



**УДК 636.082.2**  
**ББК 30.16**  
**З-14**

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від “ ” 2017р., протокол №\_.

Укладач:

**О. І. Юлевич** – доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету, канд. техн. наук, доцент

Рецензенти:

**О. А. Горбенко** – канд. техн. наук, доцент, завідувач кафедри механізації та електрифікації с.-г. виробництва Миколаївського національного аграрного університету

**В. А. Кириченко** – канд. с.-г. наук, доцент, доцент кафедри зоогієни та ветеринарії Миколаївського національного аграрного університету

## З М І С Т

	Вступ	4
1.	Особливості культивування мікроорганізмів	5
2	Технологічні особливості процесів ферментації	7
3	Критерії ефективності ферментації	10
4	Поживні середовища для вирощування мікроорганізмів	21
	Перелік літератури	27

## ВСТУП

Протягом останніх 30 років фундаментальні дослідження в галузі генетики мікроорганізмів дозволили розробити цілий ряд нових методів для промислового застосування. Такий взаємозв'язок науки і технології є вирішальною умовою подальшого прогресу промислової біотехнології.

Рішення таких проблем, як нестача продуктів харчування і дефіцит білка, є можливим за допомогою біотехнології внаслідок зниження вартості виробництва амінокислот – необхідного компонента корму домашніх тварин, завдяки розробці методів отримання білка одноклітинних (кормового білка), переробкою парафінів або іншої доступної сировини (целюлози, агропромислових або сільськогосподарських відходів, стічних вод).

У промисловому масштабі біотехнологія являє собою вже біоіндустрію. Остання включає в себе, з одного боку, галузі, в яких біотехнологічні методи можуть з успіхом замінити традиційні методи, що широко використовуються в даний час, а з іншого – галузі, в яких біотехнологія відіграє провідну роль.

Опанування методичних рекомендацій дасть змогу майбутнім фахівцям на основі аналізу та узагальнення знань зрозуміти специфіку перебігу біотехнологічних процесів одержання цільових продуктів, обґрунтувати вибір способів реалізації допоміжних робіт, таких як підготовка поживних середовищ та технологічного обладнання, обирати способи культивування біологічних агентів і об'єднувати теоретичні висновки фундаментальних дисциплін з практичними питаннями біотехнології.

Практичні завдання побудовані таким чином, щоб студенти на основі знань про технологічні особливості біотехнологічних процесів мали змогу охарактеризувати біотехнологічне виробництво в цілому та навчитись самостійно вирішувати практичні завдання.

## 1. Особливості культивування мікроорганізмів

Якщо невелику кількість живих клітин помістити в розчин, що містить усі необхідні поживні речовини, то при певній температурі і рН клітини будуть рости.

Для використання мікроорганізмів у виробництві необхідне всебічне вивчення їх властивостей, в тому числі закономірностей росту і розвитку.

**Культура клітин** представляє собою популяцію генотипів однорідних клітин, які функціонують і розмножуються *in vitro*. Культури клітин, отримані шляхом цілеспрямованих або випадкових мутацій, називаються **клітинними лініями**.

**Розмноження** – це відтворення нових клітин шляхом брунькування. Споживаючи живильні речовини, клітина синтезує складні сполуки всього організму. Розмножуватися клітини можуть і за відсутності росту. У несприятливих умовах розмноження клітин припиняється, але ріст їх продовжується, вони досягають великих розмірів, витягуються у довжину, що є ненормальним явищем.

Вивчення кінетичних особливостей розвитку клітинних популяцій неможливе без розуміння закономірностей розвитку однієї клітини. Такі закономірності описуються **клітинним циклом** (період від поділу до поділу). Клітинний цикл еукаріотичних клітин має чотири основні фази:

- мітоз (М-фаза), в якій відбувається поділ материнської клітини на дві дочірні;

- G<sub>1</sub>-фаза - проміжок часу від кінця М-фази до початку синтезу ДНК;

- S-фаза - період синтезу ДНК;

- G<sub>2</sub>-фаза - проміжок часу від кінця S-фази до початку М-фази.

Сукупність G<sub>1</sub>-, S- і G<sub>2</sub>-фаз називається інтерфазою.

Тривалість клітинного циклу може становити від 0,5-2,0 год. (для мікробних і ембріональних клітин) до кількох десятків років (гепатоцити, нейрони). Відмінності у тривалості клітинного циклу для різних клітин зумовлені різною тривалістю G<sub>1</sub>-фази.

При розгляді закономірностей розмноження і росту клітин використовують терміни «швидкість» і «ріст клітин», вкладаючи у це поняття інтенсивність утворення клітин чи біомаси.

Про **розмноження** дізнаються внаслідок збільшення чисельності клітин, а про **ріст** – вимірюючи їх розміри.

Зазвичай мікроорганізми розмножуються брунькуванням або простим поділом і дуже рідко – спороутворенням (при великому дефіциті поживних речовин та інших несприятливих факторах).

Ріст клітинних культур *in vitro* має складний перебіг (рис. 1). У цілому можна виділити наступні фази:



*Рис. 1. Кінетична крива росту клітинної культури*

1) *лаг-фаза 1*, протягом якої не відбувається помітне збільшення кількості клітин. Це період адаптації до нових умов культивування. Тривалість лаг-фази залежить від природи мікроорганізмів, віку клітин, кількості посівного матеріалу, складу живильного середовища, фізико-хімічних показників тощо;

2) *фаза прискореного росту 2* характеризується збільшенням кількості мітозів. У цій фазі спостерігається лінійне збільшення кількості мікробних клітин залежно від часу культивування;

3) *фаза експоненційного росту 3 (лог-фаза)*, протягом якої відбувається максимальний приріст біомаси та спостерігається використання субстрату з максимальною швидкістю. У цій фазі найбільш часто зустрічаються мітози порівняно з іншими фазами росту клітинної культури. Більшість клітин у цій фазі фізіологічно молоді та біологічно активні. У реальних умовах такий процес триває недовго, до відчутних змін хімічного складу середовища;

4) *фаза уповільнення росту 4*, коли швидкість росту культури знижується до нуля. У цій фазі зменшується ріст клітинної культури за рахунок зменшення кількості мітозів. Це пояснюється тим, що через кілька годин після початку логарифмічної фази росту в живильному середовищі створюються несприятливі умови для розмноження мікроорганізмів: зменшується концентрація поживних речовин, змінюється рН, частина клітин переходить у стан спокою і гине внаслідок різних причин. Інтенсивність поділу клітин зменшується, а загибель клітин частішає, нарощування кількості живих клітин відбувається все повільніше;

5) *стаціонарна фаза 5*, коли настає рівновага, тобто кількість відмерлих клітин дорівнює кількості тих, що з'явилися у результаті розмноження. Спостерігається після фази уповільненого росту. Абсолютна кількість клітин в популяції перестає збільшуватися, хоча багато з них знаходяться в стадії активного ділення.

Кількість клітин в одиниці об'єму в стаціонарній фазі максимальна, їх розміри близькі до розмірів клітин у вихідному матеріалі. Це максимальне значення кількості клітин є важливою ознакою кожного виду мікроорганізмів і залежить від зовнішніх умов;

б) *фаза відмирання культури б*, що настає, якщо система повністю вичерпується за субстратом або накопичення продуктів обміну є значним. Переважають процеси загибелі клітин і практично не спостерігається мітотичний поділ. Через початок автолізу зменшується і сумарна біомаса культури. Відзначаються морфологічні і фізіологічні зміни, з'являються інволюційні (незвичайні) форми клітин. Фаза відмирання протилежна експоненційної фазі.

Таким чином, на різних стадіях розвитку культур мікроорганізмів змінюється швидкість росту клітин, модифікується їх фізіологічна активність. Молоді клітини споживають поживні речовини і утворюють продукти обміну набагато швидше, а також легше синтезують адаптивні ферменти ніж клітини, ріст яких почав сповільнюватися. У той же час вони мають меншу стійкість до несприятливих зовнішніх факторів (підвищеної температури, осмотичного тиску, отруйних речовин та ін.).

