різноманітними фізико-хімічними методами. Це розчинені органічні сполуки, навіть гранично токсичні, канцерогенні чи мутагенні, за будь-яких концентрацій.
- Біоконвеєр дає змогу доводити якість очищеної води до будь-якого заданого ступеня чистоти.
- Біоконвеєр знімає проблему надлишкової біомаси, оскільки вона споживається і мінералізується в трофічному ланцюгу. Причому, що більша кількість трофічних рівнів задіяна в біоконвеєрі, то менша біомаса залишається в очищеній воді. Досить мати в очисній споруді трофічний ланцюг у 2-3 ланки, щоб зменшити кількість надлишкової біомаси в 100-1000 разів.
- Регулярні волокнисті насадки з іммобілізованими мікроорганізмами-деструкторами дають змогу організувати відповідний трофічний ланцюг гідробіонтів, що різко (на порядок) зменшує кількість надлишкової біомаси, бо вона споживається і мінералізується у трофічному ланцюгу, а її зольність при цьому зростає майже вдвічі. Така біомаса легко осідає,

добре віддає воду, займає невеликий об'єм і не становить екологічної небезпеки.

Отже, прямотечійна система очищення води за допомогою іммобілізованих на регулярних волокнистих насадках мікроорганізмів-деструкторів найнебезпечніших забруднень, а також більш організованих гідробіонтів – седиментаторів, хижаків, фільтраторів – дає змогу очищувати будь-які промислові стічні води й одержувати воду бажаного ступеня чистоти.

### ***Питання для самоконтролю:***

1. Охарактеризуйте очисні споруди за принципами їх роботи.
2. Чим відрізняються побутові та промислові стічні води?
3. Назвіть методи контролю за якістю води.
4. Які показники використовують для контролю якості очищення води?
5. Назвіть екстенсивні способи очищення стічних вод.
6. Які існують інтенсивні способи очистки стічних вод?
7. Поясніть принцип роботи аеротенків і метантенків.
8. Які переваги інтенсивних способів очистки?
9. Назвіть переваги очистки стічних вод у біоконвейєрі.

### ***Виберіть правильну відповідь:***

1. ***Метод біологічного очищення промислових і побутових стічних вод базується на використанні специфічних біологічних угруповань:***
  - А) біофільтри;
  - Б) мікробіоценоз;
  - В) активний мул.
2. ***У яких очисних угрупованнях на різних рівнях створюються свої ценози мікроорганізмів, що відрізняються за своїм кількісним і якісним складом?***
  - А) біофільтрах;
  - Б) мікробіоценозах;
  - В) активному мулі.
3. ***Виберіть ряд особливо токсичних для мікроорганізмів активного мулу важких металів:***
  - А) Sb > Ag > Cu > Hg > Co > Ni > Pb > Cr > Cd > Zn > Fe;
  - Б) Sb > Ag > Cu > Hg > Co;
  - В) Sb > Cd > Zn > Fe > Co > Ag > Cu > Hg > Co.
4. ***Назвіть інтенсивні методи очищення, які значною мірою залежать від температури, рН середовища, концентрації розчинного кисню:***
  - А) використання активного мулу і біофільтрів;
  - Б) біологічні ставки;
  - В) поля зрошення, поля фільтрації;
  - Г) метантенки та септиктенки;
  - Д) біоконвеєр.

**5. Назвіть екстенсивні способи очищення стічних вод:**

- А) використання активного мулу і біофільтрів;
- Б) біологічні ставки;
- В) поля зрошення, поля фільтрації;
- Г) метантенки;
- Д) септиктенки.

**6. Для очищення висококонцентрованих стічних вод використовують очисні споруди, що мають назву...**

- А) метантенки;
- Б) аеротенки;
- В) біологічні ставки;
- Г) біоконвеєр.

**7. Як називають показник, що характеризує кількість кисню (мг), яка необхідна для окиснення органічних речовин, що містяться в 1 л стічної води у результаті аеробних біологічних процесів?**

- А) біохімічний показник кисню;
- Б) хімічний показник кисню;
- В) муловий індекс.

**8. Муловий індекс показує:**

- А) об'єм, який займає 1 г активованого мулу;
- Б) загальний вміст у воді органічних і неорганічних речовин, які здатні реагувати зі сильними окиснювачами, і виражається в одиницях кількості кисню, який витрачається на їх окиснення;
- В) кількість кисню (мг), яка необхідна для окиснення органічних речовин, що містяться в 1 л стічної води в результаті аеробних біологічних процесів.

**9. До очисних споруд з аеробними процесами належать:**

- А) метантенки;
- Б) аеротенки;
- В) біоконвеєр;
- Г) двоярусні відстійники;
- Д) септиктенки.

**10. Які методи очистки застосовують для знезаражування стічних вод м'ясокомбінатів?**

- А) озонування;
- Б) радіаційний;
- В) електролізу.

