

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

**Факультет технології виробництва і переробки
продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології**

Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології

**Мікробіологічне виробництво кормів та
кормових добавок**

**Методичні рекомендації
для виконання лабораторних занять
для здобувачів вищої освіти ступеня СВО «Бакалавр»
спеціальності 162 - «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми навчання**

**Миколаїв
2020**

УДК 606 : 636.085
М 59

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від 17 червня 2020 р., протокол № 11.

Укладач:

О. О. Кравченко – канд. с.-г. наук, доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

О. Л. Гіржева – канд. с.-г. наук, доцент кафедри екології та природоохоронних технологій, Національний університет кораблебудування ім. адм. Макарова;
С. П. Кот – кандидат біологічних наук, доцент кафедри зоогігієни та ветеринарії, Миколаївський національний аграрний університет.

© Миколаївський національний аграрний університет, 2020

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
Основні правила техніки безпеки при виконанні лабораторних робіт.....	6
МОДУЛЬ 1. Виробництво амінокислот та білків.....	7
Лабораторна робота 1, 2. Підготовка сировини. Культивування мікроорганізмів – продуцентів білка на гідролізатах, сульфідних лугах і передгідролізатах та гідролізатах торфу....	7
Лабораторна робота 3, 4. Культивування мікроорганізмів – продуцентів білка на зерно-картопляній та мелясній барді та рідких парафінах нафти та газоподібних вуглеводах.....	13
Лабораторна робота 5, 6. Отримання амінокислот з білкових гідролізатів.....	18
Лабораторна робота 7. Отримання амінокислот мікробіологічним і хімічним шляхом.....	23
Лабораторна робота 8. Відокремлення біомаси продуцента від рідкої фази, її концентрація і сушіння.....	28
МОДУЛЬ 2. Виробництво ліпідів та поліцукрів	32
Лабораторна робота 9. Характеристика мікроорганізмів – продуцентів ліпідів і поліцукрів.....	32
Лабораторна робота 10. Біосинтез ліпідів мікроорганізмами	36
Лабораторна робота 11. Апаратуро-технологічна схема отримання мікробних ліпідів.....	41
Лабораторна робота 12, 13, 14. Культивування мікроорганізмів на вуглеводних середовищах та білково-жирових дріжджів на парафінах нафти.....	49
МОДУЛЬ 3. Виробництво ферментів та БАР.....	52
Лабораторна робота 15. Дія ферментів та БАР як стимуляторів росту.....	52
Лабораторна робота 16. Технологічні схеми виробництва кормових антибіотиків.....	56

Лабораторна робота 17. Організація виробництва кормових антибіотиків на спиртових заводах.....	61
Лабораторна робота 18, 19. Технологічне обладнання для виробництва вітамінів.....	66
Лабораторна робота 20. Технологічна схема виробництва жиру-та водорозчинних вітамінів.....	71
Лабораторна робота 21. Технологічні схеми та обладнання для виробництва ферментів.....	77
Лабораторна робота 22. Промислова технологія отримання ферментів з мікроорганізмів.....	85
Лабораторна робота 23. Технологічні схеми та обладнання для виробництва пробіотиків.....	89
МОДУЛЬ 4. Біотехнологічна консервація кормів.....	94
Лабораторна робота 24. Технологічні схеми та обладнання для виробництва бактеріальних заквасок.....	94
Лабораторна робота 25. Бродильні і окислювальні процеси отримання органічних кислот.....	97
Лабораторна робота 26, 27. Технологія отримання оцтової кислоти та пропіонової кислоти.....	102
Література.....	105

ВСТУП

Вчення про мікробіологічне виробництво кормів та кормових добавок є одним з розділів біотехнології, інтегральною областю науки і техніки, яке опирається на теоретичні та методичні положення молекулярної біології і генетики, мікробіології, біохімії, фізіології і цитології, а також використовує прогресивні хімічні технології.

Аналіз кінцевих фактичних матеріалів дозволить студентам отримати навички наукового мислення, раціонального представлення і коректної інтерпретації даних.

В практичному відношенні “Мікробіологічне виробництво кормів та кормових добавок” є важливим комплексом практичних навичок для отримання промисловим способом цінних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів, їх біомаси, отримання корисних речовин (препаратів), що використовуються в годівлі тварин.

Дисципліна вивчає отримання кормових засобів та добавок на основі промислових штамів мікроорганізмів. Фізіологію мікроорганізмів, технологію приготування поживних середовищ, методи культивування, управління процесом вирощування промислових штамів та отримання на їх основі продуктів мікробного синтезу з урахуванням нагальних потреб агровиробництва та новітніх перспективних розробок у виробництві кормів та кормових добавок.

ОСНОВНІ ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ ВИКОНАННІ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Робота в лабораторії вимагає уваги та обережності для запобігання нещасним випадкам, які можуть статися внаслідок недбалого ставлення до їдких, горючих і отруйних речовин, недотримання техніки безпеки під час роботи з приладами.

На заняття студенти повинні приходити в чистому, охайному спецодязі, дотримуватись певних правил виконання робіт, а саме:

- при змішуванні концентрованої кислоти з водою лити кислоту у воду, а не навпаки;
- у разі потрапляння на відкриті ділянки шкіри концентрованої кислоти або лугу слід негайно промити їх великою кількістю води. При опіку кислотами промити уражене місце 3-5%-м розчином соди, а при опіку лугами 2-3%-м розчином борної чи оцтової кислоти. Після цього уражену ділянку знову промити водою;
- роботи, пов'язані з виділенням шкідливих і отруйних речовин (хлору, сірчистого газу, оксидів азоту, аміаку тощо), треба виконувати тільки у витяжній шафі;
- кристалічний луг слід брати тільки пінцетом, щоб запобігти потраплянню навіть найдрібніших його частинок на шкіру, а особливо в очі;
- набираючи рідину в піпетку, треба стежити за тим, щоб кінчик її був занурений у рідину, інакше остання дуже швидко засмоктується в рот;
- при перенесенні посудини з гарячою рідиною треба відсторонити її від себе, тримати обома руками, притримуючи однією, прикритою рушником чи ганчіркою, під дно;
- слід пам'ятати, що лужні розчини киплять з поштовхами, тому склянки з ними на електроплиті можуть перекинутись;
- при перегонці не залишати прилад без нагляду, стежити, щоб через холодильник постійно протікала холодна вода;
- скляний посуд під час роботи з ним і миття легко б'ється. Для запобігання пораненню рук треба обережно з ним поводитись;
- слід бути обережними під час роботи з електроприладами. Не дозволяється виконувати самостійно будь-які ремонтні роботи;
- після закінчення роботи прилади треба вимкнути і перекрити водопровідні та газові крани;
- при неполадках у приладах, апаратах треба звертатися до викладача або лаборанта.

МОДУЛЬ 1

ВИРОБНИЦТВО АМІНОКИСЛОТ ТА БІЛКІВ

Лабораторна робота № 1, 2.

Тема: Підготовка сировини. Культивування мікроорганізмів – продуцентів білка на гідролізатах, сульфідних лугах і передгідролізатах. Культивування мікроорганізмів – продуцентів білка на гідролізатах торфу

Мета заняття: ознайомитись з методикою культивування мікроорганізмів – продуцентів білка на гідролізатах, сульфідних лугах і передгідролізатах.

Методичні вказівки: Для виробництва кормових дріжджів в якості сировини можна використати верховий торф. Придатними для гідролітичної переробки визнані торфи мохової групи з мірою розкладання до 20%. Ця група торфів представлена наступними видами: медіум-, фускум-торфом, сфагновим мочажинним і комплексним верховим.

Характеристика торфу як сировини для вирощування мікроорганізмів. Органічна частина торфу має складний хімічний склад і включає такі компоненти, як бітуми, водорозчинні, легко гідролізовані полісахариди (геміцелюлози) і гумінові речовини (фульво- і гумінові кислоти), важко гідролізовані полісахариди, представлені в основному целюлозою, і негідролізований залишок. Вміст цих компонентів у торфі різний і залежить від ботанічного складу міри розкладання торфу. Хімічний елементарний склад деяких початкових торфоутворень, вуглеводний склад фракцій легко- і важко гідролізованих полісахаридів приведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Хімічний елементарний склад деяких початкових торфоутворень

Моносахарид	Вміст моносахаридів, %			
	Легко гідролізовані		Важко гідролізовані	
	від розчиненої речовини	від органічної речовини	від розчиненої речовини	від органічної речовини
Галактоза	27,7	8,7	-	-
Глюкоза	19,4	6,1	77,8	19,6

Маноза	11,1	3,5	7,0	1,8
Арабіноза	3,9	1,2	-	-
Ксилоза	16,6	5,2	4,3	1,1

При характеристиці торфу як сировини для мікробіологічної промисловості найбільше значення має встановлення природи речовин, що переходять в розчин при гідролізі розбавленою соляною кислотою (табл. 2).

Таблиця 2

Встановлення природи речовин

Компоненти торфу	Вміст(у % від абсолютно сухої речовини) у торфі				
	медіум		фускум		сфагновому мочажинному
	З мірою розкладання, %				
	4-5	15- 18	5-3	20- 23	5-10
Зольні речовини	2,06	1,61	2,35	2,14	2,00
Речовини, що екстрагуються сумішшю спирт-бензол	4,53	7,00	3,05	8,23	3,10
Речовини, що переходять в розчин при геміцеллюлозному гідролізі	61,2	48,9	58,9	41,7	59,6
Легко гідролізовані полісахариди	25,9	26,3	28,0	18,5	32,1
Важко гідролізовані полісахариди	16,6	14,5	17,4	12,2	19,0
Полісахариди(загальний вміст)	42,5	40,8	45,4	30,7	51,1
Целюлоза(за глюкозою)	13,95	-	14,36	10,72	-
Негідролізований залишок	16,3	25,6	15,3	37,7	13,9
Азот(загальний)	0,73	1,09	0,76	1,23	0,89
Ацетилові групи	0,50	0,39	0,40	0,40	0,47
Метоксильні групи	0,92	1,23	0,86	1,34	0,81
Уронові кислоти	16,1	11,3	17,4	10,4	13,0
Потенційний фурфурол	11,8	11,3	11,8	7,8	11,8

Способи і особливості гідролізу торфу. Для гідролізу торфу можуть бути використані наступні способи:

Стаціонарний спосіб гідролізу. Здійснюється розбавленими кислотами при підвищеному тиску і високій температурі з відділенням гідролізату від лігніну ззовні гідроліз-апарата. Гідроліз проводиться при наступному режимі: гідромодуль (відношення маси екстрагуючої рідини до маси оброблюваного матеріалу) 10, концентрація кислоти 0,3%, тиск 0,7-0,9 МПа, час гідролізу (варіння) 20-30 хв. Після закінчення варіння вміст гідроліз-апарата видувається в сщежу, де гідролізат відділяється від лігніну, потім лігнін віджимається на пресах. Вільно стікаючий і віджимний гідролізат нейтралізують і піддають біохімічній переробці. Вихід розчиненої речовини 24,3% від абсолютно сухої речовини торфу, концентрація розчиненої речовини в гідролізаті 2,0-2,4%.

Безперервний гідроліз торфу по методу П. Ф. Сопіна. Здійснюється 0,5% сірчаною кислотою при 160°C. Прогрівання торфу і змішування його з кислотою мають бути рівномірними. Торф підігрівається парою, що утворюється при охолодженні гідролізованого торфу, і подається в апарат для гідролізу, де він нагрівається до температури реакції. Потім вводиться в апарат розбавлена кислота і здійснюється гідроліз торфу. При охолодженні прогідролізованого торфу утворюється пара від самовипаровування, яка і використовується на першій стадії процесу. Вихід розчиненої речовини за цим методом складає 23,5%.

Хімічний склад гідролізату торфу, отриманого при гідролізі 0,5% сірчаною кислотою, наступний (у %): редукуючі речовини – 1,26-1,95 (у тому числі після інверсії 1,26–2,01); азот загальний – 0,016-0,038, мінеральний – 0,0007-0,0088, органічний – 0,015-0,029; зола – 0,097-0,191; фурфурол–0,017-0,043.

При гідролізі торфу негідролізований залишок, до складу якого входять неуглеводні компоненти (гумінові і фульвокислоти, бітуми, віск і лігнін), складає 35-50% від маси торфу, що переробляється.

Гідроліз торфу малою кількістю концентрованої сірчаної кислоти. За цим способом можна отримати вихід розчиненої речовини до 36,7%.

Гідроліз торфу проводиться в шнековому гідроліз-апараті, в якому суміш торфу з кислотою піддається інтенсивному стисканню і стиранню, що супроводжуються підвищенням температури до 70-

110°C. В таких умовах значна частина полісахаридів торфу гідролізується. Торф'яна гідролізована маса, що містить продукти гідролізу і реверсії, змішується з водою в співвідношенні 1:3/4. Легко рухлива пульпа піддається інверсії при 120°C і поступає на барабанний вакуум-фільтр.

Комбінований метод гідролізу торфу концентрованою сірчаною кислотою. Верховий торф з мірою розкладання 10% спочатку гідролізують 0,5% сірчаною кислотою і тиску 0,6 МПа впродовж 30 хв. Гідролізат геміцелюлози відділяють, торф'яний целолігнін висушують, змізерніють і змішують з 80% сірчаною кислотою. Потім проводять додатковий гідроліз при температурі 60-65°C, гідролізат інвертують 10% сірчаною кислотою впродовж 3 год при 100°C. При лабораторних випробуваннях вихід розчиненої речовини по цьому методу практично рівний теоретично можливому. Вплив на процес гідролізу гідромодуля кислоти в діапазоні від 1:1 до 1:0,1 відповідно до результуючої концентрації кислоти і співвідношення твердої і рідкої фаз представлено в таблиці 3.

Таблиця 3

Результуюча концентрація кислоти і співвідношення твердої і рідкої фаз

Гідромодуль кислоти	Результативна концентрація, %	Співвідношення твердої і рідкої фаз, кг/кг	Водорозчинні рідкі речовини, % від маси торфу		Легко гідролізовані розчинні речовини, % від маси торфу	Важко гідролізовані розчинні речовини, % від маси торфу
			Без інверсії	Після інверсії		
0,1	21,4	1:0,47	16,4	25,3	8,3	14,2
0,15	28,0	1:0,53	16,1	15,0	8,1	13,9
0,2	33,3	1:0,60	15,8	24,6	8,0	13,7
0,3	40,9	1:0,73	15,6	24,6	7,6	13,0
0,6	52,9	1:1,13	15,8	25,3	7,1	12,3
1,0	60,0	1:1,67	15,8	27,4	3,8	7,8

Безперервний спосіб гідролізу розбавленою сірчаною кислотою із застосуванням реактора ідеального витіснення. Цей спосіб є перспективним і заслуговує на найбільшу увагу.

За цим способом (рис. 1) верховий торф будь-якої вологості, шляхом змішування з водою (гідромодуль 8) перетворюється на пульпу.

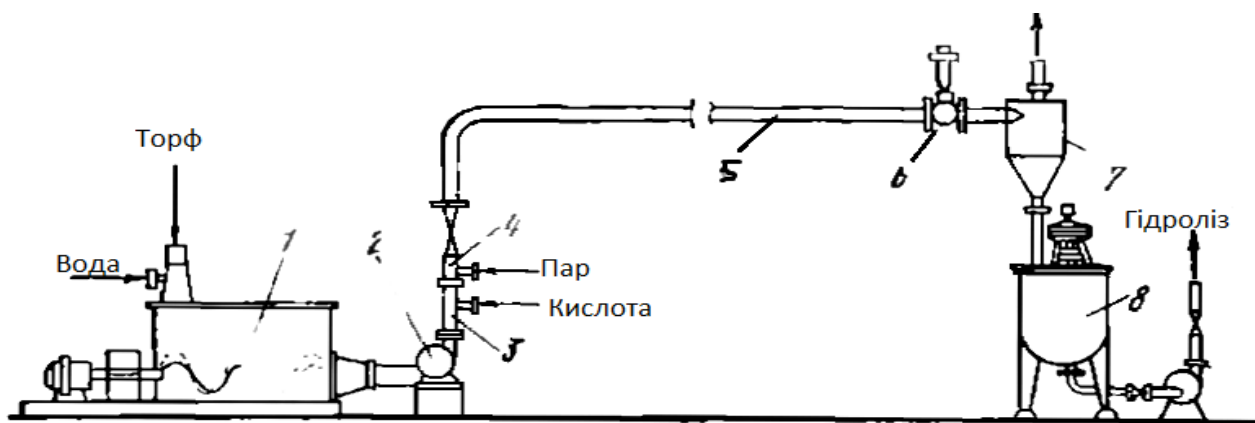


Рис. 1. Схема безперервного гідролізу торфу із застосуванням реактора ідеального витіснення

1 – змішувач; 2 – насос; 3 – змішувач (для введення в пульпу кислоти); 4 – підігрівач; 5 – реактор; 6 – регулятор видачі гідролізату; 7 – випарник; 8 – збірник гідролізату.

Насосом 2 пульпа подається в змішувач інжекторного типу 3, де змішується з концентрованою сірчаною кислотою до створення в розчині 0,5-0,7%кислоти. Потім пульпа проходить підігрівач інжекторного типу 4, нагріваючись до температури реакції (160-170°C), і поступає в трубчастий реактор 5 ідеального витіснення. У реакторі пульпа знаходиться впродовж часу, необхідного для отримання максимального виходу розчиненої речовини. Після цього через регулятор видачі 6 пульпа поступає у випарник, де відділяються пари самовипарення і температура знижується до 100-102°C. Далі пульпа йде на відділення осаду.

Технологічна схема отримання білкових препаратів при культивуванні мікроорганізмів на торф'яному гідролізаті наведена на рис. 2.

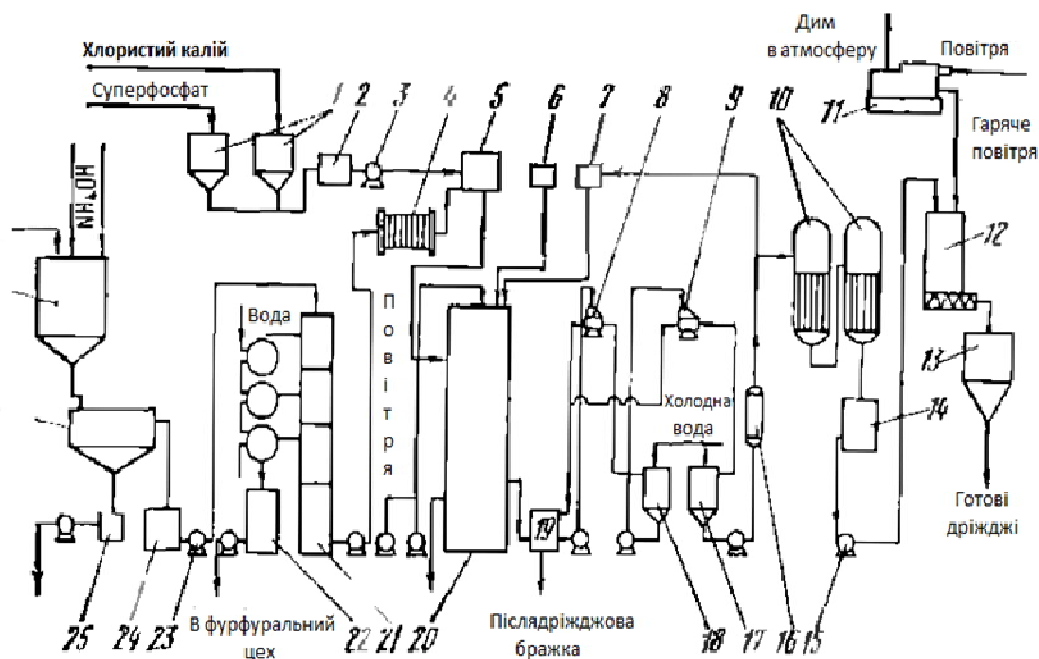


Рис. 2. Технологічна схема отримання білкових препаратів при культивуванні мікроорганізмів на торф'яному гідролізаті

1 – апарати для приготування поживних солей; 2 – збірик розчину поживних солей; 3, 15, 23 – насоси; 4 – пластинчатий теплообмінник; 5 – змішувач; 6 – бак для аміачної води; 7, 16 – плазмолізатори; 8, 9 – сентизатори відповідно першого і другого промивання дріжджів; 10 – корпуси випарної установки; 11 – паливна установка; 12 – розпорошувальна сушарка; 13 – бункер готових дріжджів; 14 – збірка концентрованих дріжджів; 17 – збирач промитих дріжджів; 18 – збірка дріжджів, обладнана мішалкою; 19 – двоступінчатий флотатор; 20 – дріжджовирощувальний апарат; 21 – триступінчатий вакуум-апарат (охолоджувач); 22 – збірка конденсату, що містить фурфурол; 24 – збірка очищеного конденсату; 25 – збірка шламу; 26 – відстійник нейтралізатора; 27 – нейтралізатор.