У процесі росту культури відбуваються також зміни ферментного апарату клітин. У зв'язку з цим одні біохімічні властивості клітин виявляються в період швидкого росту, інші – в період відмирання.

Послідовні переходи від фази 1 до фази 6 спостерігаються значною мірою внаслідок виснаження субстратів, необхідних для росту популяції клітин, або ж накопичення токсичних продуктів їх життєдіяльності.

## 2. Технологічні особливості процесів ферментації

За технологічним оформленням розрізняють наступні мікробіологічні процеси: аеробне і анаеробне культивування; твердофазне, поверхневе і глибинне культивування; періодичне і безперервне культивування.

**Аеробне культивування** – аерація середовища – неодмінна умова в тих мікробіологічних процесах, в яких використовуються аеробні мікроорганізми-продуценти.

**Анаеробні процеси** біологічного окислення у гетеротрофних мікроорганізмів (використовують в якості джерела вуглецю органічні сполуки) в залежності від того, що є кінцевим акцептором водневих атомів або електронів, поділяють на три групи: дихання (акцептор – кисень); бродіння (акцептор – органічна речовина) і анаеробне дихання (акцептор – неорганічна речовина: нітрати, сульфати та ін.).

В облігатних (лат. *obligatus* – обов'язковий) анаеробів бродіння є єдино можливим способом отримання енергії; у факультативних (лат. *facultatis* – здатність) анаеробів воно становить обов'язкову першу стадію катаболізму глюкози (дисиміляція або енергетичний обмін), що включає реакції розщеплення складних органічних речовин до простіших, яке супроводжується їх окисненням і

виділенням корисної *енергії*), за якою може відбуватися аеробне окислення продуктів, що утворилися, якщо в середовищі присутній кисень.

Прикладами облігатно анаеробних процесів є маслянокисле і метанове бродіння. Універсальним для всіх мікроорганізмів, за незначним винятком, є катаболізм глюкози – гліколіз з утворенням пірувату.

**Твердофазну ферментацію** зазвичай реалізують у твердому, сипучому або пастоподібному середовищі, вологість якого становить 30-80%.

Розрізняють три типи твердофазних процесів:

- поверхневі процеси: шар субстрату, наприклад соломи, не перевищує 3-7 см («тонкий шар»); роль біореактора виконують великі, площею до декількох квадратних метрів, підноси з алюмінію або культивацийні камери;
- глибинні твердофазні процеси у шарі, що не перемішується («високий шар»): біореакторами є глибокі відкриті посудини;
- твердофазні процеси у масі субстрату, що перемішується і аерується, яка може бути гомогенною або складатися з частинок твердого субстрату, завислих у рідині (суспензії).

*Проблеми твердофазної ферментації:*

1. Забезпечення мікроорганізмів киснем ускладнюється зі збільшенням шару субстрату.
2. Через відсутність перемішування ріст мікроорганізмів відбувається за принципом колонізації, тому часто виникає локальна нестача поживних речовин.
3. Ускладнено відведення теплоти і підтримка постійної температури у всьому ферментаційному середовищі.

*Переваги твердофазної ферментації:*

1. Процеси твердофазної ферментації вимагають менших витрат на лабораторне обладнання та експлуатацію.
2. Будова субстрату полегшує виділення і очищення продукту.
3. Низький вміст води в субстраті перешкоджає зараженню культури продуцента сторонньою мікрофлорою.
4. Твердофазні процеси не потребують скидання у навколишнє середовище великої кількості стічних вод.

**Поверхнева ферментація** на рідких субстратах реалізується в кюветах з середовищем, розміщених у камерах з вентилятованим повітрям. Культура мікроорганізмів при цьому утворює біомасу у вигляді плівки або твердого шару на поверхні рідкого середовища. Культура споживає кисень безпосередньо з газової фази – повітря. Масообмін у таких умовах малоінтенсивний.

**Глибинне культивування** мікроорганізмів відбувається в усьому об'ємі рідкого живильного середовища, що містить розчинений субстрат. Ферментер повинен забезпечувати ріст і розвиток популяцій мікроорганізмів в об'ємі рідкої фази, підведення поживних речовин до клітин мікроорганізмів, відведення від мікробних клітин продуктів їх обміну



(речовин метаболізму), відведення з середовища тепла, що виділяється клітинами (табл. 1).

Таблиця 1

### Основні фактори середовища, що визначають ріст і біосинтетичну активність продуцентів

Фактор	Роль при культивуванні	Методи керування фактором
Склад і концентрація поживних речовин	Забезпечує метаболізм	Складання оптимальної композиції; підживлення під час ферментації; безперервність процесу; багатостадійність з урахуванням потреб продуцента за фазами розвитку та ін.
Концентрація продукту й інгібіторів	Сповільнює біохімічні реакції	Осадження продукту у міру накопичення; ферментація з діалізом; ферментація під розрідженням з випаровуванням леткого продукту та ін.
pH	Оптимізує швидкість біохімічних реакцій	Регулювання шляхом додавання кислоти або лугу
Температура	Оптимізує швидкість біохімічних реакцій	Охолодження або підігрів культуральної рідини за допомогою теплообмінників або температури субстратів, що подаються в біореактор
Осмотичний тиск або активність води	Визначає ступінь доступності води для мікроорганізмів (0,6–0,998)	Складання середовищ з оптимальною концентрацією поживних речовин або вологістю твердого середовища; підтримання на постійному рівні під час ферментації шляхом розведення водою або додаванням окремих компонентів
Концентрація розчиненого кисню	Для аеробів забезпечує аеробний метаболізм; є акцептором $H^+$ ; пригнічує розвиток анаеробів	Для аеробних процесів регулюють інтенсивністю аерації або додаванням до газової суміші кисню. Анаеробні процеси реалізують у безкисневому середовищі
Концентрація диоксиду вуглецю	Джерело вуглецю для автотрофів; деякі гетеротрофи потребують, а деякі уповільнюють метаболізм в присутності $CO_2$	Продування у фотосинтезуючих процесах ферментації газовим середовищем, збагаченим $CO_2$ ; виділенню $CO_2$ з рідкої фази сприяє перемішування
Перемішування середовища	Рівномірний розподіл поживних речовин і біомаси по всьому об'єму середовища	Організують макро- і мікроперемішування за допомогою механічних мішалок, барботажних, циркуляційних та інших систем
В'язкість середовища	Визначає дифузію поживних речовин і перемішування клітин продуцента	Регулювання компонентами живлення, характером і концентрацією біомаси, наявністю деяких полімерних продуктів. В'язкість впливає на перемішування і аерацію; потрібні спеціальні технічні засоби

Ріст культури мікроорганізмів залежить від температури, рН, редокс-потенціалу та інших факторів. Негативні фактори затримують ріст і утворення цільового продукту і навіть викликають відмирання частини клітин.

Глибинне культивування можна здійснювати періодичним і безперервним способами.

*Періодичне культивування.* При періодичному способі у ферментер завантажують відразу весь обсяг живильного середовища і вносять посівний матеріал. Вирощування мікроорганізмів проводять в оптимальних умовах протягом певного часу, після чого процес зупиняють, зливають вміст ферментера і виділяють цільовий продукт.

Етап росту культури включає: лаг-фазу, фазу прискореного росту, експоненційну фазу, фазу уповільнення росту, стаціонарну фазу, фазу відмирання.

Широко застосовують *періодичне культивування з підживленням*. Його сутність полягає в додаванні через певні проміжки часу порцій свіжого живильного середовища, що дозволяє підвищити продуктивність культури, в порівнянні зі звичайною періодичною ферментацією. Недоліки: відсутність відбору культуральної рідини з біореактора, що не дає можливості запобігти ефекта інгібування клітин біооб'єкта продуктами метаболізму

Існує також *об'ємно-доливне культивування*, коли частина вмісту з біореактора час від часу вилучається при додаванні еквівалентного об'єму середовища (напівбезперервне культивування).