**Виконайте завдання:**

1. Складіть класифікацію методів очистки стічних вод.
2. Складіть класифікацію очисних споруд за принципами їх роботи.

## РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

### Основна

1. Белков В. А. Биотехнология. Микробиологическое производство биологически активных веществ / В. А. Белков. – М.: Высшая школа, 1997. – 220 с.
2. Биотехнология / А.К. Беккер, М.В. Мартин, Е.Н. Скабович [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1990. – 339 с.
3. Божков А.И. Биотехноогия. Фундаментальные и промышленные аспекты / А.И. Божков. – Харьков: Федорко, 2008. – 363 с.
4. Бондаренко В.Д. Біотехнія: навчальний посібник. Ч. 2. – Львів: Оріяна-Нова, 2002. – 312 с.
5. Волова Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Волова / Под ред. акад. И.И. Гительзона. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 1999. – 252 с.
6. Герасименко В. Г. Биотехнология / В.Г. Герасименко. – К.: Высшая школа – 1989. – 342 с.
7. Промышленная микробиология / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Вышш. школа, 1989. – 688 с.
8. Рильський О.Ф. Промислова біотехнологія: курс лекцій для студентів 5-6 курсів біологічного факультету денного та заочного відділень / О.Ф. Рильський, К.О. Домбровський, Г.Ф. Дударєва. – Запоріжжя: ЗНУ, 2010. – 126 с.
9. Яворська Г.В. Промислова мікробіологія: навч. посібник для студентів вищих навчальних закладів / Г.В. Яворська, С.П. Гудзь, С.О. Гиатуш. – Львів: ВЦ ЛНУ ім. Франка, 2009. – 256 с.

### Додаткова

1. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный. – М.: Высшая школа, 1990. – 340 с.
2. Биология метанообразующих и метанооксиляющих бактерий / Ю. Р. Малашенко, Ю. Хайер, У. Бергер [и др.]. – К.: Наук. думка, 1993. – 256 с.
3. Базарян К. Г. Биотехнология за рубежом / К.Г. Базарян. – М.: Высшая школа, 1990. – 201 с.
4. Біотехнологія рослин / М.Д. Мильчук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К.: Поліграфконсалтинг, 2003. – 250 с.
5. Галас В.Л. Біохімічний і біотехнологічний словник: реком. МОНУ. – Львів: Оріяна-Нова, 2006. – 256 с.
6. Гриб И. В. Формирование биообрастаний на искусственных субстратах систем третичной доочистки сточных вод / И. В. Гриб // Гидробиологический журн. – 2005. – Т. 41, № 3. – С. 15 – 28.
7. Елинов Н. П. Химическая микробиология / Н.П. Елинов. – М.: Высшая школа, 1989. – 448 с.

8. Калуюнц К. А. Применение продуктов микробиологического синтеза в животноводстве / К. А. Калуюнц и др. – М.: Колос, 1990. – 215 с.
9. Елисеев С.А. Поверхностно-активные вещества и биотехнология / С.А. Елисеев, Р.В. Кучер. – К.: Наук. думка, 1991. – 116 с.
10. Крот Ю.Г. Использование высших водных растений в биотехнологиях очистки поверхностных и сточных вод / Ю.Г. Крот // Гидробиологический журн. – 2006. – Т. 42, № 1. – С. 47 – 57.
11. Микробиология в пищевой промышленности / А.Ю. Жвирблянская. О.А. Бакушинская. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 500 с.
12. Мильчук М.Д. Біотехнологія рослин / М.Д. Мильчук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К.: Поліграфконсалтинг, 2003. – 250 с.
13. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С. Муромцев, Р.Г. Бутенко, Т.И. Тихоненко [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1990. – 286 с.
14. Популяционные аспекты биотехнологий. - Новосибирск.: Наука, 1990. – 169 с.
15. Современная микробиология. Прокариоты. – В 2-х т. Т. 2. – Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2009. – 496 с.: с ил.
16. Теоретические основы биотехнологии. Биотехнологические основы синтеза биологически активных веществ / Под. ред. И.М. Грачевой. – М.: Элевар, 2003. – 554 с.
17. Экологическая биотехнология / Под ред. К. Ф. Форстера. Пер. с англ. В. А. Дышина. – Л.: Химия, 1990. – 382 с.
18. Экологическая биотехнология / Под. ред. Форебера и Дис.Вайза. – Л.: Химия. – 1991. – 120 с.

Навчальне видання  
(українською мовою)

Костюченко Наталія Іванівна

## **ПРОМИСЛОВА МІКРОБІОЛОГІЯ**

Навчальний посібник  
для здобувачів ступеня вищої освіти бакалавра  
напряму підготовки «Екологія, охорона навколишнього середовища та  
збалансоване природокористування»

Рецензент *О.М. Войтович*  
Відповідальний за випуск *О.Ф. Рильський*  
Коректор *Н.І. Костюченко*