Питання для самоконтролю:

1. Характеристика торфу як сировини для вирощування мікроорганізмів.
2. Способи і особливості гідролізу торфу.
3. Стаціонарний спосіб гідролізу.
4. Безперервний гідроліз торфу по методу П. Ф. Сопіна.
5. Гідроліз торфу малою кількістю концентрованої сірчаної кислоти.
6. Комбінований метод гідролізу торфу концентрованою сірчаною кислотою.
7. Безперервний спосіб гідролізу розбавленою сірчаною кислотою із застосуванням реактора ідеального витіснення.

Лабораторна робота № 3, 4.

Тема: Культивування мікроорганізмів – продуцентів білка на зерно-картопляній та мелясній барді та рідких парафінах нафти та газоподібних вуглеводах

Мета заняття: Ознайомитись з усіма технологічними процесами вирощування мікроорганізмів на мелясній і зерно-картопляній барді.

Методичні вказівки: Технологічний процес вирощування мікроорганізмів на мелясній і зерно-картопляній барді, так само як більшість процесів отримання кормових дріжджів на інших сировинних джерелах, включає наступні стадії: підготовку сировини і приготування поживних середовищ, отримання посівного матеріалу, вирощування кормових дріжджів, виділення і згущування дріжджової біомаси, її вітамінізацію і сушіння.

Деякі технологічні особливості процесу вирощування мікроорганізмів на мелясній і зерно-картопляній барді пов'язані в основному з властивостями цього виду сировини, а також з можливістю використання вторинної барди після відділення від рідкої фази кормових дріжджів.

Характеристика сировини. Барда – відхід спиртового і ацетано-бутилового виробництва; вміст сухих речовин в ній досягає 8-12%. Залежно від якості початкової сировини і способів його переробки на заводах хімічний склад барди змінюється в широкому діапазоні:

Сполуки	Вміст в мелясній барді, % до сухої речовини
Білок (N×6,25)	11-12
Незброджений цукор	4-7
Гліцерин	7-9
Карбонові кислоти	13-20
Бетаїн	8-10
Глутамінова кислота	6-9
Інші амінокислоти	1-3
Гумін, меланоїдини, глюкозиди	10-15
Всього органічних сполук	68-72
K ₂ O	12,0-15,0

Na ₂ O	2,5-3,5
CaO	0,2-1,3
P ₂ O ₆	0,2-0,3
Інші неорганічні сполуки	10,5-11,9
Всього неорганічних сполук	26-32

	Вміст в ацетоно-бутиловій барді, %
Сухі речовини	2,81-4,45
у тому числі нерозчинні	1,05-1,30
Вуглеводи в перерахунку на глюкозу(після гідролізу)	0,62-0,96
Азотвмісні речовини	0,78-1,00
у тому числі розчинні	0,70-0,96
Клітковина	0,08-0,28
Зольні речовини	0,10-0,14
Інші екстрактні речовини (у тому числі жир)	0,12-0,47

У таблиці 4 приведений хімічний склад барди, отриманої при переробці різних культур. Склад дається на відсепаровану післяспиртову барду, що майже не містить відпрацьованих дріжджів.

Таблиця 4

Хімічний склад барди, отриманої при переробці різних культур

Сполуки	Вміст в зерно-картопляній барді(у %), отриманої з				
	жита	кукурудзи	вівса	ячменю	картоплі
Вода	92,7	92,4	93,1	92,9	95,0
Розчинні сухі речовини	2,9	2,5	2,0	2,7	2,0
Редукуючі речовини	0,4	0,5	0,3	0,4	0,2
Редукуючі речовини після гідролізу	0,3	0,6	0,6	0,4	0,3
Крохмаль	0,3	0,4	-	-	0,3
Пентозани (у фільтраті)	0,5	0,3	0,2	0,4	0,4
Геміцелюлози	1,7	1,6	1,3	1,2	1,0
Клітковина	0,5	0,3	0,8	0,7	0,2
Азот загальний	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
у тому числі у фільтраті	0,1	0,04	0,1	0,07	0,06
Зольні речовини	0,4	0,4	0,6	0,6	0,4
у тому числі у фільтраті	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
Жир	-	0,7	0,5	0,5	-
Загальний вміст сухої речовини	7,3	7,6	7,1	7,1	5,0

Підготовка сировини для культивування мікроорганізмів.

Гаряча післяспиртова барда перед вступом в цех кормових дріжджів додатково стерилізується, звільняється від гіпсу і охолоджується. Стерилізація барди робиться в секційному закритому стерилізаторі безперервної дії за температури 90-98°C впродовж 1 год. При підвищеному вмісті СаО в мелясі (більше 0,5-0,8%) гаряча барда підкисляється до рН 4,0-4,5 і витримується при температурі 80-85°C по 1 год в двох закритих збірках-декантаторах. Охолоджується барда в трубчастих або пластинчатих теплообмінниках.

У разі проведення безперервного процесу вирощування кормових дріжджів з охолодженої барди сепарацією відділяють мертві дріжджі. При періодичному і напівбезперервному процесах вирощування кормових дріжджів мертві дріжджі не відділяють.

Особливості складу поживного середовища і умов культивування мікроорганізмів на зерно-картопляній і мелясній барді.

Склад поживного середовища. Основою поживного середовища для вирощування мікроорганізмів є післяспиртова барда, але вона часто не містить потрібного для нормальної життєдіяльності дріжджів комплексу сполук. Тому залежно від складу барди її збагачують різними поживними речовинами.

Додаткові вуглецевмісні продукти (мелясу, кукурудзяний екстракт або гідрол) додають при розмішуванні до гарячої барди (у кількості 10 кг на 1 м³ барди) до стерилізації. Кислий гідролізат із вмістом розчиненої речовини 8-10% подаються безпосередньо в дріжджовирощувальний чан.

Недолік у барді засвоюваних форм азоту і фосфору заповнюється додаванням поживних солей і мінеральних кислот. Для інтенсивного розмноження дріжджів і забезпечення в дріжджах Р₂О₅ на рівні 3-3,5%, N – 7,0-8,0% (з розрахунку на суху речовину), а також з урахуванням деякого залишку цих сполук в культуральній рідині необхідно додати (у кг на 1 м³ барди): ортофосфорної кислоти 0,9-1,2, або діаммонійфосфату 1,0-1,2, або суперфосфату (18%) – 2,8-3,0; сульфату амонія 2,0-2,5.

Мінеральні кислоти потрібні для підтримки рН культуральної рідини на рівні 4,5-5,0, оскільки вони заміщають органічні карбонові кислоти, споживані в процесі культивування. При використанні моногідрата сірчаної кислоти витрата складає 8-10 кг на 1 м³ барди,

або 550-650 кг на 1 тону сухих дріжджів, при використанні соляної кислоти – 7-8 кг/м³, або 450 кг/т з розрахунку на 100%-ну кислоту.

Дослідження складу барди до і після процесу вирощування кормових дріжджів показують, що окремі компоненти поживних речовин використовуються по-різному (табл. 5).

Таблиця 5

Дослідження складу барди до і після процесу вирощування кормових дріжджів

Компоненти	Вміст, %		Відсоток споживання
	до вирощування	після вирощування впродовж 12 год	
Загальні сухі речовини	8,3	7,0	15,7
Органічні сухі речовини	6,1	4,2	31,4
Редукуючі речовини	0,28	0,15	46,4
Карбонові кислоти нелеткі	1,15	0,43	62,6
леткі	0,031	0,015	51,6
Гліцерин	0,62	0,20	67,8
Азот загальний	0,34	0,30	11,8
Бетаїн	1,33	1,25	6,0
Глутамінова кислота(після кислотного гідролізу)	0,48	0,43	10,1
Неорганічні сполуки	2,20	2,14	2,7

Умови культивування. Кількість кисню, необхідна для синтезу біомаси дріжджів, залежить від джерел вуглецю, що використовуються. Теоретично на асиміляцію дріжджами 1 кг глюкози потрібно близько 0,77 кг кисню, оцтової кислоти – 1,572 кг, бурштинової кислоти – 1,558 кг. Оскільки основними джерелами вуглецю у барді є карбонові кислоти, для їх засвоєння дріжджами вимагається майже в 2 рази більше кисню в порівнянні з середовищами, що містять вуглеводи. Отже, для отримання заданого виходу кормових дріжджів необхідно подавати таку кількість повітря, яка забезпечувала б приблизно на 1 кг спожитого джерела вуглецю 1,5 кг розчиненого кисню.

Великий вплив на накопичення біомаси робить рН поживного середовища. Зазвичай рН регулюється додаванням сірчаної кислоти. Найбільший вихід біомаси дріжджів спостерігається при рН 5,5-6,0 – до 74,5 г/л, але при цьому рН культуральна рідина сильно

вспінується і умови відділення дріжджової біомаси погіршуються. Тому вважається доцільним підтримувати початкове значення рН середовища на рівні 4,5-4,8, що забезпечує вихід дріжджів в середньому 65-69 г/л.

Температура культивування також є дуже важливим чинником, що впливає не лише на швидкість розмноження кормових дріжджів, але і на розвиток супутньої мікрофлори. Післяспиртова барда, як відомо, є сприятливим середовищем для розвитку кислотоутворюючих мікроорганізмів. Тому оптимальна температура вирощування кормових дріжджів на барді встановлюється з урахуванням міри інфікування культури іншими мікроорганізмами за цих умов. Звичайно це 30-33°C, подальше збільшення температури спричиняє за собою зниження виходу біомаси.

Склад кормових дріжджів, отриманих вирощуванням на зерно-картопляній(I) і мелясній(II) барді, наступний (у %):

	I	II
Волога	6-10	6-10
Сирий протеїн (N×6,25)	48-56	47-55
Вуглеводи	22-25	14-17
Жири	2-5	2-5
Зола	7-9	8-10

Вміст незамінних амінокислот міститься в дріжджах (у г на 100 г білку): триптофана – 0,4-0,7; лізину – 2,5-3,6; метіоніну – 0,7-1,0; аргініну – 1,4-2,6; гістидину – 1,2-2,0; треоніну – 4,2-2,6; валіну – 3,0-2,6; ізолейцину – 2,3-5,1; лейцину – 3,5-3,6; фенілаланіна – 2,4-3,1; цистину – 0,4-0,6.

Питання для самоконтролю:

1. Які стадії включає технологічний процес вирощування мікроорганізмів на мелясній і зерно-картопляній барді?
2. Від чого залежить зміна хімічного складу барди?
3. Яким методом визначається амінокислотний склад барди?
4. Описати технологію підготовки сировини для культивування мікроорганізмів.
5. Які складові має містити поживне середовище для культивування мікроорганізмів на мелясній і зерно-картопляній барді?
6. Охарактеризувати відмінності складу барди до і після процесу вирощування кормових дріжджів.
7. Яким умовам необхідно притримуватись при культивуванні мікроорганізмів на мелясній і зерно-картопляній барді?

Лабораторна робота № 5, 6.

Тема: Отримання амінокислот з білкових гідролізатів

Мета заняття: визначити всі методи та характеристики отримання амінокислот, розглянути етапи отримання амінокислот з білкових гідролізатів, та ознайомитись з біотехнологією отримання лізину.

Методичні вказівки: У тваринництві амінокислоти використовуються для компенсації нестачі протеїнів в рослинній їжі. Основним компонентом раціону тварин є побічні продукти сільськогосподарської галузі – макуха соняшника, кукурудзи, а також сіно, соломка та інші жорсткі види кормів. Пшениця, овес, жито, ячмінь, бобові використовуються в малих кількостях зважаючи на їх високу вартість. Тому спочатку рослинні корми досить бідні на протеїни, що негативно позначається на здоров'ї тварин і знижує вироблення кінцевого продукту – м'яса, жиру, яєць, пуху, шерсті.

Амінокислоти у складі комбікормів призначені для заповнення дефіциту білків. Без їх додавання до складу комбінованого корму виникають наступні проблеми:

- припинення або уповільнення зростання;
- зниження несучості у птахів;
- зниження відсотка жирової тканини у свиней;
- зниження смакових якостей і поживної цінності м'яса;
- збільшення витрат корму.

АК грають роль “будівельної” речовини у формуванні м'язової і кісткової тканини, шкірних покривів, оперення, шерсті. Для повноцінного харчування тварин з метою отримання максимального приросту м'язової та жирової маси амінокислоти додаються у вигляді синтетичних гранульованих добавок до комбікорму.

Оптимальне співвідношення амінокислот в раціонах кормів

У виробництві комбікормів важливо дотримуватися балансу амінокислот. Він впливає на якість засвоювання білків і амінокислот, що дозволяє отримувати максимальний приріст м'яса і понизити витрату кормів. Оптимальне співвідношення основних амінокислот – лізину і тріоніна – складає 1 до 0.63. Це дозволяє забезпечити

оптимальний відсоток засвоюваності білків, а також збільшити приріст м'язової тканини з мінімальною витратою комбікорму.

Амінокислоти можна отримувати з кислотних і лужних гідролізатів природних білків та з продуктів їх ферментативного розщеплення. Однак висока собівартість і дефіцитність вихідної сировини (відходи м'ясної промисловості, яєчний білок, казеїн молока, клітковина пшениці), а також багатоступенева хімічна обробка, пов'язана з виділенням амінокислот та їх очищенням, не дозволяють широко використовувати цей спосіб в промисловості. В процесі кислотного гідролізу білків спостерігається руйнування більшої частини триптофану, цистеїн при цьому окислюється в цистин, розпадаються треонин і серин. Певні недоліки має і метод ферментативного гідролізу. Зокрема, гідроліз може бути неповним, і сам фермент із звільненням амінокислот здатен розкладатися.

Біотехнологія отримання кормового лізину

Встановлено, що лізин в організмі є не тільки структурним елементом білка, але й виконує ряд найважливіших біохімічних функцій: є попередником каротину та оксилізину, забезпечує транспортування кальцію і стронцію в клітини тощо.

Концентрат лізину можна використовувати в рослинництві як стимулятор росту культурних рослин і атрактант ґрунтових шкідників насіння.

Для біосинтезу лізину використовують гомосериндефіцитні мутанти ауксотрофних бактерій родів *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* та ін.

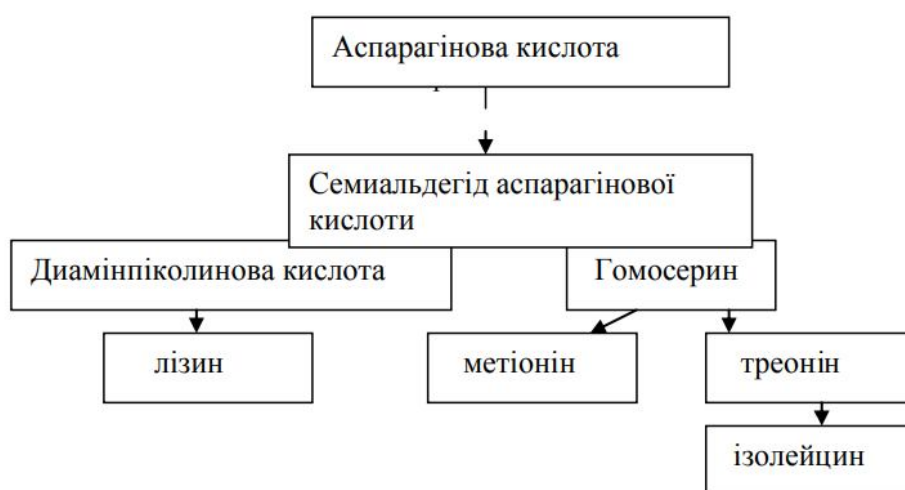


Рис. 5. Схема біосинтезу лізину у бактерій через діамінпіколінову кислоту.

У більшості природних штамів зазначених родів бактерій лізин разом з треоніном інгібує фермент аспартаткиназу, що уповільнює утворення лізину. Щоб усунути цей дефект, генетики створили штами, нездатні синтезувати гомосериндегідрогеназу. Таким чином, усувається накопичення гомосерину, треоніну і метіоніну. Якщо до середовища додати в необхідних для росту культури дозах треонін, метіонін або гомосерин, то відбувається інтенсивний синтез лізину.

Створено штами р. *Brevibacterium*, що забезпечують на м'ясному середовищі синтез лізину до 50-70 г/л, на сахарозних середовищах - до 100 г/л при продуктивності системи в напівбезперервному процесі 15-20 г/л на добу.

I. 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 висівок. Після стерилізації таке середовище використовують для вирощування посівного матеріалу і для головної ферментації. Діамінпіколоїнова кислота лізин Гомосерин метіонін треонін ізолейцин Семиальдегід аспарагінової кислоти Аспарагінова кислота

II. 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 м'ясному середовищі, якщо під час ферментації ввести дрібну підкормку частиною живильного середовища при дотриманні точної регуляції культивування. М'ясу можна замінити сахарозою, соком цукрового буряка, глюкозою або гідролізатом крохмалю, а також оцтовою кислотою і підняти концентрацію лізину до 100 г/л (рис. 1).

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

- Лізин елюїрують 2,0-3,5% розчином.

- Елюат упарюють у вакуумі при температурі 60 °C до 1/20 - 1/70 частини вихідного об'єму,

- потім, за допомогою НСІ встановлюють рН 4,5-5,0;
- охолоджують до 14-18°C
- кристалізують.

Після фільтрації і центрифугування кристалів одержують технічний лізин - 94-96% лізину монохлоргідрат.