*Безперервні процеси.* При безперервному способі живильне середовище безперервно подається в ферментатор, в якому створюють оптимальні умови для росту мікроорганізмів, а з ферментатора також безперервно відтікає культуральна рідина разом з мікроорганізмами.

У безперервних процесах біооб'єкт підтримується в експоненційній фазі росту. При цьому існує рівновага між приростом біомаси за рахунок поділу клітин і її зменшенням у результаті розрідження свіжим середовищем.

Із безперервних процесів найкраще вивчений метод глибинної ферментації. Процес може бути гомогенно- або гетерогенно-безперервним.

При *гомогенно-безперервному процесі* в апараті, де йде інтенсивне перемішування, всі параметри постійні в часі.

При *гетерогенно-безперервному процесі* кілька ферментерів пов'язані один з одним. Живильне середовище надходить у перший апарат, готова культуральна рідина витікає з останнього.

Контроль і керування процесами безперервного культивування мікроорганізмів здійснюється двома способами: хемостатним та турбідостатним.

У *хемостаті* з постійною швидкістю надходить живильне середовище і відбувається відтік культури. Живильне середовище містить у надлишку всі

компоненти середовища за винятком якогось одного. Цей компонент виступає в ролі фактора, що обмежує ріст клітин мікроорганізмів.

Якщо швидкість росту клітин перевищує швидкість вимивання мікроорганізмів, рівень біомаси буде рости; концентрація компонента, що лімітує ріст, почне знижуватись. У результаті швидкість росту клітин також буде знижуватись доти, доки не зрівняється зі швидкістю їх вимивання.

Якщо швидкість росту культури виявиться нижчою за швидкість вимивання клітин, рівень біомаси почне падати. Останнє призведе до збільшення концентрації лімітуючого компонента середовища і, відповідно, прискорення росту культури, це, у власну чергу, призведе до зрівняння швидкості росту клітин зі швидкістю вимивання.

При *турбідостатному* культивуванні підтримується постійний рівень біомаси, який реєструється пристроєм із фотоелементом за оптичною щільністю культури. Щойно рівень біомаси в культурі піднімається вище деякого наперед вибраного рівня, сигнал фотоелемента приводить в дію насос, що подає свіже живильне середовище.

### 3. Критерії ефективності ферментації

**Параметри росту періодичної культури.** Основними параметрами кривої росту (рис. 2) є біомаса, швидкість росту та тривалість лаг-фази (у разі, якщо ріст періодичної культури аналізують за збільшенням біомаси, а не за кількістю клітин).

*Біомаса* (концентрація біомаси) – це різниця між максимальною (у стаціонарній фазі росту) та вихідною біомасою бактерій:

$$X = X_{\text{макс.}} - X_0 \quad (1)$$

Цю величину виражають у грамах (міліграмах) сухої речовини, яка міститься у літрі (мілілітрі) культуральної рідини або клітинної суспензії.

Збільшення концентрації біомаси від  $X_0$  до  $X$  характеризується абсолютною (валовою) і відносною (питомою) швидкістю її розмноження.

Середня валова швидкість росту  $V_{\text{сер}}$  за час  $(t - t_0)$  визначається з рівняння

$$V_{\text{сер}} = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad (2)$$

*Швидкість експоненційного росту (питома швидкість)* – це міра швидкості росту клітин в експоненційній фазі. Її визначають за формулою виходячи з початкової та кінцевої біомаси  $X_0$  та  $X_t$  у моменти часу  $t_0$  та  $t$ :

$$\mu = \frac{\lg X_t - \lg X_0}{\lg e (t - t_0)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0}, \quad (3)$$

де  $\lg e = 0,43429$ .

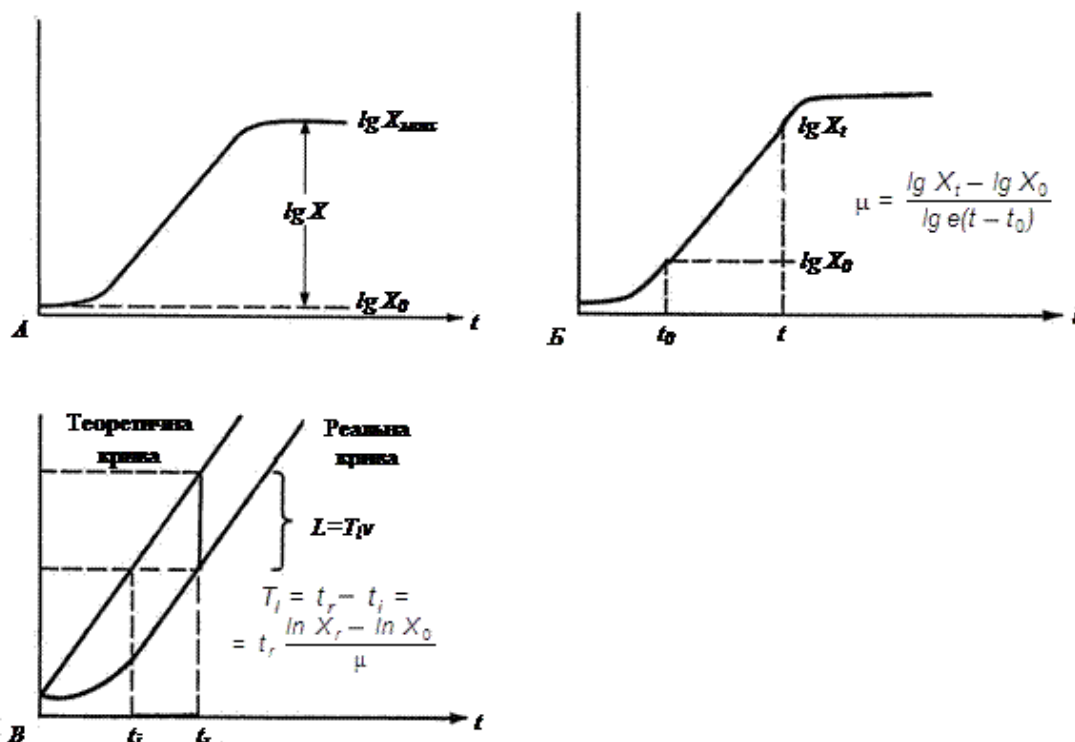


Рис. 2. Параметри росту : А – біомаса; Б – швидкість росту; В – тривалість лаг-фази

Швидкість експоненційного росту (питома швидкість росту) може бути також розрахована за формулою:

$$\mu = [2,3 (\lg X_t - \lg X_0)] / (t - t_0) \quad (4)$$

Валова швидкість розмноження характеризує збільшення біомаси в абсолютних величинах; питома швидкість – це приріст мікроорганізмів, які утворилися з одиниці їх кількості в одиницю часу, і має розмірність  $\text{год}^{-1}$ .

Між питомою швидкістю розмноження  $\mu$  і кількістю брунькувань клітини за одиницю часу  $r$  (швидкість росту) існує таке співвідношення:

$$\frac{r}{\mu} = 1,44, \text{ або } \mu = 0,694 \cdot r$$

Швидкість росту можна виразити таким чином:

$$r = \frac{1}{t_d}, \quad (5)$$

де  $t_d$  - середня тривалість генерації клітин, тобто подвоєння їх кількості або маси.

Тривалість подвоєння визначається формулою:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,69}{\mu}, \quad (6)$$

$$\text{тоді } \mu = \frac{0,69}{t_d}$$

Швидкість росту мікроорганізмів  $r$  пропорційна, але не дорівнює питомій швидкості розмноження  $\mu$ . Якщо число клітин збільшується удвічі за 2 год, тоді:

$$r = 1:2 = 0,5; \quad \mu = 0,694 \cdot 0,5 = 0,347$$

*Тривалість лаг-фази ( $T_l$ )* – визначають як проміжок часу між моментом  $t_r$ , в який культура досягла певної біомаси  $X_r$ , і моментом  $t_i$ , в який вона могла б досягти такої самої біомаси, якби відразу ж після інокуляції починався експоненційний ріст.

#### ***Ріст у безперервній культурі.***

Вивчення кривої росту в експоненціальній фазі при періодичному процесі стало обґрунтуванням для математичного опису безперервного процесу культивування мікроорганізмів.

Питома швидкість розмноження залежить від концентрації субстрату чи відповідних речовин, які у даних умовах є лімітуючим фактором. Термін лімітуючий фактор включає у себе фактор живлення чи інші фактори, які впливають на  $\mu_{\max}$ .  $\mu_{\max}$  дріжджових клітин досягається тоді, коли вони розвиваються в оптимальному за складом живильному середовищі й у ньому відсутні інгібітори.  $\mu_{\max}$  – це суто математичний, ніколи не досяжний рівень швидкості розмноження мікроорганізмів. У реальних умовах дріжджі розмножуються не завжди в оптимальних умовах і середовищі. Тому крім  $\mu_{\max}$  розрізняють ще реальну питому швидкість розмноження  $\mu$  – вона може досягнути 90%  $\mu_{\max}$ .

Ж. Моно і незалежно від нього А. Новик і Л. Сцилард показали, що між питомою швидкістю розмноження  $\mu$  і концентрацією живильних речовин є така залежність:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \times S}{K_s + S}, \quad (7)$$

де  $S$  – концентрація лімітуючої речовини, яка знаходиться у мінімальній кількості, г/л;

$K_s$  – константа насичення, яка чисельно дорівнює концентрації живильної речовини, при якій швидкість розмноження досягає половини максимальної швидкості розмноження, тобто  $\mu = \mu_{\max}/2$

Безперервний спосіб культивування характеризується такими показниками:

*швидкість потоку  $f$* , м<sup>3</sup>/год., – це кількість середовища  $W$ , що надходить в апарат за одиницю часу  $t$ :

$$f = W/t; \quad (8)$$

*швидкість розбавлення  $D$* , год.<sup>-1</sup>, – відношення швидкості потоку  $f$  до об'єму апарата  $V$ :

$$D = f / V; \quad (9)$$

тривалість  $\tau$  перебування мікроорганізмів в апараті, год. :

$$\tau = 1 / D. \quad (10)$$

При безперервному процесі питома швидкість розмноження клітин має дорівнювати швидкості розбавлення середовища:

$$\mu = D.$$

При  $\mu > D$ , тобто уповільненому розведенні, час перебування клітин у апараті збільшується, поживні речовини повніше засвоюються, кількість клітин стає більшою,  $\mu$  знижується і кількість біомаси в апараті буде постійно збільшуватись до такого стану, коли настає лімітування за поживними речовинами.

При  $\mu < D$  сталий режим порушується, клітини вимиваються з апарата, концентрація їх зменшується, поживні речовини як слід не використовуються і втрати їх з відтоком збільшуються. З підвищенням концентрації середовища  $\mu \sim \mu_{\max}$  процес стабілізується на новому рівні при більш високій концентрації середовища і меншій концентрації клітин.

В мікробіологічній промисловості продуктивність прийнято виражати в кілограмах продукту, одержуваного з 1 м<sup>3</sup> геометричного об'єму біореактора на добу, включаючи час на підготовку апаратури між процесами. У лабораторних дослідженнях продуктивність зазвичай позначають у г/(л·год), відносячи до об'єму рідкої фази і враховуючи тільки тривалість процесу біосинтезу. У безперервних процесах продуктивність утворення біомаси ( $Q_x$ ) визначається за рівнянням:

$$Q_x = DX, \quad (11)$$

де  $D$  – швидкість розведення протока середовища, год.<sup>-1</sup>;

$X$  – концентрація біомаси.

Продуктивність біотехнологічного процесу ( $Q_p$ ) залежить від багатьох факторів, основними з яких є активність продуцента, ефективність біоконверсії, яка характеризується виходом продукту з субстрату ( $Y_{p/s}$ ), і концентрація ( $X$ ) активного каталізатора в біореакторі:

$$Q_p = q_s Y_{p/s} X, \quad (12)$$

де  $q_s$  - питома швидкість споживання субстрату, г / (г·год.).

Розрахунок виходу продукту можна здійснювати різними способами (табл. 2). Частіше користуються величиною виходу продукту  $Y_{p/s}$ , яка відображає масу продукту, одержану з певної кількості субстрату. Цю величину іноді називають коефіцієнтом конверсії або економічним коефіцієнтом, хоча остання назва комісією IUPAC з біотехнології не рекомендується до використання.

Таблиця 2

## Основні показники процесу ферментації

Показник	Позначення та одиниці вимірювання	Розрахункова формула	Примітка
Концентрація біомаси	$X$ , г/л	$X = X_0 e^{\mu(t-t_0)}$	Для експоненційної фази росту $e=2,718$
Концентрація субстрата	$S$ , г/л		
Концентрація продукту	$P$ , г/л		
Питома швидкість росту	$\mu$ , год <sup>-1</sup>	$\mu = \frac{X_1 - X_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	
Коефіцієнт розведення	$D$ , год <sup>-1</sup>	$D = \mu$	Для безперервного процесу
Продуктивність за біомасою	$Q_x$ , г/(л·год)	$Q_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0}$	Для періодичного процесу
		$Q_x = DX$	Для безперервного процесу
Продуктивність за продуктом	$Q_p$ , г/(л·год)	$Q_p = \frac{P_1 - P_0}{t_1 - t_0}$	Для періодичного процесу
		$Q_p = DP$	Для безперервного процесу
Питома швидкість споживання субстрату	$q_s$ , г/(г·год)	$q_s = \frac{S_0 - S_1}{X_1(t_1 - t_0)}$	
Вихід продукту від субстрату	$Y_{p/s}$ , г/г	$Y_{p/s} = \frac{q_p}{q_s} = \frac{P_1 - P_0}{S_1 - S_0}$	
Вихід біомаси від субстрату	$Y_{x/s}$ , г/г	$Y_{x/s} = \frac{\mu}{q_s} = \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S_1}$	
Питома швидкість утворення продукту	$q_p$ , г/(г·год)	$q_p = \frac{P_1 - P_0}{X_1(t_1 - t_0)}$	

## Приклад визначення показників росту при періодичному культивуванні мікроорганізмів

Завдання 1. Визначити (рис. 3):

- швидкість росту ( $\mu$ ) між 24 та 48 год. культивування;
- рівень біомаси;
- економічний коефіцієнт за умови, що початкова концентрація глюкози в середовищі становить 0,05 М;
- тривалість лаг-фази.

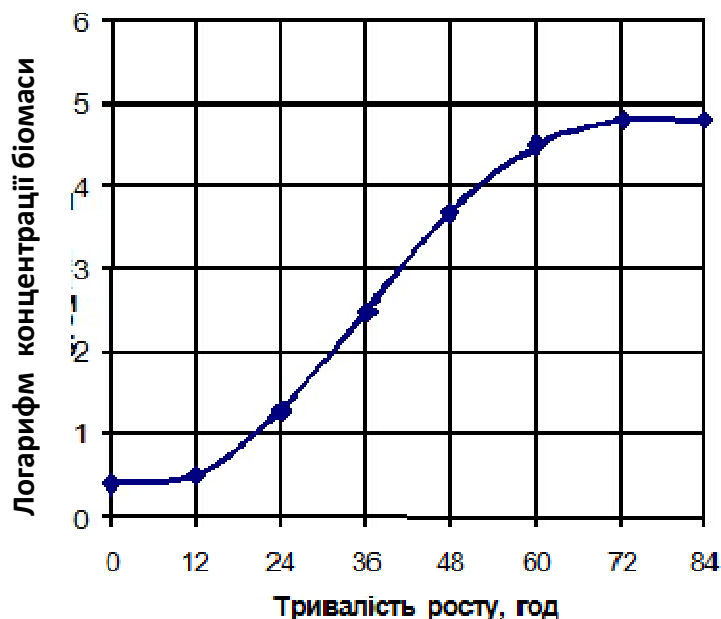


Рис. 3. Крива росту бактеріальної популяції

Визначення основних параметрів кривої росту (концентрації біомаси, швидкості росту та тривалості лаг-фази) наведено на рис. 2.