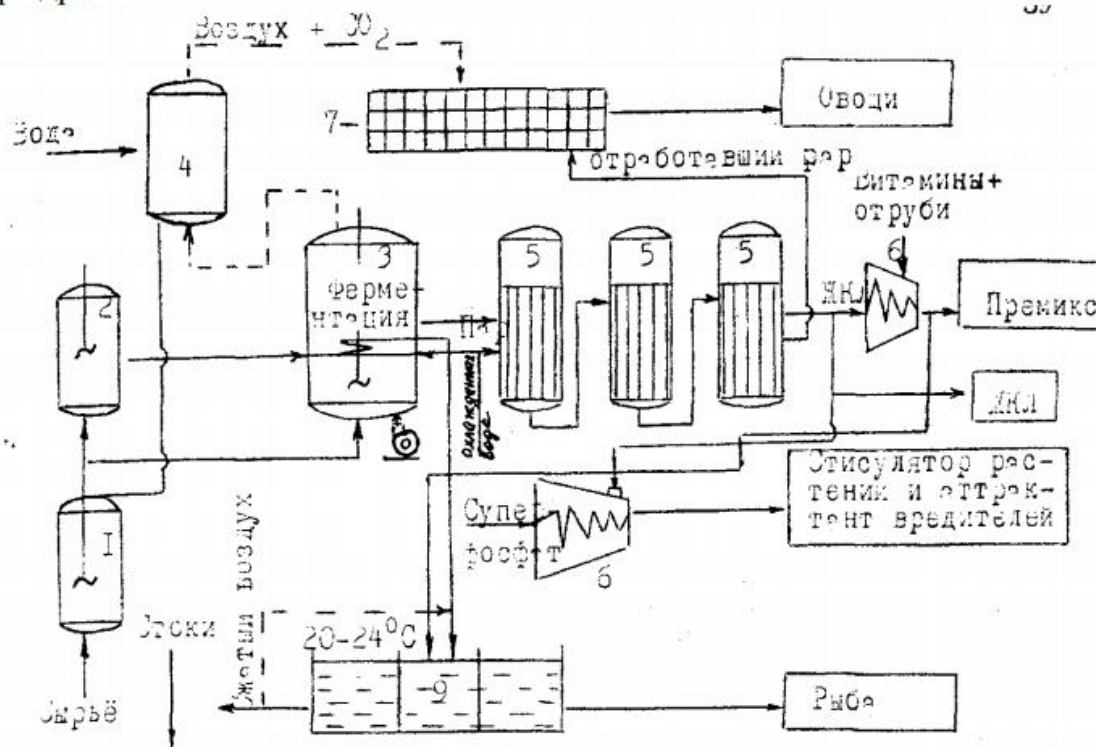


Рис. 6. Схема безвідходної технології одержання концентрату лізину.

1. блок приготування живильного середовища
2. інокулятори
3. ферментатори
4. скрублер
5. вакуум-випарна установка
6. блок приготування преміксів
7. теплиця
8. блок приготування аттрактантів
9. басейн для вирощування риби
10. рідкий концентрат лізину.

Для одержання чистого лізину кристали технічного лізину піддають нагріванню в невеликій кількості води 70 0 С, додають активоване вугілля, перемішують і фільтрують. За допомогою НСІ встановлюють рН 4,9, розчин упарюють і кристалізують. Кристали сушать при 60 0 С. Одержаний лізин містить 99,9% лізину

моноклоргідрату, і 0,1% золи і не більше 0,001% солей важких металів.

Для кормових потреб одержують концентрат лізину.

Питання для самоконтролю:

1. Для чого використовують амінокислоти в тваринництві?
2. Перерахуйте побічні продукти сільськогосподарської галузі.
3. Які проблеми виникають у тварин при нестачі амінокислот у комбінованому кормі?
4. Вкажіть функції виконують амінокислоти.
5. Назвіть методи отримання амінокислот.
6. Охарактеризуйте біотехнологію отримання кормового лізину.
7. Які штами забезпечують синтез лізину?
8. Охарактеризувати технологію одержання концентрату лізину?

Лабораторна робота № 7

Тема: Отримання амінокислот мікробіологічним і хімічним шляхом

Мета заняття: визначити мікробіологічні та хімічні методи та характеристики отримання амінокислот, розглянути всі переваги та недоліки мікробіологічного та хімічного методів та ознайомитись з використанням амінокислот в різних сферах промисловості.

Методичні вказівки: спосіб отримання амінокислот завдяки мікроорганізмам виник порівняно нещодавно – в 60-х роках минулого століття. Серед мікроорганізмів, які продукують вільні амінокислоти, були знайдені сотні видів і штамів. Відібрані та відселекціоновані продуценти глютамінової кислоти, лізину, ізолейцину, валіну і багатьох інших амінокислот.

Найбільш перспективний і економічно вигідний спосіб одержання амінокислот – це мікробіологічний синтез. Обсяги виробництва амінокислот у світі перевищують декілька мільйонів тон на рік, при цьому шляхом мікробіологічного синтезу отримують більше 70%. Головна перевага даного способу полягає в можливості отримання амінокислот на основі поновлюваної сировини.

Для культивування штамів мікроорганізмів при виробництві амінокислот як джерела вуглецю використовують найбільш доступні вуглеводи – глюкозу, сахарозу, рідше – фруктозу і мальтозу. Для зниження вартості поживного середовища в якості джерел вуглецю використовують і вторинну сировину – бурякову мелясу, молочну сироватку, гідролізати крохмалю, сульфідні луги. В якості джерел азоту використовують сечовину, солі амонію (сульфати і фосфати). Для успішного росту мікроорганізми потребують стимуляторів росту, в якості яких виступають кукурудзяні та дріжджові екстракти, солодові паростки, гідролізати висівків і дріжджів, вітаміни групи В. У поживне середовище додають деякі макро- та мікроелементи: Р, Са, Mg, Mn, Fe та ін. На процеси біосинтезу істотно впливає аерація. Мікробіологічний спосіб отримання амінокислот заснований на здатності мікроорганізмів синтезувати всі L-амінокислоти, а в певних умовах – забезпечувати їх «надсинтез».

У мікробіологічного синтезу є свої переваги і свої недоліки. З одного боку, в ньому мало стадій і використовується відносно універсальне обладнання. З іншого боку, мікроорганізми чутливі до найменшої зміни умов культивування і за звичайних умов концентрація цільового продукту не висока, тому необхідно постійно витримувати оптимальні технологічні параметри ферментації і збільшувати робочі об'єми реакторів. Значний інтерес до такого способу одержання амінокислот, зумовлений перш за все тим, що мікроорганізми утворюють амінокислоти в біологічно активній L-формі, високими техніко-економічними показниками в порівнянні з іншими способами, а також можливістю організації в межах одного підприємства виробництва як кормових препаратів, так і особливо чистих амінокислот, придатних до використання в харчовій і фармацевтичній промисловості.

Мікробіологічний синтез лізину, метіоніну, треоніна і ізолейцину

Білки зерна, пшениці, ячменю, кукурудзи і інших злакових культур не збалансовані за змістом незамінних амінокислот і, перш за все, лізину. Тому для задоволення потреб тваринництва в лізині в нашій країні і низці інших країн організовано його великомасштабне виробництво. У основу виробництва покладені технології з використанням одноступінчатого мікробіологічного синтезу, які включають промислове культивування мутантів ауксотрофів бактерій з роду *Corynebacterium*, здібних до надсинтезу цієї амінокислоти. Зазвичай в диких штамів, з яких отримані мутанти ауксотрофів, надсинтезу лізину не спостерігається, оскільки у них діють механізми саморегуляції. У клітках бактерій амінокислота лізин синтезується з аспарагінової кислоти через ряд проміжних етапів, пов'язаних з утворенням напівальдегіду аспарагінової кислоти, дигідропіколиної кислоти, що є безпосереднім попередником лізину.

Напівальдегід аспарагінової кислоти є також одним з попередників в синтезі амінокислот – треоніну, метіоніну і ізолейцину (рис. 7). Процес синтезу амінокислот (лізину, треоніну, метіоніну і ізолейцину) починається фосфорилюванням аспарагінової кислоти за участю аллостеричного ферменту аспартаткінази, активність якого інгибується спільною дією двох амінокислот – лізину і треоніну, якщо вони накопичуються в клітках бактерій в надлишковій концентрації. Якщо знизити концентрацію однієї з цих

амінокислот, то синтез інший здійснюватиметься навіть за умови, коли вона накопичується в досить високій концентрації.

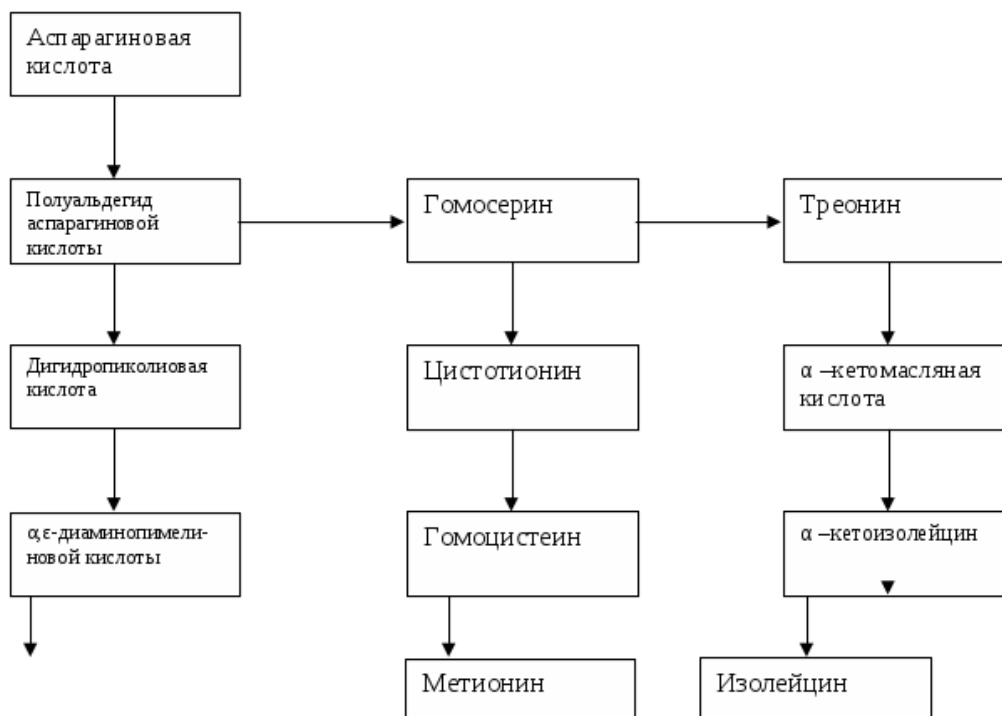


Рис. 7. Процес синтезу амінокислот з напівальдегіду аспарагінової кислоти

В процесі культивування мікроорганізмів забезпечується подача стерильного повітря за допомогою спеціальних турбінних мішалок, для запобігання спінюванню субстрата і клітинної суспензії в середу культивування додають піногасник. Посівний матеріал, призначений для виробничої ферментації, спочатку вирощують в посівних апаратах при 28 – 32С, рН 7 – 7,2 протягом 18 – 24 ч, а потім отримана таким дорогою суспензія кліток подається у виробничих ферментери ємкістю 50 – 100 м³, в яких підтримується постійний режим аерації, необхідний тиск, контроль за всіма компонентами і параметрами середовища. Час ферментації 55 – 72 ч. Накопичення в культуральній рідині лізину починається після 25 – 30 ч вирощування промислової культури і до кінця ферментації досягає 40 – 50 г/л. Культуральну рідину відділяють від культури кліток продуцента фільтруванням і використовують для здобуття препаратів лізину. На основі промислової культури бактерій, що синтезують лізин, організовано виробництво декількох видів товарної продукції: рідкий концентрат лізину (ЖКЛ), сухий кормовий концентрат лізину (ККЛ), висококонцентровані кормові і високоочищені кристалічні препарати

для харчової і медичної промисловості. Рідкий концентрат лізину отримують дорогою упарюванням культуральної рідини на вакуумній установці до концентрації сухої речовини 40%. Для запобігання деградації лізину в процесі нагрівання в культуральну рідину додають бісульфіт натрію і соляну кислоту до рН 4,5 – 5,0, внаслідок чого утворюється сіль – монохлоргідрат лізину. Для здобуття сухого концентрату лізину сушать гарячим повітрям на распильтельної сушарці при 90°C до вологості препарату 4 – 8 %. В цілях зниження гігроскопічності препарату в нього додають наповнювачів: мясокостну муку, негашене вапно, бентонит, пшеничні висівки. Найчастіше як наповнювач використовують висівки, які додають в ЖКЛ після упарювання. Отриману в результаті ретельного перемішування пасту висушують на вальцово-ленточної сушарці і гранулюють.

Дріжджі вирощуються в лужному середовищі на оптимізованій для синтезу ферменту живильному середовищу, що містить активатори, – Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} . Для ферментативної реакції перетворення капролактаму в лізин може використовуватися клітинна суспензія дріжджових кліток з активним ферментом, клітинний екстракт (після руйнування і відділення кліток) або очищений фермент.

Окрім викладеної вище технології здобуття чистих препаратів лізину розробляються та інші, що поєднують в собі використання хімічного синтезу для здобуття попередників лізину і ензиматичне перетворення їх в лізин на кінцевій стадії виробництва, що дозволяє значно інтенсифікувати виробничий процес і понизити собівартість продукції.

Хіміко-мікробіологічний метод отримання амінокислот – це хімічний синтез речовини-попередника з подальшою біотрансформацією ферментними системами відповідних штамів мікроорганізмів. Метод перспективний для отримання амінокислот, біосинтез яких з традиційних вуглецевих субстратів ускладнений або взагалі неможливий. Основна відмінність мікробіологічної ферментації від хіміко-мікробіологічного методу полягає у використанні не окремих виділених, а всіх ферментів мікроорганізмів.

Переважно хімічним шляхом в промисловості виробляється гліцин, DLметіонін, L-фенілаланін, L-валін, L-треонін, L-триптофан. Перспективним методом отримання L-амінокислот є розділення

рацематів амінокислот шляхом асиметричного гідролізу їх похідних з використанням мікроорганізмів, які мають специфічну L-ацилазну, L-амідазну, L-естеразну активність.

Хімічний склад кормового препарату лізину складний і містить дуже велику кількість різних сполук.

На основі готової культуральної рідини можна отримати кристалічні препарати лізину.

Очищений лізин використовується для харчових, медичних та інших цілей. Він складається з 95-97% монохлоргідрату лізину і 2-4% золи. Втрати лізину в процесі виділення кристалічного препарату складають приблизно 30%.

Завершується процес виробництва лізину будь якого ступеня чистоти фасуванням, упаковкою і складуванням готового продукту. Фасують препарати в поліетиленові мішки, які герметизують і додатково упаковують в крафт-мішки або в разі кристалічного препарату в картонні коробки.

Питання для самоконтролю:

1. Які вуглеводи використовують, як джерело вуглецю для культивування штамів мікроорганізмів?
2. Вказати переваги та недоліки мікробіологічного синтезу амінокислот.
3. Надати характеристику мікробіологічного синтезу амінокислот.
4. Описати процес вирощування дріжджів, які використовують для синтезу лізину.
5. Охарактеризувати процес хіміко-мікробіологічного синтезу амінокислот.
6. Які амінокислоти виробляють переважно хімічним шляхом в промислових масштабах?
7. В яких сферах промисловості використовується очищений лізин?

Лабораторна робота № 8

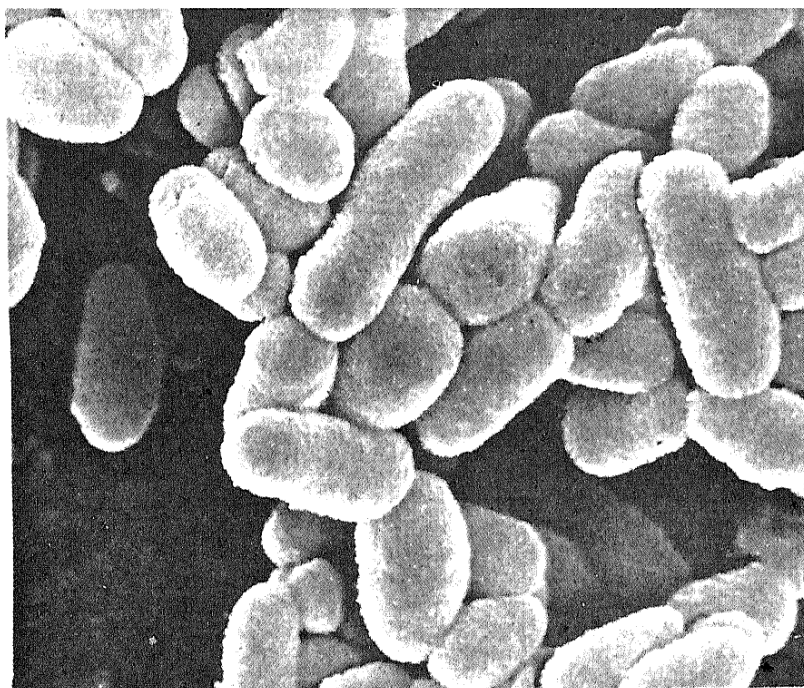
Тема: Відокремлення біомаси продуцента від рідкої фази, її концентрація і сушіння

Мета заняття: ознайомитись з процесами відокремлення, концентрації, очищення та сушіння отриманої біомаси в процесі мікробіологічного отримання амінокислот.

Методичні вказівки: Мікробіологічний метод синтезу амінокислот заснований на здатності багатьох мікроорганізмів накопичувати в середовищі значні кількості таких продуктів. Серед мікроорганізмів, які отримали оцінку як потенційні продуценти глутамінової кислоти, виявлено багато бактерій, ряд дріжджів та інших грибів. Більшість обстежених штамів мікроорганізмів незалежно від їх систематичного положення переважно нагромаджують α -аланін і глутамінову кислоту. Значно менше штамів і в меншій кількості виділяють аспарагінову кислоту, лейцин, валін, ізолейцин, лізин. Суворої кореляції між видовою приналежністю мікроорганізмів і можливістю їх накопичувати амінокислоти немає.

Найбільш поширені продуценти амінокислот – грам-позитивні безспорові бактерії, відносяться до таких родів: *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium* (рис. 8) і деяким іншим, але точне таксономічне становище більшості з них визначити важко, тому що в публікаціях інформація міститься явно недостатня для цього.

Одним з найбільш важливих наукових положень мікробіологічного синтезу амінокислот вважається питання про їх походження: ті, що знаходяться в середовищі амінокислоти – продукти ферментативного розпаду білків в результаті автолітичного процесу або вони результат синтезу інших сполук? При використанні синтетичних середовищ для культивування продуцентів досить виразно показано, що амінокислоти, що знаходять в середовищі, являють собою продукти синтезу *de novo*.



*Рис. 8. Продукент лізину Brevibacterium*sp.22 (x22000)

Ферментативні реакції синтезу амінокислот протікають всередині клітин. Спочатку амінокислоти накопичуються всередині клітин у вигляді так званих вільних амінокислот. На ранніх етапах росту культури вільні амінокислоти включаються в конструктивний обмін мікроорганізму. Активне накопичення амінокислот у середовищі в періодичній культурі відбувається зазвичай з середини експоненційної фази її росту, досягаючи максимуму до кінця.

Виділення та очистка цільового продукту є головне завдання завершального етапу біотехнологічного виробництва.

Цей процес ускладнюється тим, що у 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 (сушіння, 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.

Отже 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 – збільшення вмісту продукту у об'ємі за рахунок зменшення вмісту води залежить від цільового продукту.