Швидкість експоненційного росту – це міра швидкості росту клітин в експоненційній фазі. Її визначають за формулою виходячи з початкової та кінцевої біомаси  $X_0$  та  $X_t$  у моменти часу  $t_0$  та  $t$ :

$$\mu = \frac{\lg X_t - \lg X_0}{\lg e (t - t_0)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0},$$

де  $\lg e = 0,43429$ .

Швидкість експоненційного росту (питома швидкість росту) може бути також розрахована за формулою :

$$\mu = [2,3 (\lg X_t - \lg X_0)] / (t - t_0)$$

Згідно з умовою  $t = 48$  год.,  $t_0 = 24$  год. Визначаємо (за графіком) концентрацію біомаси у момент часу  $t$  та  $t_0$ :  $X_t = 3,75$  г/л;  $X_0 = 1,3$  г/л.

Отже,

$$\mu = (\ln 3,75 - \ln 1,3) / (48 - 24) = (1,32 - 0,26) / 24 = 0,044 \text{ год.}^{-1}$$

Рівень біомаси визначають за формулою :

$$X = X_{\text{макс.}} - X_0$$

Згідно наведеного графіку, вихідний рівень біомаси становить 0,4 г/л, а рівень біомаси у стаціонарній фазі росту – 4,8 г/л. Отже, згідно з рівнянням, концентрація біомаси становить:

$$X = 4,8 - 0,4 = 4,4 \text{ г/л.}$$



Економічний коефіцієнт. Важливим показником періодичного процесу є відношення концентрації біомаси до кількості спожитого субстрату –  $X/S$ . Якщо ці дві величини виражені в вагових одиницях, то відношення  $X/S$  називають економічним коефіцієнтом ( $Y$ ). Економічний коефіцієнт може бути розрахований також як відношення біомаси до заданого субстрату. Якщо врожай в грамах відноситься до кількості молей спожитого субстрату, то одержану величину називають молярним економічним коефіцієнтом.

Згідно з умовою, початкова концентрація глюкози у середовищі становить 0,05 М, або  $0,05 \times 180 = 9$  г/л (молекулярна маса глюкози  $C_6H_{12}O_6$  становить 180). Рівень біомаси становить 4,4 г/л, отже, економічний коефіцієнт

$$Y = X/S = 4,4 / 9 = 0,488, \text{ або } 49\%.$$

Тривалість лаг-фази визначають як проміжок часу між моментом  $t_r$ , в який культура досягла певної біомаси  $X_r$ , і моментом  $t_t$ , в який вона могла б досягти такої ж біомаси, якби відразу ж після інокуляції починався експоненційний ріст.

На реальній кривій росту (рис. 4) проводять теоретичну криву, враховуючи тривалість культивування 48 годин.

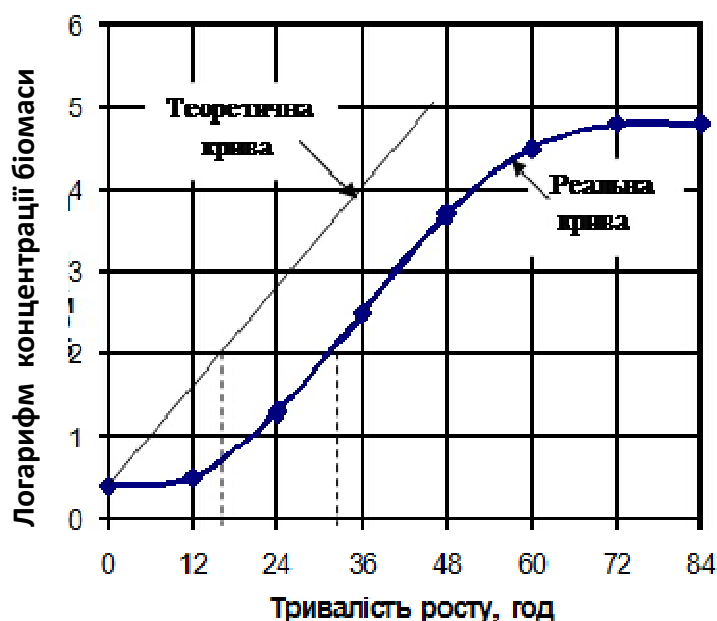


Рис. 4. Розрахунок тривалості лаг-фази

Тривалість лаг-фази визначають за формулою:

$$T = t_r - [(\ln X_r - \ln X_0) / \mu],$$

$$\text{де } \mu = [2,3 (\lg X_r - \lg X_t)] / (t_r - t_t)$$

За умовою  $X_0 = 0,4$  г/л; приймаємо  $X_r$  таким, що дорівнює 2 г/л (див. рис. 3). На реальній і теоретичній кривих визначають час  $t_r$  та  $t_t$ , потрібний для досягнення 2 г/л біомаси:  $t_r = 32$  год., а  $t_t = 17$  год. Швидкість

росту  $\mu$  розраховують за формулою для реальної кривої в інтервалі часу  $t_f = 32$  год. та  $t_i = 17$  год. За реальною кривою визначають  $X_f = 2$  г/л;  $X_i = 0,75$  г/л. Отже, швидкість росту:

$$\mu = [2,3 (\lg 2 - \lg 0,75)] / (32 - 17) = [2,3 (0,301 - (-0,125))] / 15 = 0,066 \text{ год}^{-1}$$

Знаючи швидкість росту, за формулою можна визначити тривалість лаг-фази:

$$T = 32 - [(\ln 2 - \ln 0,4) / 0,066] = 32 - [(0,693 - (-0,916)) / 0,066] = 32 - 24,4 = 7,6 \text{ год.}$$

Отже, тривалість лаг-фази становить 7,6 год.

**Завдання 2.** Визначити константу швидкості поділу  $n$  та тривалість генерації  $t_d$ , якщо початкова концентрація клітин становить  $10^3$ , а через 8 год. –  $10^{10}$ .

*Розрахунок:*

Бактерії розмножуються бінарним поділом, тому їх кількість збільшується в геометричній прогресії:  $2^0 \text{ @ } 2^1 \text{ @ } 2^2 \text{ @ } 2^3 \text{ @ } \dots \text{ @ } 2^n$ . Якщо на одиницю об'єму періодичної культури, що росте, припадає  $N_0$  клітин, то після  $n$  поділів кількість клітин стане  $N_0 \cdot 2^n$ . Логарифмуючи, отримаємо:

$$\lg N = \lg N_0 + n \lg 2,$$

звідки кількість клітинних поділів:

$$n = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2.$$

Кількість клітинних поділів за 1 год (*константа швидкості поділу  $n$* ) визначають за формулою:

$$n = n / t = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2 (t - t_0)$$

Час, потрібний для одного циклу поділу (*тривалість генерації  $t_d$* ), визначають за формулою:

$$t_d = t / n = 1 / n.$$

Якщо за 8 год. кількість клітин у суспензії збільшується з  $10^3$  до  $10^{10}$ , то константа швидкості поділу:

$$n = (\lg 10^{10} - \lg 10^3) / 0,301 \cdot 8,$$

де  $\lg 2 = 0,301$ .

$$n = (10 - 3) / 2,41 = 2,9$$

Тривалість генерації становить:  $t_d = 1 / n = 1 / 2,9 = 0,34$  год.

**Завдання 3.** Початкова масова концентрація дріжджів ( $S_0$ ) 27 г/л, питома швидкість росту ( $\mu$ ) 0,09 год.<sup>-1</sup>. За 3 години ( $\Delta t$ ) вміст субстрату зменшився на 7 г/л ( $\Delta S$ ). Визначити вміст дріжджів у кінці культивування ( $S_1$ ), валову швидкість росту ( $V_{\text{сеп}}$ ), час генерації ( $t_d$ ), питому швидкість споживання субстрату ( $q_s$ ) і вихід біомаси з субстрату ( $Y_s$ ).

*Розрахунок:*

Визначаємо вихід біомаси з субстрату:

$$Y_s = S_1 = S_0 + \Delta S$$

$$Y_s = 27+7 = 34 \text{ г/л}$$

Визначаємо валову швидкість росту:

$$V_{\text{сер}} = \mu \cdot S_1$$

$$V_{\text{сер}} = 0,09 \cdot 34 = 3,06 \text{ г/л} \cdot \text{год.}^{-1}$$

Визначаємо час генерації:

$$t_d = 0,69 / \mu$$

$$t_d = 0,69 / 0,09 = 7,67 \text{ год.}$$

Визначаємо питому швидкість споживання субстрату:

$$q_s = \Delta S / S_1 \cdot \Delta t$$

$$q_s = 7 / 34 \cdot 3 = 0,07 \text{ г} \cdot \text{год.} / \text{л}$$

**Завдання 4.** У ферментатор з корисним об'ємом ( $V_k$ ) 90 м<sup>3</sup> надходить сусло зі швидкістю ( $f$ ) 30 м<sup>3</sup>/год. Мікроорганізми культивуються безперервним способом у стаціонарному режимі. Визначити тривалість перебування мікроорганізмів ( $\tau$ ), продуктивність по біомасі ( $Q_x$ ), питому ( $\mu$ ) і валову ( $V_{\text{сер}}$ ) швидкості росту, якщо початкова масова концентрація біомаси ( $X_0$ ) становить 25 г/л, а час культивування ( $\Delta t$ ) 6 год.

*Розрахунок:*

Коефіцієнт культивування для безперервного способу:

$$D = f / V_k = 30 / 90 = 0,33$$

Визначаємо продуктивність по біомасі:

$$Q_x = D \cdot X_0 \cdot V_k \cdot \Delta t$$

$$Q_x = 0,33 \cdot 25 \cdot 90 \cdot 6 = 4455 \text{ г} \cdot \text{год.} / \text{л}$$

Визначаємо питому швидкість росту:

$$\mu = 0,69 / t_d$$

слід врахувати, що час культивування мікроорганізмів за стаціонарного режиму дорівнює часу генерації, тобто  $t_d = \Delta t = 6$  год., тому

$$\mu = 0,69 / 6 = 0,115 \text{ год.}^{-1}$$

Визначаємо валову швидкість росту:

$$V_{\text{сер}} = \mu \cdot S_0 \cdot e^{\mu \cdot \Delta t}$$

$$V_{\text{сер}} = 0,115 \cdot 25 \cdot 2,718^{0,115 \cdot 6} = 1,99 \text{ г/л} \cdot \text{год.}^{-1}$$

тривалість  $\tau$  перебування мікроорганізмів в апараті, год.:

$$\tau = 1 / D$$

$$\tau = 1 / 0,33 = 3,0 \text{ год.}$$

### Завдання для самостійної роботи

1. Початкова масова концентрація дріжджів 20 г/л, питома швидкість росту 0,07 год.<sup>-1</sup>. За 2,5 години вміст субстрату зменшився на 5 г/л. Визначити вміст дріжджів у кінці культивування, валову швидкість росту, час генерації, питому швидкість споживання субстрату і вихід біомаси з субстрату.

2. За 6 год. утворилось 10 г/л оцтової кислоти. При цьому було використано 12 г/л глюкози. Масова концентрація бактерій у кінці процесу –

45 г/л, питома швидкість росту – 0,1 год.<sup>-1</sup>. Визначити початкову концентрацію бактерій, валову швидкість росту, вихід біомаси із субстрату, питомі швидкості споживання субстрату та утворення оцтової кислоти.

3. У ферментатор з корисним об'ємом 50 м<sup>3</sup> надходить сушло із швидкістю 15 м<sup>3</sup>/год. Мікроорганізми культивуються безперервним способом у стаціонарному режимі. Визначити час перебування мікроорганізмів у ферментаторі, продуктивність по біомасі, питому і валову швидкості росту, якщо початкова масова концентрація біомаси становить 18 г/л, а час культивування – 4 год.

4. За 5 годин біосинтезу утворилось 10 г/л етилового спирту і 15 г/л дріжджів. Початкова масова концентрація дріжджів 12 г/л. Визначити час генерації, питому швидкість росту дріжджів і утворення етилового спирту, якщо було зброджено 10 г/л глюкози.

5. За 5 годин утворилось 12 кг/м<sup>3</sup> дріжджів і зброджено 10 кг/м<sup>3</sup> вуглеводів (PP). Визначити питому швидкість росту дріжджів і продуктивність процесу за біомасою для періодичного і безперервного способів культивування, якщо початкова масова концентрація дріжджів 8 кг/м<sup>3</sup>.

6. За 5 годин утворилось 10 г/л молочної кислоти. При цьому було використано 15 г/л глюкози. Масова концентрація бактерій у кінці процесу 20 г/л, питома швидкість росту 0,10 год.<sup>-1</sup>. Визначити початкову концентрацію бактерій, питомі швидкості споживання субстрату та утворення молочної кислоти.

7. У ферментер з корисним об'ємом 80 м<sup>3</sup> надходить поживне середовище із швидкістю 20 м<sup>3</sup>/год. Мікроорганізми культивуються безперервним способом в стаціонарному режимі. Визначити час перебування мікроорганізмів у ферментері, загальну і питому швидкості росту, якщо початкова масова концентрація біомаси 20 кг/м<sup>3</sup>, а тривалість культивування 5 годин.

8. За 5 годин утворилось 15 кг/м<sup>3</sup> дріжджів і зброджено 10 кг/м<sup>3</sup> вуглеводів. Визначити питому та загальну швидкості росту дріжджів і продуктивність за біомасою, якщо кінцева масова концентрація біомаси – 32 кг/м<sup>3</sup>.

9. Початкова масова концентрація дріжджів 15 кг/м<sup>3</sup>, кінцева – 28 кг/м<sup>3</sup>. Тривалість процесу – 6 годин. Процес проходить у ферментері з корисним об'ємом 80 м<sup>3</sup> і швидкістю розбавлення середовища 0,12 год.<sup>-1</sup>. Визначити загальну і питому швидкості росту дріжджів, швидкість припливу середовища.

10. Спиртове бродіння ведуть безперервним способом у стаціонарному режимі в апараті з корисним об'ємом 200 м<sup>3</sup>, приплив сушла 40 м<sup>3</sup>/год. За 5 годин зброджено 10 г/л вуглеводів. При початковій масовій концентрації спирту 2 г/л, його утворено 20 г/л і 15 г/л дріжджів. Визначити продуктивність системи за етиловим спиртом, питому швидкість росту дріжджів, їх вміст у кінці культивування.

11. Початкова масова концентрація дріжджів  $15 \text{ кг/м}^3$ , кінцева –  $28 \text{ кг/м}^3$ . Тривалість процесу – 6 годин. Процес проходить у ферментері з корисним об'ємом  $80 \text{ м}^3$  і швидкістю розбавлення середовища  $0,12 \text{ год.}^{-1}$ . Визначити загальну і питому швидкості росту дріжджів, швидкість припливу середовища.

12. Початкова масова концентрація бактерій  $15 \text{ г/л}$ , за 5 годин вона зросла до  $45 \text{ г/л}$  і було використано  $25 \text{ г/л}$  глюкози. Визначити питому швидкість росту, час та число генерацій за 1 годину, вихід біомаси із субстрату.

13. Початкова масова концентрація бактерій  $13 \text{ г/л}$ , за 3 години вона зросла до  $40 \text{ г/л}$  і було витрачено  $20 \text{ г/л}$  глюкози. Визначити вихід біомаси від спожитого субстрату, питому швидкість росту і ефективність споживання субстрату.