Використовують способи:

- упарювання і сушіння (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 продукту:

- Екстракція – за допомогою органічних розчинників;
- Сорбція (адсорбція, абсорбція, хемосорбція, десорбція);
- Хроматографічний метод (газова і рідинна хроматографія; за формою колонкова, тонкошарова і паперова хроматографія; гельфільтрація, іонообмінна хроматографія;

афінна хроматографія – дуже дорога - («хроматография по сродству» - 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).

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 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 тваринам, харчові продукти, медицина або подальша переробка);
- рентабельність.

Питання для самоконтролю:

1. Вкажіть найбільш поширені продуценти амінокислот.
2. До якого етапу біотехнологічного виробництва біомаси відносять виділення та очистку?
3. Які існують типи концентрування та виділення біомаси?
4. Дати визначення цільовому продукту?
5. Вказати способи концентрування біомаси.
6. Вказати та охарактеризувати методи виділення біомаси.
7. Дати визначення афінної хроматографії.
8. Як стадії включає концентрування та очистка біомаси?
9. Охарактеризувати різновиди очистки цільового продукту.

МОДУЛЬ 2

ВИРОБНИЦТВО ЛІПІДІВ ТА ПОЛІЦУКРІВ

Лабораторна робота № 9

Тема: Характеристика мікроорганізмів – продуцентів ліпідів і поліцукрів

Мета заняття: визначити характеристику мікробних ліпідів, жирних кислот і поліцукрів. Склад та вміст ліпідів у мікроорганізмів. Продуценти ліпідів, жирних кислот і поліцукрів. Біосинтез ліпідів.

Методичні вказівки: Для промислового використання важливе значення має здатність посилено накопичувати ліпіди. Цією здатністю володіють небагато мікроорганізмів, насамперед – дріжджі. Процес утворення ліпідів у більшості дріжджів складається з двох чітко розмежованих стадій:

- перша характеризується швидким утворенням білка в умовах посиленого постачання культури азотом і супроводжується повільним накопиченням ліпідів (в основному гліцерофосфатів і нейтральних жирів);

- друга – припиненням зростання дріжджів і посиленням накопиченням ліпідів (в основному нейтральних).

Типовими ліпідуютворювачами є дріжджі *Cryptococcus terricolus*. Вони можуть синтезувати велику кількість ліпідів (до 60% від сухої маси) в будь-яких умовах, навіть найбільш сприятливих для синтезу білка.

З інших ліпідуютворювачих дріжджів промисловий інтерес представляють дріжджі *C. guilliermondii*, що утилізують алкани. Вони синтезують в основному фосфоліпіди. Накопичують великі кількості ліпідів і активно розвиваються на вуглеводних субстратах (на мелясі, гідролізатах торфу і деревини) також дріжджі видів *Lipomyces lipoferus* і *Rhodotorula gracilis*. У цих видів дріжджів ліпогенез сильно залежить від умов культивування. Ці продуценти накопичують значні кількості (до 70%) триацилгліцеридів.

Умови отримання ліпідів. Основну роль в процесі біосинтезу ліпідів грають різні штами дріжджів. Вони використовують ті ж джерела сировини, що і для отримання кормового білка, причому від

цінності вуглецевого живлення залежать вихід біомаси, кількість і склад ліпідів, що синтезуються. Для забезпечення направленого біосинтезу ліпідів в живильному середовищі уживаються джерела азоту, що легко асимілюються.

Умови культивування ліпідів. На фракційний склад ліпідів, що синтезуються, надають інші умови культивування: аерація, рН і температура. Від інтенсивності аерації залежить синтез фосфогліцеридів, жирних кислот і триацилгліцеридів. При недостатній аерації ліпіди містять в 4 рази менше триацилгліцеридів, в 2 рази більше фосфогліцеридів і в 8 разів більше жирних кислот, ніж при нормальній. При інтенсифікації аерації зростає ступінь ненасиченості ліпідів і збільшується відносна кількість всіх груп ненасичених кислот. Підвищення рН середовища веде до збільшення вмісту фосфогліцеридів і жирних кислот при одночасному зниженні кількості триацилгліцеридів. Оптимальні температури зростання і ліпідоутворення для клітин збігаються, причому вміст ліпідів не залежить від температури культивування. Проте, регулюючи температуру, можна створювати різні співвідношення насичених і ненасичених жирних кислот у складі фосфоліпідних мембран.

Для вуглеводних субстратів найбільш відпрацьована технологія отримання ліпідів на гідролізатах торфу і деревини. Як показали дослідження, співвідношення гідролізатів торфу і деревини 1:4 забезпечує найбільший вихід біомаси у стадії культивування (до 10 г/л) при максимальному вмісті ліпідів (до 51% від АСВ) і високому коефіцієнті засвоєння субстрату (до 0,54). Із 1 тонни абсолютно сухого торфу після його гідролізу і ферментації можна отримати 50-70 кг мікробного жиру з переважним вмістом триацилгліцеридів.

Продуценти ліпідів

З різних представників мікроорганізмів дріжджі мають ряд властивостей (швидкість росту, невимогливість до складу середовища), які дозволяють розглядати їх як найбільш перспективні на найближчий час джерела промислового отримання ліпідів.

В якості продуцента для промислового отримання ліпідів можуть використовуватися представники, по ряду ознак що відносяться до групи «жирових дріжджів». Жировими чи ліпідними, дріжджами називають види, що здатні в нормальних умовах росту синтезувати до 40% ліпідів і більше (по відношенню до сухих речовин клітини).

У типового представника ліпідних жирів – *Cryptococcus terricolus* обміні процеси направлені на переважний синтез ліпідів. Для більшості других дріжджів такий тип обміну не зовсім звичайний.

До ліпоутворюючих дріжджів відносять також деяких представників родів *Lipomyces*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* і *Trichosporon* (*L. Starkeyi*, *L. Lipoferus*, *R. Gracilis*, *S. Roseus*, *T. pullulans*). Всі ці дріжджі здатні продукувати значні кількості ліпідів. Однак у відмінності від *Cryptococcus terricolus* ліпідотворення їх істотно залежить від умов культивування і в першу чергу від співвідношення з'єднань вуглеводу і азоту в середовищі. Спільним для перерахованих мікроорганізмів є строго аеробний метаболізм і неможливість до росту в результаті бродіння.

Середовища окремих фракцій дріжджових ліпідів найбільшу масу займають триагліцерини (табл. 6).

Таблиця 6

Склад дріжджових ліпідів (%)

Фракція	<i>L. Starkeyi</i>	<i>L. Lipoferus</i>	<i>S. Roseus</i>	<i>Cryptococcus terricolus</i>
Фосфоліпіди	2,2	4,3	3,3	4,3
Стерини	2,5	5,3	3,7	1,1
Моно- і диацилгліцерини	4,6	5,7	4,8	3,1
Вільні жирні кислоти	16,4	2,6	10,1	3,9
Триагліцерини	71,4	78,1	72,2	86,3
Стеринові ефіри і воски	1,2	1,7	2,1	1,0

Наявність в дріжджових ліпідах значної кількості ненасичених жирних кислот надає їм схожість з рослинними маслами (табл. 7).

Таблиця 7

Вміст основних жирних кислот (%)

Джерело отримання ліпідів	Насиченні кислоти				Ненасичені кислоти			
	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{16:1}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
Соева олія	-	0,5	11,0	5,0	-	22,0	53,0	8,8
Соняшникова олія	-	0,5	6,5	3,5	-	23,0	65,0	0,5
Олія пальмового ядра	53,0	16,1	9,0	3,0	-	18,0	1,0	-
Пальмова олія	-	1,0	45,0	5,0	1,0	40,0	10,0	-
Лляна олія	-	-	7,0	14,0	-	18,0	14,0	47,0
Оливкова олія	-	-	11,5	2,8	0,8	75,0	8,5	0,8
Кокосова олія	58,6	14,7	5,8	1,7	-	9,7	1,2	-
Тваринний жир	1,0	2,0	27,0	13,0	4,0	43,0	7,0	1,0
<i>Rhodotorula gracilis</i>	-	1,1	29,8	8,8	1,8	40,1	11,2	4,8
<i>L. Starkeyi</i>	-	0,4	23,1	7,0	9,0	38,5	18,8	9,5
<i>Lipomyces lipoferus</i>	-	0,1	25,6	5,9	1,3	54,5	5,7	0,7
<i>S. Roseus</i>	0,2	1,9	44,3	3,8	1,4	37,6	6,4	3,6
<i>Cryptococcus terricolus</i>	-	-	23,4	2,2	3,9	58,9	12,6	-
<i>Saccharomyces fragilis</i>	-	2,5	19,2	3,4	11,9	27,0	25,0	9,6

Крім того, виявлені фракції фосфоліпідів, стеринів та їх ефірів, вільних жирних кислот, вуглеводнів і восків. Фракційний склад ліпідів дріжджів різних таксономічних груп ідентичні, відмінності полягають лише в кількісному співвідношенні фракцій. Аналогічний фракційний склад має ліпиди міцеліальних грибів і водоростей.

Полісахариди — це вуглеводи, які складаються з моносахаридів або близьких до них речовин. Основна маса вуглеводів, що зустрічаються в природі, існує у вигляді полісахаридів. Функціонально полісахариди поділяються на дві групи: перша виконує головним чином опорну, структурну функцію (целюлоза), друга є основним поживним матеріалом (глікоген, крохмаль). Деякі полісахариди виконують специфічні функції в організмі людини. Наприклад, полісахарид гепарин є природним антикоагулянт, а полісахарид гіалуронова кислота має бар'єрну функцію. Клітковина (целюлоза) є найбільш поширеним структурним полісахаридом. Вона утворює оболонку рослинних клітин.

Функціональні властивості. Структурні полісахариди надають стінкам клітин міцність, водорозчинні полісахариди запобігають процесу висихання клітин, а резервні полісахариди за необхідності розщеплюються на моносахариди і використовуються організмом.

Виділення полісахаридів. Методи виділення полісахаридів залежать від їх властивостей, насамперед розчинності. Розчинність полісахаридів у воді різна, тому розчинні полісахариди можна вилучати екстракцією водою або кислими чи лужними розчинами. Якщо ж полісахариди практично нерозчинні у воді, значно легше вилучити супутні речовини. Таким чином відбувається процес при виділенні целюлози і хітину, які характеризуються високою хімічною стійкістю.

Питання для самоконтролю:

1. З яких стадій складається утворення ліпідів?
2. Назвіть типові ліпидоутворювачі.
3. Охарактеризуйте умови отримання ліпідів.
4. Вкажіть умови культивування ліпідів.
5. Дати визначення полісахаридів.
6. Які функціональні властивості полісахаридів?
7. Методи виділення полісахаридів.

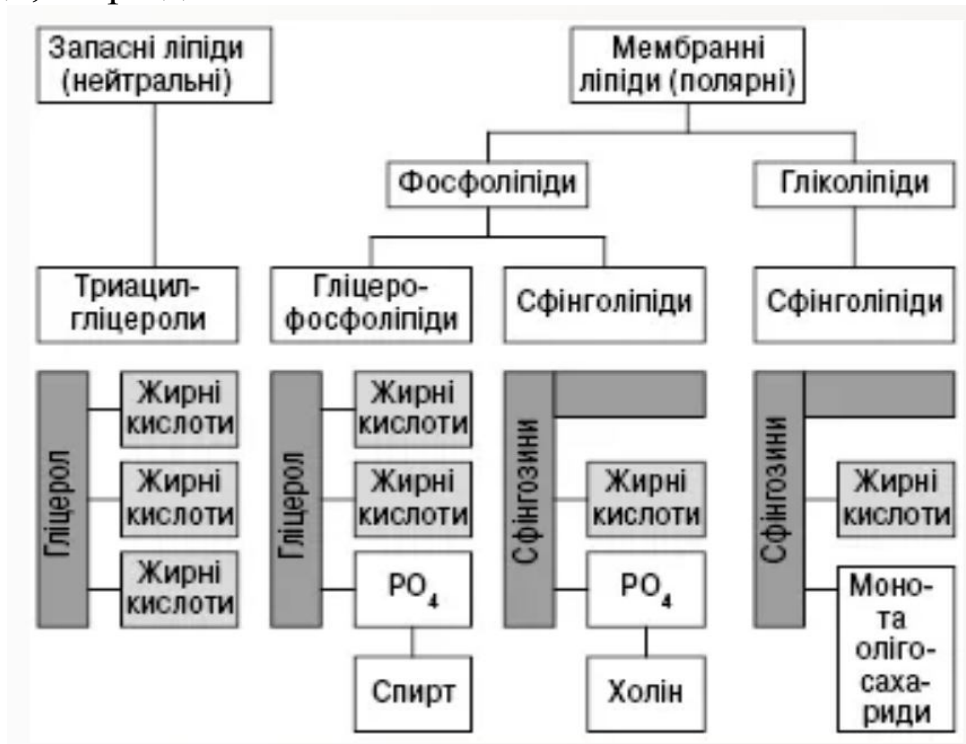
Лабораторна робота № 10

Тема: Біосинтез ліпідів мікроорганізмами

Мета заняття: ознайомитись з загальною характеристикою ліпідів та визначити біосинтез мікроорганізмів, з'ясувати основні шляхи внутрішньоклітинного метаболізму ліпідів

Методичні вказівки:

Ліпіди — це група органічних речовин, що входять до складу живих організмів і характеризуються нерозчинністю у воді та розчинністю в неполярних розчинниках, таких як діетилетер, хлороформ та бензен. Це визначення об'єднує велику кількість сполук різних за хімічною природою, зокрема таких як жирні кислоти, воски, фосфоліпіди, стероїди та багато інших.



Після перетворення в травному каналі та всмоктування ентероцитами кишечника ліпіди та продукти їх гідролізу транспортуються кров'ю до різних органів і тканин, де депонуються, утворюючи жирові резерви, які використовуються відповідно до фізіологічних потреб організму.

Внутрішньоклітинний метаболізм ліпідів — сукупність біохімічних ферментативних реакцій катаболізму й анаболізму різних класів ліпідів, що надходять в організм людини як компоненти

харчових продуктів та синтезуються в ньому, виконуючи важливі енергетичні функції, виступаючи структурними компонентами клітин і біологічно активними сполуками.

Основні шляхи внутрішньоклітинного метаболізму ліпідів:

- гідроліз нейтральних жирів до жирних кислот та гліцеролу (ліполіз);
- окислення та біосинтез жирних кислот;
- біосинтез триацилгліцеролів та складних ліпідів;
- біосинтез холестерину та його перетворення в біологічно активні стероїди.

Найбільшу енергетичну роль в організмі тварин відіграють нейтральні жири — триацилгліцероли (тригліцериди) — складні ефіри гліцеролу та вищих карбонових (жирних) кислот, що є, разом з вуглеводами, головними джерелами АТФ, необхідної для всіх ендергонічних функцій клітин та цілісного організму. Різні класи складних ліпідів та похідні стеринів виконують численні структурні та регуляторні функції.

Склад і вміст ліпідів у мікроорганізмах. Більшість експериментів по впливу джерел вуглецю на синтез ліпідів у дріжджів і міцеліальних грибів показали, що вони мають вплив не стільки на кількість, скільки на склад утворених ліпідів. Пристосовуючись до нових умов живлення, мікроорганізм в кінцевому рахунку може синтезувати приблизно такі ж кількості ліпідів, як і на специфічних для них середовищах. Що ж стосується складу жирних кислот, то вони багато в чому визначаються характером тих проміжних продуктів, які з'являються в процесі перетворення різних джерел вуглецевого живлення.

Особливий вплив на склад жирних кислот в синтезованих ліпідах надають сполуки, які самі входять до їх складу .

Так при використанні мікроорганізмів як джерело вуглецю вищих жирний кислот останні у великій кількості включаються до складу ліпідів. При використанні вуглеводів основні жирні кислоти клітин або мають довжину ланцюга алкана який використовується, або з'являються в результаті зміни довжини вуглецевого ланцюга молекули вихідного алкана на парне число вуглецевих атомів (табл. 8).

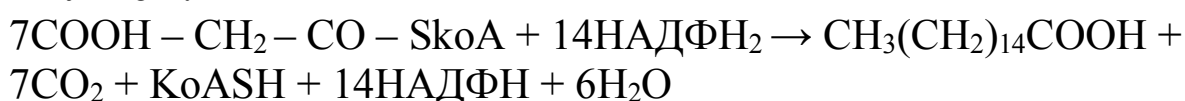
На відмінну від сполук вуглеводу сполуки азоту не здійснюють прямого впливу на біосинтез ліпідів. Їх вплив пов'язано із зсувом рівноваги поживного середовища в бік оптимуму значення рН , характерного для ліпідоутворення.

Склад жирних кислот у *Cryptococcus terricolus*, вирощеного на середовищах з різним зв'язуваннями вуглецю (% від загальної кількості)

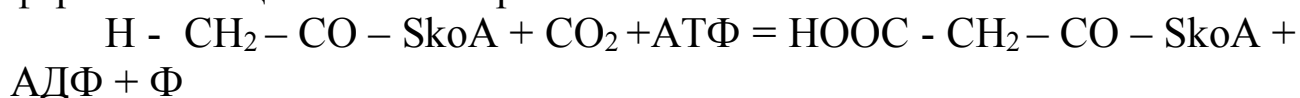
Сполуки вуглецю	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{16:1}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
Глюкоза	-	0,3	19,2	1,9	2,4	58,3	16,9	0,8
Гліцерин	-	-	19,4	2,0	2,1	50,0	20,1	0,8
C _{12:0}	22,0	0,4	14,1	2,8	3,5	40,1	10,8	1,9
C _{14:0}	0,3	30,6	13,1	1,4	1,2	37,5	14,0	1,1
C _{16:0}	-	5,0	40,5	1,7	4,2	37,9	10,5	1,2
C _{18:0}	-	-	8,3	46,7	1,0	27,3	12,9	1,3
C _{18:1}	-	0,3	20,1	4,8	3,6	58,4	10,3	1,3
C _{18:2}	-	0,2	16,1	3,2	2,8	12,1	62,7	2,9
C _{18:3}	-	0,7	4,6	1,1	2,2	9,6	8,3	70,8

В останні роки досягнуті значні успіхи у з'ясуванні механізму біосинтезу ліпідів у мікроорганізмах. Тим не менш деякі деталі цього процесу залишаються нез'ясованими, особливо у відношенні синтезу складних ліпідів.

Перша стадія в біосинтезі ліпідів, які вміщують жирні кислоти, - утворення ефірів жирних кислот і коферменту А. Увесь гомологічний ряд жирних кислот з довгим ланцюгом, які складаються з парних чисел вуглецевих атомів, утворюється в процесі реакцій, що називаються малоніл-КоА. В цих реакціях до початкової молекули ацетил-КоА послідовно приєднується C₂. Наприклад реакція синтезу пальмітіл-КоА:



При першій реакції утворюється малоніл-КоА (шляхом синтезу декілька). Один із шляху – реакція, каталізується біотинвмісним ферментом ацетил-КоА-карбоксилазой:



У дріжджів система синтезу жирних кислот являє собою гомогенний багато ферментний комплекс з молекулярною масою біля 2-3 млн (так звана синтеза жирних кислот).

Додаткові подвійні зв'язки можуть бути введені в ефір КоА і мононенасиченої кислоти в подібній реакції, яка може бути каналізована тим же ферментом.

У багатьох бактерій звичайний шлях утворення ненасичених жирних кислот – анаеробний, при якому відбувається послідовне подовження вже ненасичених попередників. Кислоти що мають циклопропанові кільця, синтезуються шляхом утворення метиленового містка за місцем подвійного зв'язку в ненасичених кислотах, при цьому вуглець що приєднується взаємодіє з метильною групою метіоніні у формі S-аденозилметіоніна. Це приєднання має місце тільки при включенні у фосфоліпід попередника з одним подвійним зв'язком.