14. Початкова масова концентрація дріжджів  $10 \text{ кг/л}$ , кінцева –  $15 \text{ кг/л}$ . Тривалість процесу 6 годин, швидкість розчинення середовища  $0,2 \text{ год.}^{-1}$ . Визначити питому і загальну швидкості росту дріжджів, продуктивність процесу за біомасою, при корисному об'ємі культуральної рідини  $250 \text{ м}^3$ .

15. Початкова масова концентрація дріжджів  $20 \text{ кг/м}^3$ , за 4 години вона зросла до  $50 \text{ кг/м}^3$ . Біосинтез ведеться безперервним способом у ферментері із загальним об'ємом  $100 \text{ м}^3$  і корисним об'ємом  $80 \text{ м}^3$ , приплив суслу  $20 \text{ м}^3/\text{год}$ . Визначити питому та загальну швидкості росту дріжджів, швидкість розбавлення середовища та дати характеристику процесу.

16. Початкова масова концентрація дріжджів  $23 \text{ г/л}$ , питома швидкість розмноження  $0,05 \text{ год.}^{-1}$ . За 5 годин масова концентрація субстрату зменшилась на  $10 \text{ г/л}$ . Обчислити вміст дріжджів у кінці культивування, питому швидкість споживання субстрату і вихід біомаси із субстрату.

17. За 3 години біосинтезу утворилось  $6 \text{ г/л}$  оцтової кислоти. При цьому було використано  $10 \text{ г/л}$  глюкози. Масова концентрація бактерій в кінці процесу  $15 \text{ кг/м}^3$ , питома швидкість росту  $0,16 \text{ год.}^{-1}$ . Визначити початкову концентрацію бактерій, питомі швидкості споживання субстрату та утворення оцтової кислоти.

18. Початкова концентрація бактерій  $8 \text{ г/л}$ , через 4 години вона становила  $16 \text{ г/л}$ , а концентрація субстрату зменшилась на  $12 \text{ г/л}$ . Визначити питому і загальну швидкості росту, продуктивність за біомасою у разі періодичного процесу, час генерації.

#### **4. Поживні середовища для вирощування мікроорганізмів**

Поживні середовища, на яких вирощують мікроорганізми, мають відповідати таким мінімальним вимогам: у них мають бути присутні всі елементи, з яких будується клітина, причому в такій формі, в якій мікроорганізми здатні їх засвоювати.

До складу бактеріальної клітини входять такі елементи (% до маси сухої речовини): вуглець – 50; кисень – 20; азот – 10-14; водень – 8; фосфор – 3; сірка, калій, натрій – 1; кальцій, магній, хлор – 0,5; залізо – 0,2; решта елементів – близько 0,3.

Тільки невелика кількість елементів періодичної системи потрібна мікроорганізмам у відносно високих концентраціях ( $10^{-3}$ - $10^{-4}$  М). **Це десять головних біологічних елементів:** вуглець, кисень, водень, азот, сірка, фосфор, калій, магній, кальцій та залізо. Крім десяти головних біоелементів, мікроорганізмам необхідні мінорні біоелементи, джерелом яких, як правило, є водопровідна вода.

Численні потреби мікроорганізмів обумовлюють велике розмаїття живильних середовищ, а для окремих видів бактерій існують спеціальні середовища. Частина їх готують у лабораторіях безпосередньо перед посівом, але з кожним роком з'являються все нові й нові середовища заводського виготовлення (сухі), які здатні задовольнити найвибагливіші потреби мікробіологів. Вони зберігаються тривалий час, мають стандартний склад.

Середовища класифікують за консистенцією, складом, походженням, забрудненістю матеріалу та призначенням.

При класифікації поживних середовищ за *консистенцією* поживні середовища поділяють на *щільні (тверді), напіврідкі і рідкі*. Напіврідкі та щільні середовища готуються з рідких, додаючи відповідно 0,3-0,7% та 1,5-2,0% агару. Останній представляє собою волокнистий матеріал, який добувають з морських водоростей. Складається він з полісахаридів (70-75%), білків (2-3%), основними складовими є високомолекулярні агароза та агаропептин. Агар розчиняється у воді при підвищеній температурі, а застигаючи, надає середовищу желеподібну консистенцію та стійкість до ферментних систем бактерій. Саме за ці властивості він набув широкого розповсюдження у мікробіологічній практиці. Для створення щільних середовищ використовують також желатин (10-15%), згорнуту сироватку крові.

При класифікації поживних середовищ за *складом* виділяють білкові, безбілкові і мінеральні середовища.

При класифікації поживних середовищ за *походженням* середовища поділяють на штучні та природні.

*Штучні середовища* створюють шляхом комбінування різноманітних субстратів, що забезпечують ті чи інші потреби мікроорганізмів. Їх використовують, в основному, для експериментального вивчення окремих ланок метаболізму бактерій. Штучні середовища поділяють на тваринні (наприклад, м'ясо-пептонний агар (МПА) або м'ясо-пептонний бульйон (МПБ)) і рослинні (наприклад, настої сіна і соломи, відвари злаків, дріжджів або фруктів, пивне сушло та ін.).

*Природні поживні середовища* можуть містити компоненти тваринного (наприклад, кров, сироватка, жовч, молоко, яйця, м'язова

тканина) або рослинного (наприклад, шматочки овочів і фруктів) походження.

Класифікація поживних середовищ *за забрудненістю* матеріалу. Якщо матеріал слабо забруднений сторонньою мікрофлорою, то для виділення чистих культур застосовують прості (за складом) середовища. При рясній контамінації сапрофітами використовують спеціальні або елективні (для окремих видів), селективні (тільки для окремих бактерій), диференційно-діагностичні (для полегшення ідентифікації) середовища.

За *призначенням* виділяють консервуючі середовища (для первинного посіву та транспортування), середовища збагачення (для нагромадження певної групи бактерій), середовища для культивування (універсальні прості, складні спеціальні та для токсиноутворення), середовища для виділення та накопичення (консервуючі, збагачення та елективні) і середовища для ідентифікації (диференціальні й елективні-диференціальні).

Залежно від потреб живильні середовища поділяються на п'ять основних груп:

Перша група – універсальні (прості) середовища. До них належать м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) та м'ясо-пептонний агар (МПА). За своїм складом, наявністю живильних речовин вони придатні для культивування багатьох видів бактерій.

Друга група – спеціальні середовища. Вони використовуються в тих випадках, коли мікроорганізми не ростуть на простих. До них належить кров'яний, сироватковий агари, сироватковий бульйон, асцитичний бульйон (*складається з рівних об'ємів поживного бульйону і стерильної асцитичної серозної рідини (рідше містить кров або лімфу), що накопичується в черевній порожнині при асциті (водянка)*), асцит-агар та інші.

Третя група – елективні середовища, на яких мікроорганізми певного виду ростуть швидше, більш інтенсивно, опереджають у своєму розвитку інші види бактерій. Наприклад, 1% лужна пептонна вода є елективним середовищем для холерних вібріонів, середовища Ру та Леффлера – для збудників дифтерії

Четверта група – селективні середовища, які завдяки додаванню певних компонентів (жовч, фарби, антибіотики та ін.) здатні пригнічувати розвиток одних видів мікроорганізмів, але не впливають на інші види. Так, середовище Мюллера є селективним для тифо-паратифозних бактерій, фуразолідоно-твіновий агар – для коринебактерій і мікрококів. Додавання антибіотиків до складу середовищ робить їх селективними для грибів (напр. середовище Сабуро та ін.).

П'ята група – диференціально-діагностичні середовища. Це велика група середовищ, які дозволяють визначити певні біохімічні властивості мікроорганізмів і проводити їх диференціацію. Вони поділяються на середовища для визначення протеолітичних, пептолітичних, цукролітичних, гемолітичних, ліполітичних, редукуючих властивостей (середовища Ендо, Левіна, Плоскірева, Гісса).

Живлення – процес отримання із навколишнього середовища і засвоєння організмом речовин та енергії, що використовуються ним для підтримання життєдіяльності, росту та розмноження. У процесі історичного розвитку (філогенезу) виникло кілька груп організмів, що відрізняються за типом живлення і особливостями обміну речовин (табл. 3).