Вплив умов культивування на склад ліпідів. Численні експерименти по впливу джерел вуглецю на синтез ліпідів у дріжджів і міцеліальних грибів показали, що вони здійснюють вплив не стільки на кількість, стільки на склад утворюваних ліпідів. Пристосувавшись до нових умов живлення, мікроорганізм на кінцевому рахунку може синтезувати приблизно таку ж кількість ліпідів, як і на специфічних для нього середовищах. Що стосується складу жирних кислот, то вони багато в чому визначаються в процесі перетворення різних джерел вуглецевого живлення.

Особливий вплив на склад жирних кислот в синтезуючих ліпідах здійснюють сполуки, котрі самі входять в їх склад. Так при використанні мікроорганізмами в якості джерела вуглецю вищих жирних кислот останнє у великій кількості включається в склад ліпідів. При використанні вуглеводів основні жирні кислоти клітин або мають довжину ланцюжка алкану який споживається, або з'являються в результаті зміни довжини вуглеводного ланцюжка молекули початкового алкана на парне число вуглеводних атомів.

На відмінну від з'єднання сполук вуглецю сполук азоту не здійснює прямого впливу на біосинтез ліпідів. Їх вплив пов'язаний зі зсувом рівноваги поживного середовища в бік від оптимуму значення рН, характерного для ліпідоутворення. В той же час концентрація джерела азоту відіграє істотну роль в процесах ліпідоутворення. Пов'язано це зі співвідношенням азоту і вуглецю в середовищі. Чим це співвідношення вище в сторону вуглецю, тим більш сприятливі умови для біосинтезу ліпідів, і навпаки.

У великій мірі утворення ліпідів у дріжджів та інших грибів пов'язано з дихальною активністю клітини. Інгібування процесу дихання веде до гальмування біосинтезу ліпідів. При недостатньому надходженні кисню різко гальмуються процеси утворення тригліцеринів, але накопичується значна кількість вільних жирних

кислот і фосфоліпідів. З інтенсифікацією аерування середовища зростає ступінь не насиченості ліпідів шляхом часткової трансформації олеїнової кислоти в кислоти з двома і трьома зв'язками.

На процес біосинтезу ліпідів у мікроорганізмів здійснює вплив також рН і температура культивування. Так, підвищення рН середовища збільшує вміст в складі дріжджових ліпідів вільних жирних кислот, фосфоліпідів і зменшує вміст триагліцеринів. При зниженні рН збільшується загальна не насиченість ліпідів.

Зниження температури культивування веде до підвищення ступеня не насиченості кліткових ліпідів.

Крім джерел вуглецевого і азотного живлення, а також рН, аерації, температури на процеси росту мікроорганізмів і синтезу ними ліпідів певний вплив здійснюють різні компоненти мінерального живлення і деякі вітаміни.

Відсутність в середовищі пантотенової кислоти негативно впливає не тільки на синтез загальних ліпідів, але і на утворення деякими дріжджами ергостерину. Певний вплив на процеси ліпідоутворення у дріжджів та інших організмів можуть здійснювати також пара-амінобензойна кислота, інозит, піридоксин та ін.

З безазотистих мінеральних солей на ліпідоутворення найбільший вплив здійснюють фосфати. Недолік фосфору веде до неповного використання джерел вуглецю, надлишок міняє напрям обмінних процесів в бік синтезу в клітині сполук неліпідної природи.

Г. А. Надсон спостерігав сильне ожиріння дріжджових клітин, яке наступало після іонізуючого опромінення при триваючому рості у поживному середовищі. Дане явище пояснювалось ним як результат різких змін обміну речовин, головним чином вуглеводневого, що призводило до більш інтенсивного накопичення ліпідів, в першу чергу триагліцеринів і стеринів.

Питання для самоконтролю:

1. Дати визначення ліпідам.
2. Охарактеризувати основні шляхи внутрішньоклітинного метаболізму ліпідів.
3. Які речовини відіграють найбільшу енергетичну роль в організмі тварин?
4. Охарактеризувати склад і вміст ліпідів у мікроорганізмах.
5. Вкажіть вплив умов культивування на склад ліпідів.
6. Які фактори впливають на процес біосинтезу ліпідів?
7. До чого веде зниження температури культивування?

Лабораторна робота № 11

Тема: Апаратуро-технологічна схема отримання мікробних ліпідів

Мета заняття: ознайомитись з апаратурою – технологічною схемою отримання мікробних ліпідів

Методичні вказівки:

Можливість промислового отримання ліпідів. Питанням промислового отримання ліпідів за допомогою мікроорганізмів приділяється пильна увага як в нашій країні так і за кордоном. Мікроорганізми можна використовувати для отримання фосфоліпідів, гліколіпідів, незамінних жирних кислот і препаратів на їх основі, необхідних для використання в медичній практиці, сільському господарстві, харчовій і інших галузях промисловості.

Ряд дріжджів і міцеліальних грибів розглядається як потенційні продуценти ліпідів, в тому числі ліпідів – аналогів деяким типам рослинних масил. Світова практика поки не має виробництв і цільовим призначенням отримувати мікробні ліпіди. Однак, зміна кон'юктури на світовому ринку не виключає доцільності організації отримання ліпідів шляхом мікробіологічного синтезу. В теперішній час в невеликих об'ємах отримують ліпіди тільки за допомогою дріжджів, причому ліпіди є побічним продуктом основного виробництва (при отриманні білково-вітамінних концентратів на вуглеводнях нафти). Отримання ліпідів із міцеліальних грибів, а також бактерій, водоростей і найпростіших доки не вийшло за рамки лабораторних досліджень. Одною із причин повільного вирішення питань отримання бактеріальних ліпідів слідує визнати наявність в їх складі сполучень, токсичних для мікроорганізма.

За допомогою дріжджів можна отримати ліпіди на різних субстратах: гідролізатах рослинної сировини, сульфідних лугах, вуглеводнях нафти і ін. Ефективність виробництва дріжджового жиру пов'язана з кількістю основної сировини, необхідного для отримання визначеної одиниці маси дріжджів і його вартістю. Крім того, сировина, на основі якого готується живильний субстрат для вирощування дріжджів, повинно забезпечувати отримання ліпідів, що відповідають вимогам, що висуваються промисловістю, яка переробляє ліпіди в різні продукти.

Найбільш відпрацьовані технологічні схеми отримання ліпідів за допомогою дріжджів на гідролізатах верхового торфу малої степені розкладу і вуглеводнях нафти. Ці схеми відрізняються тим що, при отриманні ліпідів на гідролізатах торфу дріжджовий жир є основним продуктом, а при використанні вуглеводнів дріжджовий жир – побічний продукт, що з'являється в результаті очистки дріжджової біомаси від залишкових вуглеводнів. У зв'язку з цим фракційний склад отриманих цим шляхом ліпідів дуже різноманітний: домінуюча фракція вуглеводневих дріжджів – фосфоліпіди, основна фракція при отриманні ліпідів на гідролізатах торфу – триацилгліцерини.

Процес отримання ліпідів на гідролізатах верхового торфу малої степені розкладу включає декілька основних операцій: отримання гідролізата торфа, віддув фурфурола і нейтралізація гідролізата до рН 5,5-6,0, ведення в гідролізат мінеральних джерел живлення, вирощування дріжджів – продуцентів ліпідів, відділення біомаси і екстракція із неї ліпідів. Отже, увесь процес аналогічний процесу отримання кормових дріжджів, за виключенням додаткових операцій, пов'язаних з вилученням ліпідів. Система розчинників, що використовують для цієї мети, ідентична що використовують у масложировій промисловості. Біомаса (біоштор), що залишилася після екстракції ліпідів може використовуватися в годівлі сільськогосподарських тварин.

Продуцентами ліпідів на гідролізатах торфу є виділені в інституті мікробіології АН БССР штами *Lipomyces lipoferus*, біомаса яких вміщує до 40% ліпідів і більше. Із 1 тонни сухого торфу можна отримати 50-70кг дріжджових ліпідів, що вміщують до 70-75% триацилгліцеринів.

Крім гідролізатів торфу для культивування ліпидоутворюючих дріжджів й отримання ліпідів можуть бути використані інші гідролізні середовища, наприклад, гідролізати деревини або змішані субстрати деревини і торфу.

Технологічний процес отримання ліпідів. Найбільш економічною є технологія комплексної мікробіологічної переробки нафтових дистилатів (дизельного палива з температурою кипіння 240-360°C), що дозволяє отримати при культивуванні дріжджів роду *Candida* (*C. guilliermondii*, *C. silvicola* і ін.) три продукти: знежирену білок вмісну біомасу дріжджів (кормову добавку), технічний мікробний жир і дизельне паливо арктичних сортів з низькою

температурою застигання. Нафтові дистиляти на відміну від очищених n-парафінів мають більш низьку вартість, містять 15-40% n-парафінів, селективно асимільованих дріжджами. Концентрація дистилятів у ферментаційному середовищі - 10-30%.

Після мікробіологічної депарафінізації дизельне паливо відокремлюють від водної фази декантацією, дріжджову біомасу, зосереджену в органічній фазі, концентрують двоступеневою сепарацією з промиванням гарячою водою в присутності ПАР, упарюють під розріджуванням, концентрат сушать в розпилювальній сушарці. Мікробний жир витягують з дріжджової маси екстракцією бензиновою фракцією вуглеводнів «Нефрас А 75/65» (температура початку і кінця перегонки 65-75°C).

Дріжджовий порошок відрізняється високим дифузійним опором: для повного вилучення мікробного жиру необхідна тривалість контакту з розчинником становить понад 70 год. Для різкого зниження дифузійного опору здійснюють спеціальну підготовку дріжджового порошку. За технологією англійської фірми «Rous Dauns» дріжджовий порошок кондиціонують по температурі і вологості (підігрів водяною парою при перемішуванні з підвищенням температури до 100°C і вологості до 16-18%), масу гранулюють (діаметр гранул 3-4 мм, довжина 9-10 мм), гранули розплющують між обертовими вальцями впелюстку товщиною 0,1-0,2 мм. Дріжджовий пелюсток підсушують в конвеєрній сушарці до вологості 6-8% (волога заважає проникненню розчинника при екстракції ліпідів) і просівають на ситі з розміром отворів 2 мм. Некондиційну пелюстку повертають на стадію кондиціонування дріжджового порошку. В результаті потужного термомеханічного впливу на дріжджовий порошок поліпшується мікроструктура частинок, зростає поверхня масопередачі і тривалість екстракції сформованого пелюстки зменшується до 4 год (рис. 9).

Екстракцію ліпідів здійснюють в роторному екстракторі коміркового типу в режимі проти течії при температурі розчинника 50-55°C і двократному витраті його по відношенню до дріжджової маси.

Екстрактор має герметичний циліндричний корпус діаметром 7 м і висотою 5,8 м, в якому повільно з регульованою швидкістю обертається навколо вертикальної осі ротор, розділений радіальними перегородками на 18 комірок. Зверху комірки відкриті. Днище кожної комірки закрито перфорованими дверцями, що утримує пелюстка і

вільно пропускає рідину. Нижня конічна частина корпусу екстрактора, що знаходиться під ротором, розділена вертикальними радіальними перегородками на 6 камер, п'ять з яких призначені для збору екстракту, а одна - для приймання про екстрагованого пелюстки, що видаляється зкомірки. На кришці корпусу екстрактора радіально розташовані п'ять розподільних гребінок (каскад штуцерів) для зрошення вмісту комірок ротора розчинником (одна гребінка) і екстрактом (чотири гребінки). Дріжджовий пелюстка подається в екстрактор шнеком, оснащеним пневматичним ковзаючим затвором, що закриває вихідний отвір при непрацюючому живильнику (виключає витік парів розчинника в підготовче відділення). При проході комірок ротора під живильником вони заповнюються пелюсткою. Завантажений в комірки матеріал безперервно рухається по колу, зазнаючи при цьому проти течійного зрошення екстрактом (місцели). На кінцевій стадії (ступені) екстракції дріжджі зрошуються чистим розчинником, який подається в екстрактор через п'яту гребінку (рис. 10).

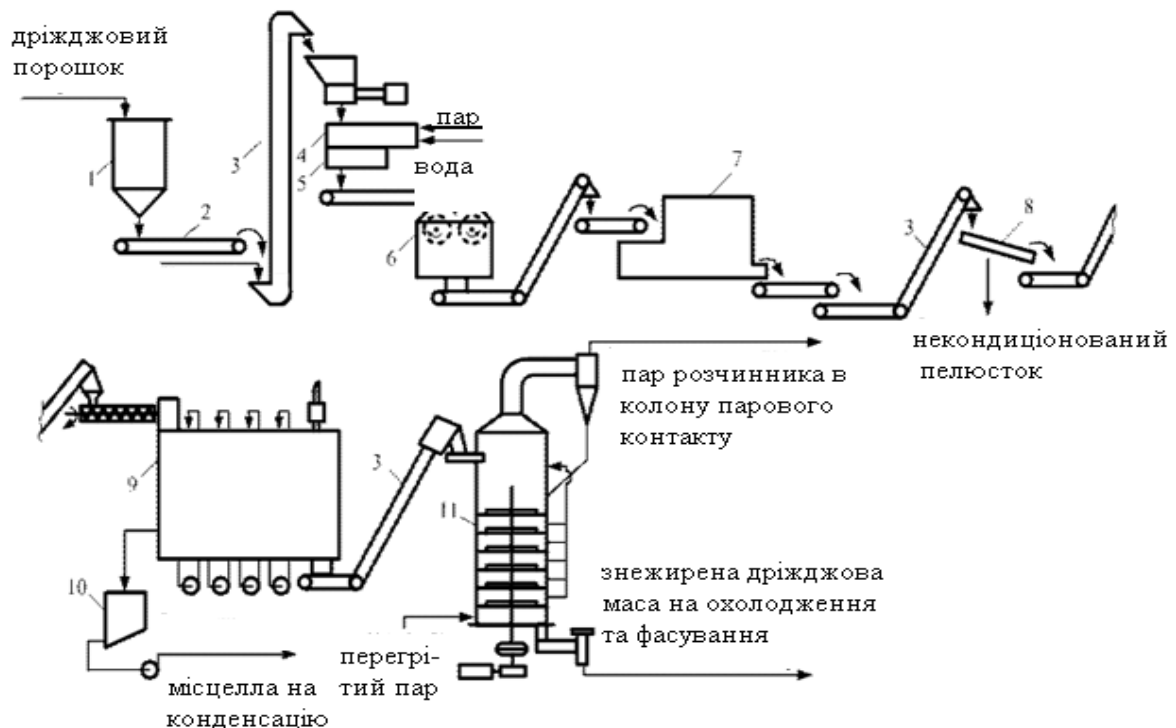


Рис. 10. Технологічна схема екстракційного вилучення ліпідів із дріжджового порошку

1 – бункер-накопичувач; 2 – конвеєр; 3 – норія; 4 – відділ кондиціонування дріжджового порошку; 5 – гранулятор; 6 – плушові вальці; 7 – конвеєрна сушарка; 8 – сито; 9 – екстрактор; 10 – збірник місцели; 11 – десольватор.

Проходячи зверху вниз через шар пелюстки в комірці, розчинник витягує ліпіди і залишкові вуглеводні і стікає в нижню частину корпусу екстрактора в камеру місцели четвертій сходинці, з якої циркуляційним насосом подається в гребінку штуцерів, розташованих над камерою місцели третього ступеня. Місцела проходить через пелюстка в комірках, зміцнюється (підвищується концентрація ліпідів), стікає в камеру третього ступеня в днище екстрактора і насосом подається в гребінку над камерою місцели другого ступеня.

Такий процес повторюється чотири рази (чотири циркуляційні насоси). При послідовному русі розчинника від наступного до попереднього ступеня концентрація місцели зростає. Концентрована місцела зрошує вихідний (завантажений) пелюстка і збирається в п'ятій камері днища апарату, з якої виводиться насосом. Проекстрагована пелюстка після контакту з чистим розчинником вивантажується через відкриті в днище дверцята в приймальну камеру днища апарату, з якої виводиться гвинтовим конвеєром.

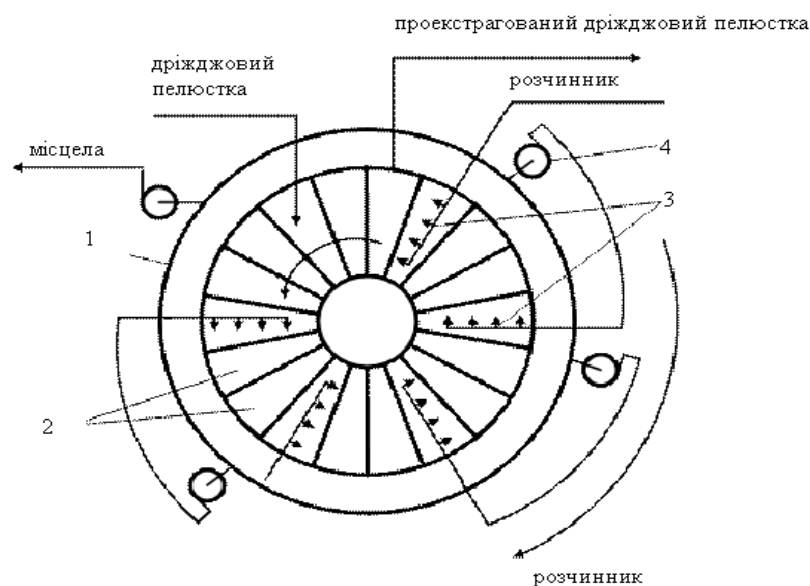


Рис. 11. Схема процесу протитечійної екстракції ліпідів з дріжджового пелюстка в роторному екстракторі.

1 – корпус екстрактора; 2 – комірки ротора; 3 – гребінки штуцерів; 4 – циркуляційний насос

Для підвищення швидкості масопередачі екстракцію проводять при температурі 50-55°C, яку підтримують подачею в екстрактор

підігрітого розчинника (екстрагента). Розчинник (нефрас) має високу летючість, горючий, суміші його парів з повітрям вибухонебезпечні. Щоб виключити проникнення парів розчинника з екстрактора в виробниче приміщення в апараті створюють розрідження (0,05-0,2 кПа) витяжним вентилятором.

Екстракт (місцела) містить близько 4% мікробного жиру і залишкових вуглеводнів, які витягуються розчинником з клітинної маси одночасно з ліпідами. Технічний мікробний жир отримують відгоном розчинника з місцели дистиляцією в дві (або три) ступені (рис. 3).

Підігріта до 60-65°C місцела надходить в дистилятор першого ступеня (випарник з висхідною плівкою), що працює при атмосферному тиску. У цьому апараті видаляється з місцели до 90% розчинника. Дистилятор другого ступеня працює під розрідженням (залишковий тиск 16-17 кПа) і являє собою тарілчасту колону (сітчасті тарілки), оснащену паровою сорочкою. Під нижню тарілку дистилятору подається гострий перегрітий пар. При проті течійній взаємодії перегрітої пари з концентратом місцели відбувається повне видалення залишків розчинника з мікробного жиру.

Перегріта пара проходить дистилятор не конденсуючись і надходить в теплообмінники-конденсатори. У першому теплообміннику конденсуються головним чином пари розчинника (при невеликій кількості води), конденсат направляється в розділову ємність, в якій декантацією відділяється розчинник від води. Конденсат з другого теплообмінника є водою з домішками

розчинника і направляється в колону для відгону розчинника, що обігрівается гострою парою.

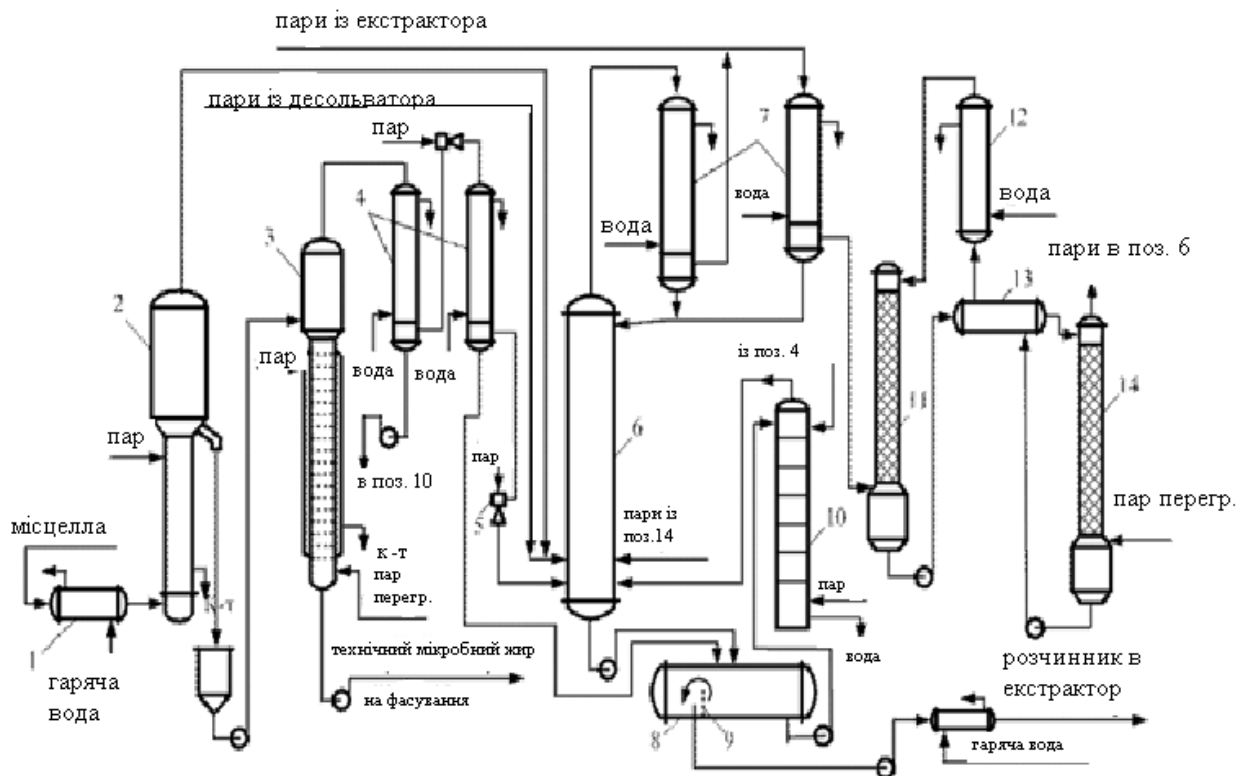


Рис. 12. Технологічна схема дистиляції місцели

1 – підігрівач місцелли; 2 – дистилятор I ступеня; 3 – дистилятор II ступеня; 4 – конденсатори дистилятора; 5 – паровий ежектор; 6 – колона парового контакту; 7 – конденсатори колонни парового контакту; 8 – розділова ємкість; 9 – переливна перегородка; 10 – колона для видалення розчинника з води; 11 – абсорбер; 12 – холодильник; 13 – підігрівач; 14 – десорбер

Розчинник який містить пари (з дистилятора першого ступеня, колони для відгону бензину, дистилятори другого ступеня, десорбера направляються в колону парового контакту, в якій конденсуються за рахунок зрошення конденсатом з теплообмінників – конденсаторів цієї колони. Колона парового контакту працює за принципом саморегулювання при будь-яких змінах обсягу надходять пари, а також температури охолоджуючої води, що є перевагою цього апарата.

Розділова ємність за рахунок вертикальної переливної перегородки забезпечує відділення легкої фази (розчинника) від

важкої (води). Розчинник повертається на екстракцію, вода прямує в колону для відгону залишків розчинника.

Технологія фірми «Rous Dauns» передбачає рекуперацію розчинника з пароповітряної суміші, що видаляється з екстрактора і колони парового контакту. Установка включає дві колони з насадкою з кілець Рашига – абсорбер і десорбер. У абсорбері розчинник вловлюється з пароповітряної суміші зрошенням в проти течійному режимі індустриальним маслом при низькій температурі (30°C). Насичене розчинником масло підігрівається і прямує в десорбер, в якому в проти течійному режимі контактує з перегрітою водяною парою, що видаляє легко летючий розчинник з масла при температурі 105-110°C. Пари з десорбера надходять в колону парового контакту. Гаряче регенероване масло охолоджують і повертають в абсорбер, забезпечуючи безперервну циркуляцію його в замкнутій системі.

Проекстраговані (знежирені) дріжджі містять залишки розчинника, який видаляють в спеціальному колонному апараті – десольвататорі, оснащеному 6-8 порожніми горизонтальними тарілками, що обігріваються паром, і вертикальним валом з перемішувачами гребінками для кожної тарілки. Дріжджова маса шнеком подається на верхню тарілку, нагрівається при перемішуванні і через люк пересипається на нижню тарілку. Процес повторюється 6-8 разів (люки розташовані в шаховому порядку). На кожній тарілці розчинник випаровується. Пари з верхньої частини апарату надходять в колону парового контакту. Під нижню тарілку десольвататора подають гострий перегрітий пар, регулюючи витрату якого, забезпечують повне видалення розчинника з дріжджової маси.

Технічний мікробний жир – в'язка масляниста рідина темно-коричневого кольору, містить близько 10% вуглеводнів і не більше 3% вологи. Зберігається в герметично закритих ємностях. Для покращання фізичних властивостей до висушеного продукту додають висівки або кукурудзяне борошно.

Питання для самоконтролю:

1. В чому полягає можливість промислового отримання ліпідів?
2. До якого значення рН відбувається нейтралізація гідролізату?
3. Охарактеризувати технологічний процес отримання ліпідів.
4. Як здійснюють екстракцію ліпідів?
5. Від чого залежить підвищення швидкості масо передачі?
6. Охарактеризувати поняття технічний мікробний жир.

Лабораторна робота № 12, 13, 14.

Тема: Культивування мікроорганізмів на вуглеводних середовищах та білково-жирових дріжджів на парафінах нафти

Мета заняття: ознайомитись з методами культивування та надати характеристику Культивування мікроорганізмів на вуглеводних середовищах та білково-жирових дріжджів на парафінах нафти

Методичні вказівки:

Поверхнєве та глибинне культивування. Культивування мікроорганізмів-продуцентів біологічноактивних речовин можна вести поверхневим і глибинним способами. Поверхневим способом можна виростити тільки аеробну культуру мікроорганізмів в основному на твердому сипучому поживному середовищі.

Глибинним методом вирощують мікроорганізми в рідкому поживному середовищі, цим методом можна виростити як аеробні, так й анаеробні мікроорганізми. Переважна більшість продуцентів ферментів - аероби, тому при глибинному культивуванні, як і при поверхневому, застосовують примусову аерацію зростаючої культури мікроорганізму.

Поверхнєве культивування мікроорганізмів. Процес культивування продуцента починається з моменту засівання охолодженого стерильного поживного середовища посівним матеріалом. Засівання середовища при періодичній стерилізації звичайно проводиться безпосередньо в стерилізаторі в охолоджене середовище при постійному перемішуванні. При безперервній стерилізації середовище засівають у відсіку стерилізатора, де воно охолоджується, а засіяне середовище передають у цех вирощування.

Поверхнєве культивування мікроорганізмів може проводитися різними способами. Традиційним є кюветний спосіб, що вимагає застосування ручної праці й величезних виробничих площ. Більш новим методом є вирощування продуцентів у механізованих установках.

Культивування мікроорганізмів є одним з основних методів мікробіології. Від уміння культивувати мікроорганізми в лабораторних умовах значною мірою залежать успіхи їх вивчення і

практичного застосування. Для культивування конкретного мікроорганізму необхідно знати про його фізіологічні та біохімічні особливості, та на підставі цих знань створювати умови, необхідні для його життєдіяльності.

Вирощування мікроорганізмів на поживному середовищі називають культивуванням (від лат. *cultus* – вирощування), а розвинуті в результаті мікроорганізми – культурою.

При розвитку в рідкому середовищі культури утворюють суспензію, осад або плівку, при розвитку на твердому середовищі – колонії.

Культура може бути чистою – містити потомство клітини тільки одного виду та накопичувальною – складатися переважно з клітин одного виду мікроорганізмів.

Внесення клітин мікроорганізмів або якого-небудь досліджуваного матеріалу (зразка ґрунту, проби води) до стерильного поживного середовища для отримання чистої або накопичувальної культури називають посівом.

Перенесення вже вирощених клітин з одного середовища на інше (стерильне) називають пересіванням, або пасивуванням (від лат. *passus* – чергування).

Зазвичай мікроорганізми вирощують при певній постійній температурі в термостатах або кімнатах термостатів. Культивування при певній температурі називається інкубацією (від лат. *incubatio* – вирощування, висиджування пташенят). Вирощують мікроорганізми в скляному посуді: пробірках, колбах або чашках Петрі.

У пробірках мікроорганізми культивують як в рідких, так і на твердих середовищах. Рідким середовищем для аеробних культур заповнюють зазвичай $1/3$ пробірки, для анаеробних – $2/3$. Якщо тверде середовище в пробірках призначене для подальшого вирощування мікроорганізмів, при підготовці до стерилізації його наливають на $1/3$ – $1/4$ об'єму пробірок. Після стерилізації пробірки з ще не застиглим середовищем розкладають на рівній поверхні столу з нахилом (під невеликим кутом) для отримання скошеної поверхні агару. Це так звані косяки – скошене середовище.

Тверде середовище, застигле при вертикальному положенні пробірки, називається стовпчиком. Стовпчики поживного середовища, що займає $1/3$ – $1/4$ об'єму пробірки, використовують для посіву культури уколом. Стовпчики поживного середовища, що займають $2/3$ об'єму пробірки, після стерилізації застосовують для

заливки стерильних чашок Петрі, призначених для мікробіологічних посівів.

При культивуванні мікроорганізмів в колбах використовують тільки рідке живильне середовище. Для аеробних мікроорганізмів середовище наливають тонким шаром (наприклад, 30 мл в колби Ерленмейєра на 100 мл), для анаеробних мікроорганізмів колбу заповнюють на 2/3 об'єму.

У чашках Петрі мікроорганізми культивують лише на твердому середовищі.

Для роботи з мікроорганізмами використовують спеціальні бактеріологічні голки, петлі і шпателі. При посівах і пересіваннях культур мікроорганізмів з колоній, що вирости на твердому середовищі або вросли в субстрат, застосовують голки або шпатель. Суспензії мікроорганізмів беруть петлею.

Питання для самоконтролю:

1. Надати загальну характеристику культивуванню.
2. Охарактеризувати поверхневий метод культивування.
3. Охарактеризувати глибинний метод культивування.
4. Від чого залежить успіхи вивчення практичного застосування культивування?
5. Дати визначення інкубації.
6. Як називається процес перенесення вже вирощених клітин з одного середовища на інше (стерильне)?
7. В яких середовищах культивують мікроорганізми у пробірках?
8. В яких середовищах культивують мікроорганізми у колбах?
9. Які матеріали використовують для роботи з мікроорганізмами?

МОДУЛЬ 3 ВИРОБНИЦТВО ФЕРМЕНТІВ ТА БАР

Лабораторна робота № 15

Тема: Дія ферментів та БАР як стимуляторів росту

Мета заняття: ознайомитись з дією ферментів та БАР як стимуляторів росту

Методичні вказівки: Ферменти навідміну від гормонів і біостимуляторів мають інший механізм впливу на організм тварин при цьому вони не накопичуються в організмі й продуктах тваринництва і не входять до складу кінцевих продуктів. У травному тракті тварин і птиці виробляються власні ферменти, за допомогою яких і відбувається перетравлення поживних речовин кормів. Дорослі тварини можуть перетравлювати до 60-70% поживних речовин корму хоча травні залози виробляють достатню кількість пепсину, трипсину, амілази, ліпази та інші та інші ферменти. Відомо, що молодняк тварин народжується із недорозвиненою системою травлення.

При формуванні складу кормових ферментних препаратів враховуються також вид і вік тварин та птиці. У цілому позитивний ефект більшості відомих кормових ферментних препаратів при введенні їх в комбікорми для тварин, птахів полягає в наступному:

1. Руйнування стінок рослинних клітин, завдяки цьому підвищується доступність наявності крохмалю, протеїну і жирів для дії ферментів травного тракту.
2. Підвищення перетравності поживних речовин та поліпшення їх всмоктування в тонкому відділі кишечника.
3. Компенсація дефіциту власних травних ферментів, особливо у молодняку, та в стресових ситуаціях.
4. Поліпшення мікрофлори в тонкому відділі кишечника за рахунок зниження в'язкості хімусу та підвищення рівня моносахаридів.

Перераховані функції кормових ферментних препаратів, супроводжуються зміною наступних виробничих показників у тваринництві:

1) Кормова цінність раціонів зростає на 5-10% за рахунок більш повного вилучення поживних речовин і вивільнення енергії при цьому їх засвоюваність підвищується на 6-10%.

2) Знижується витрата кормів на одиницю продукції на 5-14%.

3) Зростає продуктивність тварин на 5-12%.

4) З'являється можливість заміни таких дорогих компонентів кормів як кукурудза та соєвий шрот, більш дешевими (пшениця, ячмінь, овес, жито, соняшкові шроти та макуха) з підвищеним вмістом клітковини, без зниження продуктивності.

5) Зменшується кількість і вологість посліду і як наслідок вологість підстилки.

6) Поліпшується екологічна ситуація навколишнього середовища за рахунок повного засвоєння азоту та фосфору організмом тварин та зниження викиду цих речовин у навколишнє середовище на 20-40%.

Отже, правильний підбір і використання ферментних препаратів в кормовиробництві дає можливість знизити витрати на годівлю та підвищити продуктивність тварин, при тих же витратах на виробництво.

Ферментні препарати, що випускаються промисловістю, відрізняються від чистих ферментів тим, що вони містять не тільки активний білок, але й різні баластні домішки, а також ряд інших ферментів. Залежно від ступеня очистки ферментні препарати, що випускаються для потреб тваринництва, діляться на технічні і очищенні. Очищенні препарати отримують шляхом осадження алкоголем дифузійних витяжок культури продуценту (ступінь очистки позначається 10х).

Ферменти протеази, амілази, що знаходяться у ферментних препаратах мікробного походження (амілосубтилін ГЗх, протосубтилін ГЗх, глюковаморин П10х), позитивно впливають на розщеплення таких поживних речовин корму, як протеїн, крохмаль, геміцелюлоза до найпростіших складових частин, що в кінцевому рахунку приводить до інтенсифікації виробництва продукції свинарства.

Крім цих препаратів, холдингова компанія «Ензим» (м. Ладижин Вінницької області) випускає целотерин ГЗх і мацеробацилін ГЗх. За твердженням виробника, целотерин ГЗх містить комплекс целюлозолітичних ферментів, здатних послідовно розщеплювати клітковину

(целюлозу і целобіозу) кормів до гексоз і пентоз. Застосування препарату сприяє інтенсифікації приросту живої маси у свиней на 16% з одночасним скороченням витрати кормів на одиницю продукції. Мацеробацилін ГЗх представлений комплексом пектолітичних ферментів, основним з яких вважають пектат - транселіміназу, що підсилює гідроліз полісахаридів і в першу чергу - пектину кормів. Механізм дії цих двох препаратів недостатньо розкритий, особливо що стосується свиней. Невдала також спроба виробника рекомендувати дози ферментних препаратів у розрахунку на 1 голову. Як відомо, ферментні препарати нормують у розрахунку на суху речовину раціону (чи БВМД, БВД). Ферменти, вироблені мікробіологічною промисловістю, не є стимуляторами. Вони лише доповнюють ферменти шлунково-кишкового тракту.

У господарстві при вирощуванні телят ферментні препарати можна додавати до молока, попередньо розчинивши їх у невеликій кількості води. Для худоби під час відгодівлі і дійних корів у господарстві можна готувати суміш концентратів з препаратами, попередньо розрахувавши добову норму ферментних препаратів на тварину в день і додавати їх у добову норму концентратів.

При виробництві преміксів норму збільшують у 100 разів (за введення преміксу у комбікорм у кількості 1 %).

Норми введення ферментних препаратів (амілоризин, глюкаваморин, амілосубтилін, протосубтилін, міназа) для телят 0,01-0,03% сухої речовини раціону, птиці – 0,01-0,05% СР комбікорму.

Біологічно активні речовини (БАР) — це сполуки, які внаслідок своїх фізико-хімічних властивостей мають певну специфічну активність і виконують, змінюють або впливають на каталітичну (ферменти, вітаміни, коферменти), енергетичну (вуглеводи, ліпіди), пластичну (вуглеводи, ліпіди, білки), регуляторну (гормони, пептиди) або інші функції в організмі.

Зміст словосполучення може суттєво змінюватися залежно від сфери застосування. В науковому значенні (нейрофізіологічному, психічному, хімічному процесах) — підвищення активності життєвих процесів організму. Іншими словами, біологічна дія — це біохімічні, фізіологічні, генетичні та інші зміни, що відбуваються у живих клітинах та організмі в результаті дії БАР.

Взагалі, повністю індиферентних речовин у природі нема. Всі речовини виконують якісь функції в організмі людини, тварин, рослин або використовуються для досягнення певних ефектів.

Наприклад вода, пов'язана з метаболічними функціями живої клітини, є активним учасником транспортування поживних речовин та продуктів обміну в організмі, субстрактом низки ферментативних реакцій.

Питання для самоконтролю:

1. Який механізм дії на організм мають ферменти?
2. Які фактори враховують при формування складу кормових ферментних препаратів?
3. Перерахуйте зміни виробничих показників у тваринництві.
4. За рахунок чого цінність раціонів зростає на 5-10%?
5. Що дає можливість знизити витрати на годівлю та підвищити продуктивність тварин?
6. Чим ферментні препарати, що випускаються промисловістю, відрізняються від чистих ферментів?
7. Надати загальну характеристику біологічно активним речовинам.

Лабораторна робота №16

Тема: Технологічні схеми виробництва кормових антибіотиків

Мета заняття: ознайомити із загальною характеристикою антибіотиків та технологічною схемою виробництва кормових антибіотиків

Методичні вказівки: Антибіотики – це продукти життєдіяльності мікроорганізмів, рослин, тварин, які здатні пригнічувати або припиняти ріст і розвиток інших видів мікроорганізмів (у першу чергу патогенних). Використання кормових антибіотиків для стимуляції продуктивності тварин заборонено ветеринарним законодавством (тетрациклін, пеніцилін, стрептоміцин, неоміцин).