У класифікації типів живлення у мікроорганізмів використовують термінологію, запропоновану у 1946 р. на симпозіумі у Колд Спринг Харбор. Розглядають типи живлення (трофії) щодо:

- 1) джерела енергії (**хемо** – хімічне, **фото** – світлове);
- 2) донора електронів (**органо** – органічна речовина, **літо** – неорганічна; неорганічними донорами електронів є  $H_2$ ,  $NH_3$ ,  $H_2S$ ,  $S$ ,  $CO$ ,  $Fe^{2+}$  та ін.);
- 3) джерела вуглецю (**авто** – вуглекислота, **гетеро** – органічна сполука).

Таблиця 3

### Класифікація організмів за типом живлення

Джерело енергії	Джерело електронів	Джерело вуглецю	Група мікроорганізмів
світло	неорганічні сполуки	$CO_2$	фотолітоавтотрофи
світло	неорганічні сполуки	органічні сполуки	фотолітогетеротрофи
світло	органічні сполуки	$CO_2$	фотоорганоавтотрофи
світло	органічні сполуки	органічні сполуки	фотоорганогетеротрофи
хімічні реакції	неорганічні сполуки	$CO_2$	хемолітоавтотрофи
хімічні реакції	неорганічні сполуки	органічні сполуки	хемолітогетеротрофи
хімічні реакції	органічні сполуки	$CO_2$	хемоорганоавтотрофи
хімічні реакції	органічні сполуки	органічні сполуки	хемоорганогетеротрофи

Тіло живих істот побудоване із органічних речовин, основу яких становить хімічний елемент Карбон. Для багатьох організмів єдиним або принаймні основним джерелом карбону є неорганічна сполука – вуглекислий газ. Такі організми називаються автотрофами. Хоча всі бактерії можуть засвоювати  $CO_2$ , це дуже енергозатратний процес і багато з них віддають перевагу готовим органічним речовинам. Такої ж стратегії живлення – використання як джерела карбону органічних сполук, синтезованих іншими організмами, або гетеротрофності – дотримуються і тварини та гриби.

Крім карбону в процесі живлення організми також повинні отримувати енергію та електрони. Як джерело енергії може використовуватись тільки світло (фототрофами) та відновлені хімічні речовини (хемотрофами). Електрони організми можуть добувати з органічних речовин (тоді вони називаються органотрофами) або неорганічних (літотрофи).

Майже всі еукріотичні організми та більшість прокаріот належать до однієї із двох груп: фотолітоавтотрофи (інколи просто фотоавтотрофи) або хемоорганогетеротрофи (інколи хемогетеротрофи або просто гетеротрофи). Проте для бактерій характерна велика різноманітність типів метаболізму,



серед них зустрічаються також і фотоорганогетеротрофи та хемолітоавтотрофи.

### Приклади вирішення завдань

**Завдання 1.** Чи правильно вказаний склад поживного середовища, г/л: глюкоза – 15;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 2,0;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,1? Якщо так, для вирощування яких саме мікроорганізмів це середовище може бути використане?

У середовищі наведеного складу глюкоза є джерелом вуглецю, кисню та водню, хлорид амонію – азоту, хлорид калію – калію, сульфат магнію – сірки та магнію, хлорид кальцію – джерелом кальцію. З необхідних 10 головних біоелементів у даному середовищі присутні лише вісім. Середовище не містить фосфору, який є компонентом нуклеїнових кислот, фосфоліпідів та нуклеотидів, а також заліза, що входить до складу цитохромів, фередоксинів, інших залізосіркопротеїдів, а також є кофактором ферментів.

Отже, поживне середовище наведеного складу непридатне для вирощування мікроорганізмів.

**Завдання 2.** Назвіть тип живлення, якщо джерелом енергії є  $\text{NH}_3$ , донором електронів –  $\text{NH}_3$ , джерелом вуглецю –  $\text{CO}_2$ .

Отже, згідно з умовою завдання, щодо джерела вуглецю ( $\text{CO}_2$ , неорганічна сполука) тип живлення визначають як автотрофію, щодо джерела енергії ( $\text{NH}_3$ , хімічна неорганічна сполука) – як хемотрофію, щодо донора електронів ( $\text{NH}_3$ , неорганічна сполука) – як літотрофію. Тип живлення – хемолітоавтотрофія.

**Завдання 3.** Концентрація сульфату амонію у середовищі культивування бактерій становить 1,2 г/л. Розрахувати теоретично можливий рівень біомаси.

Вміст азоту в біомасі бактерій становить 10-14% від маси сухої речовини. Для визначення рівня біомаси, якого можна досягнути при культивуванні бактерій на середовищі з 1,2 г/л сульфату амонію, потрібно спочатку розрахувати вміст елементного азоту в даній солі. Молекулярна маса сульфату амонію –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – становить 132. Отже, у 132 г сульфату амонію міститься 28 г азоту, а в 1,2 г цієї солі вміст азоту дорівнює:  $(1,2 \cdot 28) / 132 = 0,26$  г. Якщо у біомасі міститься 10% азоту, то з 0,26 г азоту можна одержати 2,6 г/л біомаси.

### Завдання для самостійної роботи

1. Чи правильно вказаний склад поживного середовища? В 1 дм<sup>3</sup> води розчиняють: 0,7 г  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,6 г  $\text{KCl}$ , 0,3 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,084 г  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ , 8 мл 0,1 н  $\text{NaOH}$ , 20 г глюкози. Якщо так, для вирощування яких саме мікроорганізмів це середовище може бути використане?

2. Чи правильно вказаний склад поживного середовища? В  $1 \text{ дм}^3$  середовища міститься: 20 г сахарози, 3 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 г NaCl, 0,4 г  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1г  $\text{FeHPO}_4$ . Якщо так, для вирощування яких саме мікроорганізмів це середовище може бути використане?

3. Назвіть тип живлення, якщо джерелом енергії є світло, донором електронів –  $\text{H}_2$ , джерелом вуглецю –  $\text{CO}_2$ .

4. Назвіть тип живлення, якщо джерелом енергії є  $\text{Fe}^{+2}$ , донором електронів – глюкоза, джерелом вуглецю – глюкоза.

5. Назвіть тип живлення, якщо джерелом енергії є світло, донором електронів –  $\text{NH}_3$ , джерелом вуглецю – глюкоза.

6. Концентрація фосфату амонію у середовищі культивування бактерій становить 15,5 г/л. Розрахувати теоретично можливий рівень біомаси.

## Перелік літератури

1. Безбородов А. М. Микробиологический синтез / А. М. Безбородов, Г. И. Квеситадзе. – СПб. : Проспект Науки, 2011. – 144 с.
2. Биотехнология : учебное пособие для вузов : в 8 кн. / под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова – М., 1987.
3. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. – М. : КолосС, 2004. – 296 с
4. Блинов В. А. Общая биотехнология : курс лекций, в 2-х частях. Ч. 1 / В. А. Блинов. – Саратов, 2003.
5. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 592 с.
6. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. – М. : Элевар, 2000. – 512 с.
7. Елинов Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. – СПб. : Наука, 1995. – 287 с.
8. Клунова С. М. Биотехнология : учебник / С. М. Клунова, Т. А. Егорова, Е. А. Живухина. – М.: Академия, 2010. – 256 с.
9. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія : підручник / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. – К. : НУХТ, 2009. – 336 с.
10. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник / Т. П. Пирог. – 2-е вид., доп. і перероб. – К. : НУХТ, 2010. – 632 с.

Навчальне видання

## **ЗАГАЛЬНА БІОТЕХНОЛОГІЯ**

Методичні рекомендації

Укладач: **Юлевич** Олена Іванівна

Формат 60x84,1/16. Ум.друк.арк.7,06

Тираж 30 прим. Зам.№ \_\_\_\_\_

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

54020, м.Миколаїв, вул. Г. Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.