За хімічною структурою антибіотики є комплексом 10-12 амінокислот і ряду інших речовин (хлор, цинк і ін.).

Застосування антибіотиків дає можливість підвищити коефіцієнт використання кормових засобів. Це дуже важливо, оскільки зниження затрат кормів на використання одиниці продукції – один із основних факторів, які визначають економічну ефективність годівлі тварин.

Для тваринництва раніше випускалися спеціальні кормові антибіотики. Медичні антибіотики додавати до кормів не дозволяється.

Потрапляючи до організму з кормом, антибіотики здійснюють вплив на мікроорганізми травного тракту, на які у жуйних приходиться до 10% маси сухої речовини вмісту рубця.

Антибіотичні речовини змінюють видовий склад мікрофлори кишківника у сприятливому для господаря організму напрямку, придушуючи або зменшуючи кількість шкідливої мікрофлори.

Основними вимогами при використанні антибіотиків у якості стимуляторів росту і продуктивності сільськогосподарських тварин було – дозування препаратів у відповідності до встановлених норм, рівномірне змішування з кормами, безперервне давання їх тваринам, своєчасне виключення їх із раціону тварин, які йдуть на забій. Антибіотики – сильнодіючі засоби, тому препарати антибіотиків зберігають як речовини списку Б: у окремому темному, сухому,

прохолодному приміщенні, не більше 12 місяців з дня їх виготовлення.

У господарствах антибіотики додавалися у концентрати власного виробництва, замічник цільного молока або комбікорму (якщо вони не містять антибіотиків). При цьому антибіотики ретельно змішували з комбікормами або концентратами, наприклад, за допомогою кормозмішувачів. У господарствах антибіотики додавали у корма дробово. Спочатку відміряну кількість антибіотика змішують з невеликою або рівною кількістю концентратів. Потім до суміші додають ще стільки концентратів, щоб у отриманій суміші антибіотиків було не менше 10 частин, і ретельно перемішують з іншою порцією концентратів.

Контроль використання усіх антибіотичних препаратів здійснювали ветеринарні установи. При використанні антибіотиків враховувався рівень годівлі і поживність раціонів. Антибіотичні препарати не знижували своєї стимулюючої дії при комплексному застосуванні з мікроелементами, вітамінами, ферментами, синтетичними амінокислотами.

Молодняк, який отримував кормові препарати антибіотиків, споживав більшу кількість води. Тому якщо до складу раціону входили антибіотики, то необхідно було забезпечити регулярне напування тварин.

Введення антибіотиків у корм проводили робітники тваринних ферм під керівництвом ветеринарного лікаря або зооінженера. При додаванні у корм антибіотиків дотримувалися засобів безпеки, користувалися спецодягом (халат, рукавиці та ін.), респіратором. Після закінчення робіт мили руки теплою водою з милом.

Подрібнене зерно, яке використовують зазвичай як основну частину корму, замочують до вологості 40-50% і розкладають по 5-10 кг на алюмінієвий лист шаром близько 5 см. Зерно на аркушах стерилізують в автоклаві протягом 1 години при температурі 105-110°C. Потім поверхню зерна засівають посівним матеріалом відповідного продуцента – *Actinomyces aureofaciens* для біоміцина або *Penicillium chrisogenum* для пеніциліна. На рис. 1 показана класична схема виробництва лікувального пеніциліна.

Посівний матеріал вирощують в танкі. На поверхню засіяного зерна насипають сухе стерилізоване подрібнене зерно, висівки або інший матеріал шаром 0,5–1 см. Всі ці операції виконують в стерильних умовах, а подальше пророщування протягом кількох днів

здійснюється в термостатних камерах з температурою 26–30 градусів. Через 8–10 днів утворюється маса вологістю 50%, що містить в залежності від застосовуваного штаму і субстрату 200–400 мг/кг антибіотика і 0,1–0,4 мг вітаміну B₁₂.

Отриманий препарат змішують з кормами у співвідношеннях залежних від його активності. При удосконаленні цієї схеми додали процес сушки препарату в шафових, парових або інших сушарках. При сушінні в шафових сушарках вологий збагачений матеріал розкладають тонким шаром на 10–18 годин при температурі 40–50°C. Після висушування для визначення активності беруть пробу.

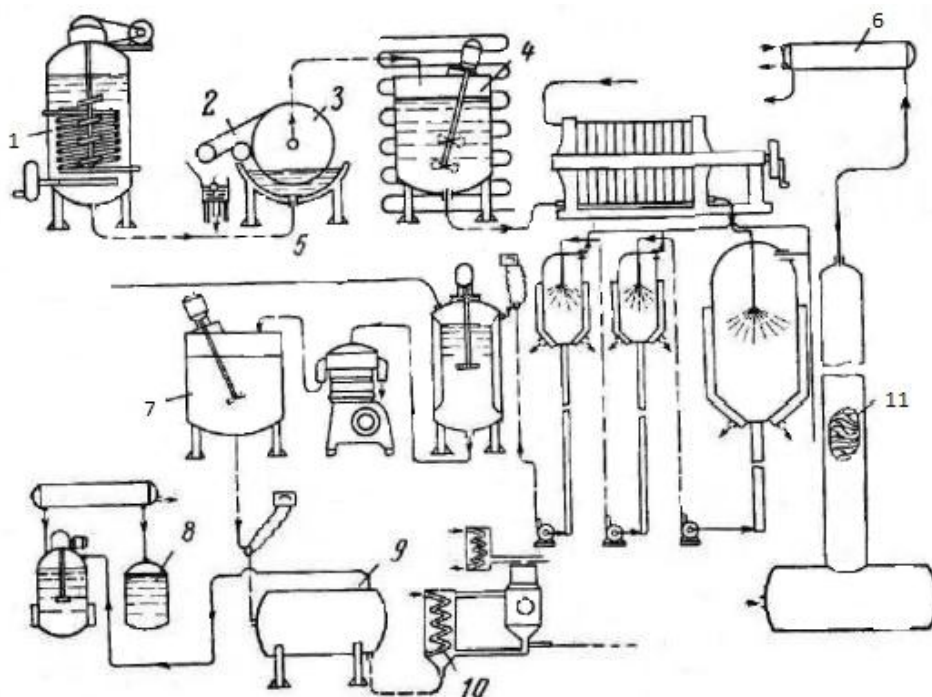


Рис. 13. Технологічна схема виробництва лікувального пеніциліну

1 – бродильний чан; 2 – направляючий рукав; 3 – обертаючий барабан; 4 – холодильник; 5 – вакуум-фільтр; 6 – згущувач; 7 – змішувач; 8 – приймач; 9 – відстіювач, 10 – вакуум-випарник; 11 – фракційна колонка.

Аерація культури в ферментері відбувається в результаті подачі підігрітого до необхідної температури стерильного повітря через спеціальні прилади-барботери, а також завдяки перемішуванню культуральної рідини різного типу мішалками і наявності відбійників.

Підтримання температури, оптимальної для гарного росту продуцента антибіотика і прояви їм підвищеної фізіолого-біохімічної

активності, забезпечується сорочкою ферментера або системою змійовиків. Змійовики використовуються також для подачі пари в процесі стерилізації або води для охолодження.

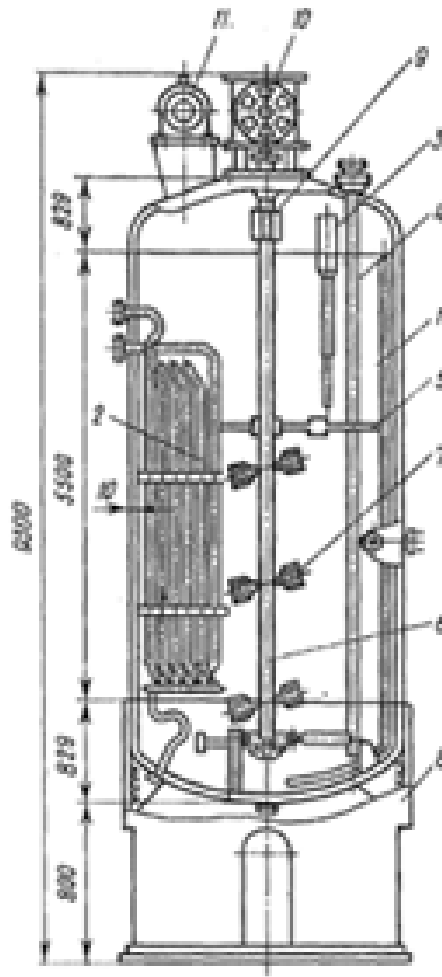


Рис. 14. Ферментер для глибинного вирощування продуцентів антибіотиків.

1 – корпус апарата, 2 – теплообмінник, 3 – гільза для термостата, 4 – барботер, 5 – розтяжки для вала, 6 – вал мішалки, 7 – лопасть мішалки, 8 – стійка, 9 – муфта вала, 10 – привід мішалки, 11 – мотор

Спостереження за основними процесами життєдіяльності організму здійснюється контрольовано-вимірною апаратурою, що дозволяє регулювати швидкість перемішування культурального середовища, підтримувати на заданому рівні температуру всередині ферментера, рН середовища, кількість повітря, що пропускається, тиск всередині ферментера і інші параметри. Застосовуються установки, що дозволяють автоматично визначати вміст азоту в середовищі по ходу розвитку організму. У промислових умов

отримання антибіотиків застосовують ферментери різної ємності – від 500 до 50 л, 100 м³ і більше. Стерилізацію виробничих ферментерів проводять перегрітою парою. Повітря, необхідне для аерації, стерилізується через спеціальні фільтри, заповненні скляною ватою або активованим деревним вугіллям.

Питання для самоконтролю:

1. Надати загальну характеристику антибіотикам.
2. Яку можливість дає застосування антибіотиків?
3. Який вплив надають антибіотики потрапляючи в організм тварин?
4. Які основні вимоги при використанні антибіотиків у якості стимуляторів росту і продуктивності сільськогосподарських тварин?
5. Які установи здійснюють контроль використання антибіотиків?
6. Надати характеристику технологічного отримання антибіотиків.
7. Яким чином здійснюється спостереження за основними процесами життєдіяльності організму?
8. Охарактеризуйте процес стерилізації виробничих ферментерів.

Лабораторна робота № 17

Тема: Організація виробництва кормових антибіотиків на спиртових заводах

Мета заняття: ознайомитись з організацією виробництва кормових антибіотиків на спиртових заводах

Методичні вказівки:

Антибіотики (антибіотичні речовини) утворюються різними групами організмів (бактеріями, грибами, вищими рослинами, тваринами). Історія відкриття першого антибіотика, який знайшов широке застосування в медичній практиці, пов'язана з ім'ям шотландського мікробіолога А. Флемінга (1881-1955).

У наукову літературу термін антибіотик був введений Ваксманом в 1942 р. Цей термін, незважаючи на певну недосконалість (дослівно-проти життя), міцно увійшов не тільки в науковий лексикон, але і в повсякденний побут. Проте в самому визначенні поняття «антибіотик» різні автори вкладають далеко неоднозначний зміст: від вельми розширеного до дуже звуженого тлумачення цього явища.

Антибіотики – специфічні продукти життєдіяльності організмів або їх модифікації, що володіють високою фізіологічною активністю по відношенню до певних груп мікроорганізмів (бактерій, грибів, водоростей), вірусам або до злоякісних пухлин, затримуючи їх ріст або повністю пригнічуючи розвиток.

Антибіотики, утворені бактеріями. До антибіотиків бактеріального походження належить близько 600 найменувань. Однак відносно невелике число речовин випускається промисловістю. Серед них можна назвати граміцидин С, утворений *Bacillus brevis* var. *G. B.*, поліміксини, продуцентами яких є *Bac. polymyxa* і *Bac. circulans*; бацитрацини, синтезовані *Bacillus Licheniformis*; низини, віднайдені культурою *Streptococcus lactis*.

Особливістю антибіотиків бактеріального походження є те, що вони за своєю хімічною будовою належать до поліпептидів (лінійним або циклічним) і низькомолекулярних білків. Один продуцент в процесі розвитку може утворювати кілька близьких за хімічною будовою антибіотиків. Тому зазвичай мають справу з групами антибіотиків, синтезованих бактеріями: *граміцидини*, яких відомо

п'ять форм (А, В, С_D, С(S), D), які відрізняються амінокислотним складом; *полімиксини* (включають 22 форми, в тому числі А₁, А₂, В₁, В₂, С, D₁, D₂ Е₁(колістин А), Е₂(колістин В), М, Р₁, Р₂. До складу полімиксинів поряд з амінокислотами входять діаміномасляна і метілоктанова кислоти. *Бацитрацини* об'єднують десять індивідуальних антибіотиків (А, А₁, В, С, D, Е, F₁, F₂, F₃ і G). *Низин*, утворений молочнокислим стрептококом, входить до складу семи основних білків. Однак лише тільки він володіє біологічною активністю. Низин складає близько 20% від всіх основних білків, синтезованих стрептококом.

Антибіотики, утворювані актиноміцетами. Найбільше число антибіотиків, що знайшли широке використання в практиці є антибіотики утворені за допомогою актиноміцетів. До цих антибіотичних речовин відноситься ряд груп сполук, що мають різноманітну хімічну будову і широкий спектр біологічної дії:

1-а група – Аміноглікозиди. У цю групу актиноміцетів антибіотиків входять речовини, молекули яких мають глікозидні зв'язки: стрептоміцин, утворений *Streptomyces griseus*; неоміцин, продуцентами яких є *Streptomycesfradiae*, *Str. albogriseolus*; канаміцини, утворені *Str. kanamyceticus*; гентаміцини, утворені *Micromonospora purpurea*; фортаміцини, до яких відносяться власне фортаміцин, утворений *Micromonospora olivoasterospora*; спораріцин, що продукується *Saccharopolyspora hisuta subsp. kobensis*, саннаміцини, продуцентами яких є *Str. sannanensis*, і деякі інші речовини.

2-а група – Тетрацикліни. До групи тетрацикліну входить ряд сполук, що мають близьку хімічну будову і володіють широким спектром антибіотичної дії. До антибіотиків тетрациклінів відносяться: хлортетрациклін, утворений *Streptomyces aureofaciens*; окситетрациклін, що синтезується культурою *Str. rimosus*; тетрациклін, продуцентом якого є певні штами *Str. aureofaciens*.

3-тя група – Актиноміцини. Антибіотики актиноміцини – велика (більше 100 препаратів) група близьких за хімічним будовою речовин, утворених актиноміцетами, що відносяться до більш ніж 20 видів цих мікроорганізмів, у тому числі *Streptomyces antibioticus*, *Str. chrysomallus*, *Str. flavus*.

4-а група – Макроліди. Антибіотики, що відносяться до макролідів, характеризуються наявністю в молекулах

макроциклічного лактонного кільця, пов'язаного з одним або декількома вуглеводними залишками (зазвичай аміноцукрами).

5-а група – Анзаміціни. Антибіотики, що відносяться до анзаміцинам, утворюються актиноміцетами і деякими видами вищих рослин.

В даний час перед наукою і технікою стоять завдання з розробки простих, економічно високоефективних методів виробництва кормових антибіотиків. Найбільш простим методом виробництва кормових антибіотиків, який застосовували в колишньому СРСР і закордоном, був так званий метод поверхневої ферментації, або метод прямого збагачення кормів.

Подрібнене зерно, яке використовують зазвичай як основну частину корму, замочують до вологості 40-50% і розкладають по 5-10 кг на алюмінієвий лист шаром близько 5 см. Зерно на аркушах стерилізують в автоклаві протягом 1 години при температурі 105-110°C. Потім поверхню зерна засівають посівним матеріалом відповідного продуцента – *Actinomyces aureofaciens* для біоміцина або *Penicillium chrisogenum* для пеніциліна. На рис. 1 показана класична схема виробництва лікувального пеніциліна.

Посівний матеріал вирощують в танкі. На поверхню засіяного зерна насипають сухе стерилізоване подрібнене зерно, висівки або інший матеріал шаром 0,5–1 см. Всі ці операції виконують в стерильних умовах, а подальше пророщування протягом кількох днів здійснюється в термостатних камерах з температурою 26–30 градусів. Через 8–10 днів утворюється маса вологістю 50%, що містить в залежності від застосовуваного штаму і субстрату 200–400 мг/кг антибіотика і 0,1–0,4 мг вітаміну B₁₂.

Отриманий препарат змішують з кормами у співвідношеннях залежних від його активності. При удосконаленні цієї схеми додали процес сушки препарату в шафових, парових або інших сушарках. При сушінні в шафових сушарках вологий збагачений матеріал розкладають тонким шаром на 10–18 годин при температурі 40–50°C. Після висушування для визначення активності беруть пробу.

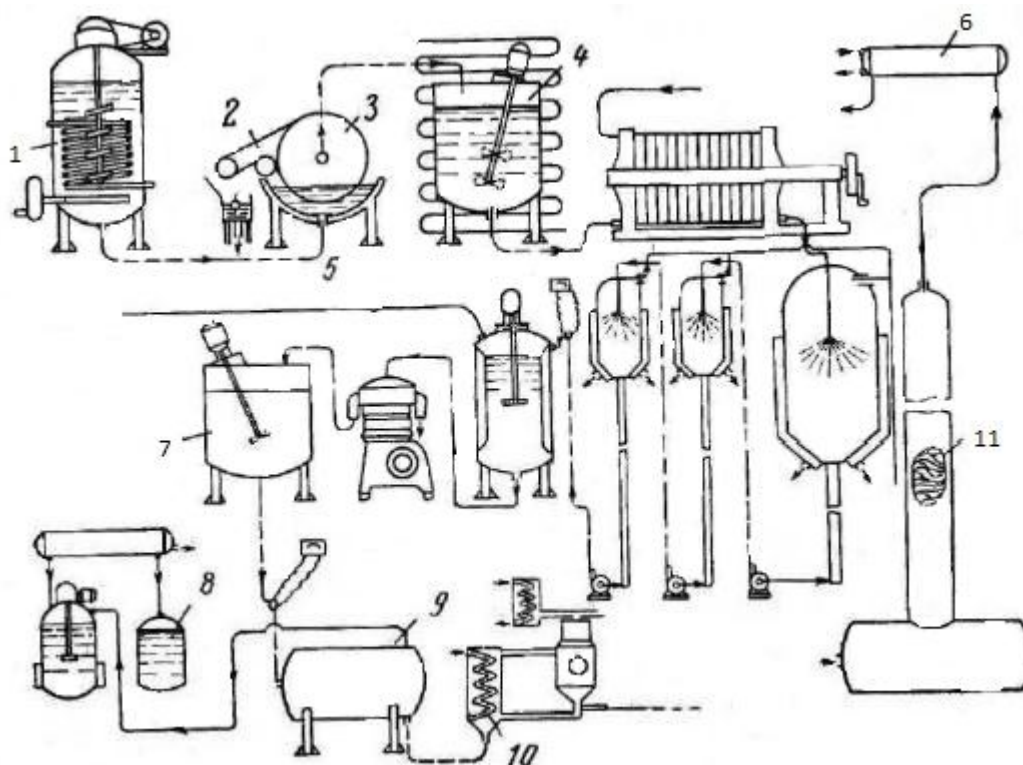


Рис. 15. Технологічна схема виробництва лікувального пеніциліну

1 – бродильний чан; 2 – направляючий рукав; 3 – обертаючий барабан; 4 – холодильник; 5 – вакуум-фільтр; 6 – згущувач; 7 – змішувач; 8 – приймач; 9 – відстійовач, 10 – вакуум-випарник; 11 – фракційна колонка.

Аналогічну схему, але трохи спрощену, застосовують в Українському науково-дослідному інституті тваринництва степових районів ім. М. Ф. Іванова «Асканія-Нова». Інститут рекомендує її для колгоспів.

В ветеринарно-бактеріологічній лабораторії отримують чисту культуру гриба *Penicillium*, яку вирощують на пшоні або на інших концентратах в бактеріологічних чашках протягом 7-8 днів при 23-25 °С. Коли закваска набуває зеленувато-голубий колір, її поміщають в стерильні пакети і сушать на повітрі. Одною пакету вагою 25 г достатньо для приготування 100 кг кормів.

Суміш 65% ячмінної і 30% кукурудзяної дерті, а також 5% подрібненого люцернового сіна є кращою для вирощування міцеліальної маси. Корм зволожують гарячою водою в кількості 30-31 л на 100 кг і запарюють у бочці при 100°С. Потім його розкладають на стелажах, охолоджують до 25°С і вносять суспензію

спор гриба. Міцеліальну масу вирощують на стелажах протягом 1,5-2,0 доби при температурі 23°C. Для підвищення ефективності перед запарюванням в 100 кг корму додають по 0,5 кг кухонної солі і крейди і по 1-3 г хлористого кобальту.

Питання для самоконтролю:

1. Якими групами організмів утворюються антибіотики?
2. В якому році та ким був введений термін «антибіотик»?
3. Чим характеризуються антибіотики бактеріального походження?
4. Чим характеризуються антибіотики які утворенні актиноміцетами?
5. Класифікуйте ряд груп сполук антибіотиків, що мають різноманітну хімічну будову і широкий спектр біологічної дії.
6. Яку культуру гриба отримують в ветеринарно-бактеріологічній лабораторії?
7. Які речовини додають для підвищення ефективності перед запарюванням корму?

Лабораторна робота № 18, 19

Тема: Технологічне обладнання для виробництва вітаміну В₁₂

Мета заняття: ознайомитись з технологічним обладнанням для виробництва вітаміну В₁₂

Методичні вказівки:

Світова продукція вітаміну В₁₂ становить 9-11 тис. кг на рік; з них 6500 кг використовують на медичні цілі, а іншу частину - для тваринництва. Виробництво вітаміну В₁₂ засновано головним чином на культивуванні пропіоновокислих бактерій (в РФ, Великобританії, Угорщини), мезофільних та термофільних меганогенних бактерій (РФ, Угорщина), а також актиноміцетів і споріднених форм (Італія).

У нашій країні в якості продуцента вітаміну В₁₂ використовують *Propionibacterium freudenreichii* var. *Shermanii*.

Для отримання вітаміну В₁₂ бактерії культивують періодичним методом в анаеробних умовах в середовищі, що містить кукурудзяний екстракт, глюкозу, солі кобальту і сульфат амонію. Утворені в процесі бродіння кислоти нейтралізують розчином лугу, яка безперервно надходить в ферментер. Через 72 год у середовище вносять попередник – 5,6-ДМБ. Без штучного введення 5,6-ДМБ бактерії синтезують фактор В і псевдовітамін В₁₂ (азотистих основ служить аденін), що не мають клінічного значення.

Ферментацію закінчують через 72 год. Вітамін В₁₂ зберігається в клітинах бактерій. Тому після закінчення бродіння біомасу сепарують і екстрагують з неї вітамін водою, підкисленою до рН 4,5-5,0 при 85-90°C протягом 60 хв. Водний розчин вітаміну В₁₂ охолоджують, доводять рН до 6,8-7,0 50%-ним розчином NaOH.

Очищення розчину проводять на йонообмінній смолі СГ-1, з якої кобаламін елюють розчином аміаку. Далі проводять додаткове очищення водного розчину вітаміну органічними розчинниками, упарювання і очистку на колонці з А1203. З окису алюмінію кобаламіну елюють водним ацетоном. При цьому К0-В₁₂ може бути відділений від СГ4- і оксикобаламіну.

До водно-ацетонового розчину вітаміну додають ацетон і витримують при 3-4°C 24-48 год. Випадні кристали вітаміну фільтрують, промивають сухим ацетоном і ефіром сірки, і сушать у

вакуум-ексикаторі над P_2O_6 . Для запобігання розкладання вітаміну B_{12} всі операції необхідно проводити в сильно затемнених приміщеннях або при червоному світлі. Таким чином, можна отримати не тільки суміш оксикобаламінів, а й коферментну форму, яка володіє високим терапевтичним ефектом.

Для хімічного очищення вітаміну B_{12} використовується його здатність утворювати продукти з фенолом і резорцином. При цьому способі відділення вітаміну B_{12} від супутніх йому факторів спрощується. Промисловий концентрат ціанкобаламіну обробляють водним розчином резорцину (або фенолу), виділяють комплекс вітаміну B_{12} з резорцином (або фенолом), далі розкладають його і отримують кристалічний препарат.

Лікувальні препарати в ампулах: камполон, антианемін і гепавіт – містять водний екстракт печінки великої рогатої худоби.

Перспективні дослідження з мутагенезу пропіоновокислих бактерій як один із способів підвищення продуктивності штаму, а також перевірки та впровадження у виробничі умови інших продуцентів, що ростуть на дешевому нехарчовій сировині.

Для збагачення кисломолочних продуктів вітаміном B_{12} використовують пропіоновокислі бактерії як у чистому вигляді, так і у вигляді концентрату, приготованого на молочній сироватці.

Для потреб тваринництва вітамін B_{12} отримують, використовуючи змішану культуру, яка містить термофільні метаноутворюючі бактерії. Встановлено освіту кориноїдів не тільки в змішаній, а й у чистій культурі метаноутворюючих бактерій *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium formicum*, *Mb. thermoautotrophicum* при зростанні в присутності H_2 і CO_2 . Вміст кориноїдів у метанобразуючих бактерій випадках становить 1,0-6,5 мг / г сухої біомаси.

За допомогою змішаної культури метаноутворюючих бактерій в колишньому СРСР розроблений метод одержання кормового препарату вітаміну B_{12} -КМБ12.

Субстратом для метанового бродіння служить ацетоно-бутилова і спиртова барда.

Для метанового бродіння використовують декантат барди, що містить 2,0-2,5% сухих речовин. У якості біостимуляторів вносять також карбамід та дамонійфосфат, 5,6-ДМБ не вносять. Вихідна барда має температуру близько $100^{\circ}C$ і практично стерильна. Перед вступом до ферментера барда охолоджується до $55-57^{\circ}C$. В якості

вихідної культури використовують змішану культуру метаноутворюючих бактерій, здійснюючих термофільне «метанове бродіння» стічних вод.

Отримання концентрату вітаміну V_{12} включає наступні технологічні стадії: безперервне зброджування барди комплексом бактерій, згущення метанової бражки і сушку згущеної маси на розпилювальній сушарці. Бродіння проводять в залізобетонних ферментерах безперервним способом протягом року.

Важлива умова нормального процесу бродіння - контроль рівня жирних кислот і амонійного азоту. Вітамін V_{12} нестійкий при тепловій обробці, особливо в лужному середовищі. Тому перед виправними до метанової бражки додають $HC1$ до оптимального значення pH 5,0-5,3 і сульфід Na (оптимальний вміст 0,07-0,10%).

Перед надходженням на установку випарювання метанова бражка дегазується шляхом нагрівання до 90-95°C при атмосферному тиску. Бражку згущують до 20% сухих речовин в чотирикорпусний випарних апаратах. Згущена метанова бражка висушується на розпилювальній сушарці.

Технологічна схема представлена на рис.2. Ацетоно-бутилова барда з нижньої частини бражної колони надходить у збірник барди 1 і насосом подається в декантатор 3. Відстій барди збирається в збірнику 4 і використовується на корм худобі. Декантат, охолоджений до температури 55-57 ° C, метанол і хлористий кобальт надходять в ферментер 12. Зброджену масу з верхньої частини ферментера відбирають і направляють в реактор 19, де здійснюють стабілізацію вітаміну V_{12} шляхом додавання сульфіту натрію і соляної кислоти, змішаних в змішувачі 18. З стабілізованою бражки видаляють гази в сепараторі газів 22, бражку упарюють у випарній установці 24 і збирають в збірниках 26. Згущена метанова бражка перекачується насосом 27 у збірник метанової бражки 28, а звідти насосом 29 в розпилюючу сушарку 31.

В якості теплоносія для сушіння використовують гази бродіння, спалювані в печі 39. Сухий порошок надходить в бункер 33 і розфасовується в поліетиленові мішки, вкладені в крафт-пакети.

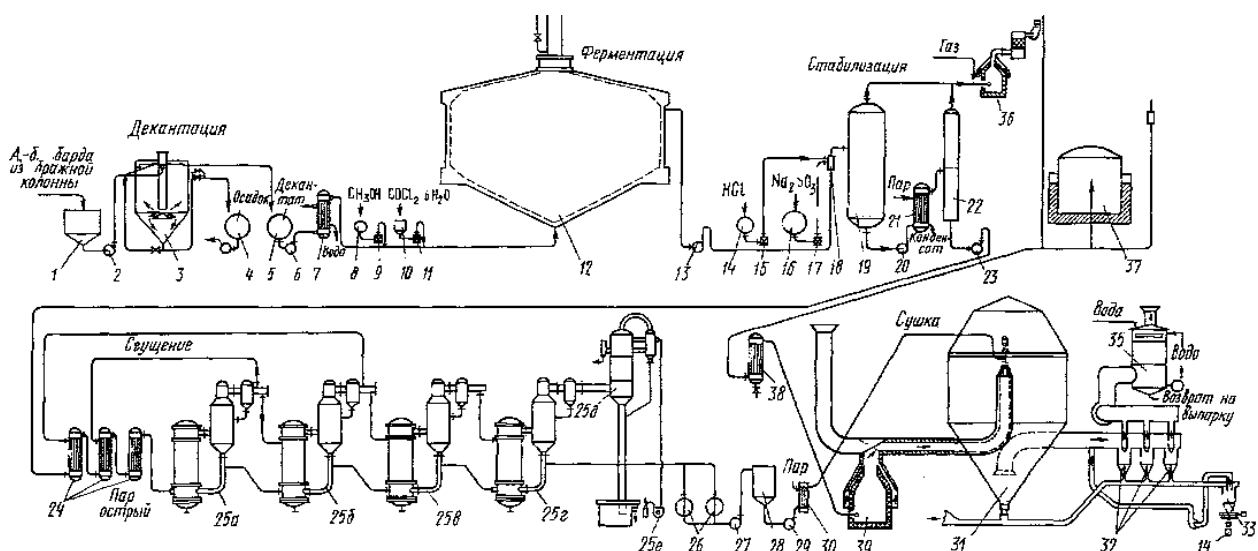


Рис. 16. Технологічна схема отримання концентрату вітаміну В₁₂ за допомогою змішаної культури метаноутворюючих бактерій.

1 – збірник барди; 2 – насос для барди; 3 – декантатор барди; 4 – збірник згущеної барди; 5 – збірник декантата барди; 6 – насос для декантата барди; 7 – холодильник для охолодження декантата барди; 8 – збірник-мірник метанолу; 9 – насос-дозатор метанолу ; 10– збірник-мірник розчину хлориду кобальту; 11 – насос-дозатор розчину хлориду кобальту; 12 – ферментер для метанового бродіння; 13 – насос для метанової бражки; 14 – збірник-мірник соляної кислоти; 15 – насос-дозатор соляної кислоти; 16 – збірник-мірник сульфіту натрію; 17 – насос-дозатор розчину сульфіту натрію; 18 – змішувач матанової бражки,соляної кислоти та розчину сульфіту натрію; 19 – реактор для стабілізації вітаміну В₁₂ в метановій бражці; 20 – насос для стабілізуванню метанової бражки; 21 – підігрівач стабілізованої метанової бражки; 22 – сепаратор газів; 23 – насос для подачі стабілізованої метанової бражки до випарної установки; 24 – підігрівачі метанової бражки; 25 – випарна установка для згущення метанової бражки; 26 – збірник згущеної метанової бражки; 27 – насос для згущеної метанової бражки; 28 – збірник метанової бражки; 29 – насос для згущеної метанової бражки; 30 – підігрівач згущеної метанової бражки; 31 – розпилюючі сушарка; 32 – циклони розпилюючої сушарки; 33 – бункер сухого концентрату; 34 – фасування в мішки; 35 – скруббер для очищення димових газів сушарки від порошка концентрату ; 36 – установка для каталітичного спалювання газів , які виділяються при підкисленні та нагріванні метанової бражки; 37 – газгольдер для газів бродіння; 38 –

холодильник для відділення води з газів бродіння; 39 – газова піч розпилюючої сушарки.

Відсутність промислових відходів, доступність сировини, безперервність методу, що не потребує стерильних умов, роблять його економічним.

Кормовий вітамін В₁₂ одержували у колишньому Радянському Союзі на Грозненському ацетоновому і Єфремівському біохімічному заводах. Для виробництва вітаміну В₁₂ передбачені і за останній час впроваджені системи автоматизації основних стадій технологічного процесу.

Питання для самоконтролю:

1. На чому засновано виробництво вітаміну В₁₂?
2. Яким методом культивують бактерії для отримання вітаміну В₁₂?
3. Які бактерії застосовують для збагачення кисломолочних продуктів вітаміном В₁₂?
4. Технологічні стадії отримання концентрату вітаміну В₁₂.
5. Яка важлива умова нормального процесу бродіння?
6. Які фактори роблять економічним технологію отримання вітаміну В₁₂?

Лабораторна робота № 20

Тема: Технологічна схема виробництва жиротворних водорозчинних вітамінів

Мета заняття: ознайомитись із загальною характеристикою вітамінів та з технологічною схемою виробництва жиротворних водорозчинних вітамінів

Методичні вказівки:

Вітаміни - це низькомолекулярні органічні сполуки, роль яких для нормальної життєдіяльності організму добре відома. Оскільки в харчових продуктах вітамінів міститься небагато (в 100 мл на 100 г їжі) і вони швидко руйнуються, треба вітамінізувати готову їжу та продукти. Ось тому вітаміни вже давно виробляються в великих кількостях. Традиційно способи отримання вітамінів ґрунтуються або на переробці великої кількості сировини, або в рідких випадках на штучному синтезі. Ось тому вітамінна промисловість вимагає більш ефективних технологій. Такі технології успішно створені лапша вок замість на дом wok in box доставка китайской лапши вок.

З допомогою генетичних маніпуляцій були отримані штами мікроорганізмів, які продукують в десятки тисяч разів більше вітамінів, ніж необхідно для їх росту. Це штами *Denitifrificans* і *Propionibacterium freudenreichii*, які продукують вітаміни B12 та інші. В СРСР на базі *Bacillus subtilis* сконструйовано ефективний продуцент вітаміну B12.

Мікробіологічна технологія дозволила вирішити проблему виробництва аскорбінової кислоти (вітамін С). В Японії розроблений ефективний ферментативний спосіб отримання стабільного необхідного вітаміну С-аскорбін-2-фосфата, який використовується в якості антиоксиданту.

Вітаміни B2, B12 додають в їжу тварин для збалансування кормів.

Вітамінна промисловість – галузь медичної промисловості, підприємства якої виробляють синтетичні вітаміни, коферменти та їхні препарати (драже, таблетки, ампули, капсули, гранули, концентрати), а також вітамінні препарати з рослинної сировини. Пошук роботи з одержання вітамінних препаратів в Україні розпочалися 1928 в Україні органотерапевтичні інститути (Харків,

нині Інститут проблем ендокринної патології АМНУ), де 1931 було випущено препарат синтетичного вітаміну D2 – арахітол за технологією, розробленою А. Кротовським. Промислове виробництво вітамінів організовано на початку 30-х рр. 20 ст. Спочатку вітамінні препарати виготовляли з природної сировини, 1945–1947 освоєно виробництво синтетичних вітамінів С, D2 і К3 – вікасолу, розробленого в Інституті біохімії АН УРСР (Київ), а 1949 – вітаміну В₁.

Таблиця 9

Виробництво вітамінної продукції

Продукція	1950	1955	1960	1965	1970	1975
Синтетичні вітаміни	0,19	0,98	31,68	39,73	147,17	304,1
Вітамінні препарати у вигляді сиропів та масляних розчинів	817,2	1036,1	2618,9	3298,0	5040,55	5482,2
Вітамінні препарати у вигляді таблеток і драже	381,21	912,29	991,2	1778,95	2292,75	3636,7
Вітамінні препарати у вигляді порошку	–	–	–	–	40,6	50,1

Перші спеціалізовані підприємства з виготовлення вітамінів були розміщені в Києві, Одесі та Умані (Черкас. обл.) 1952 на Київ Вітамін створено експериментальний цех з виробництва синтетичного вітаміну D3 із холестерину за технологією, розробленою В. Вендтом та І. Дроковою в Інституті біохімії. Пізніше за технологією цих вчених освоєно виготовлення відеїну D3 – штучного вітаміну D3 з білками, а 1959 – синтетичного вітаміну Е із вітолу і 3-метилгідрокінону за методом, розробленим в Інституті органічної хімії АН УРСР (Київ) 1953 створено вітамінний завод в Умані, де були побудовані цехи з виготовлення нікотинової кислоти і пантотенату кальцію. 1956 на Уманському вітамінному заводі почав діяти цех з виробництва вітаміну РР, 1962 налагоджено синтез нікотинаміду, а 1964 – вітаміну В3 у формі пантотенату кальцію. На Одеському вітамінному заводі одержували вітаміни Е (від 1960) та А (від 1964). 1966 на Київському вітамінному заводі введено в дію потужності з виробництва 1300 кг синтетичного вітаміну Е, 100 т відеїну D3 і 1400 т вітамінні препаратів у вигляді драже і таблеток. 1966– 70 проведено роботу з подальшої механізації та автоматизації виробництва, використання потужнішого обладнання, впровадження

досягнень науки і техніки, що сприяло інтенсивнішому розвитку виробництва вітамінної продукції. 1971–75 розширено асортимент вітамінів і вітамін. препаратів, а також масштаби їх виробництва, що дало змогу передати частину продукції для потреб сільського господарства (холекальціферол, пантотенат кальцію). 1974 введено в дію цех з виготовлення вітамінних препаратів у вигляді таблеток і драже потужності 700 т на Уманському вітамінному заводі. 1976, у порівнянні з 1960, обсяг виробництва вітамінної продукції в Україні збільшився майже у 16 разів. 1990 в Україні вироблялося 806,71 т вітамінів, 1991 – 1561,76 т. Починаючи від 1992, у зв'язку із економічними проблемами в Україні. Динаміку виробництва вітамінної продукції, вітамінів та їх окремих видів в Україні наведено у табл. 9 -11.

Таблиця 10

Виробництво вітамінів

Продукція	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Вітаміни, всього	806,71	1561,76	1053,94	312,71	173,12	13,07	4,03	6,59
з них – медичного призначення	641,16	1376,51	986,72	275,56	161,04	13,04	4,01	0,08

Створення і впровадження вітамінів здійснюється переважно на підставі синтезу, використання імпортованих субстанцій, а також шляхом розроблення оригінальних вітчизняних вітамінів. Роботи щодо створення, доклінічного вивчення, розроблення науково-технологічної документації та впровадження у виробництво вітамінів координує в організаціях НАНУ Державно науковий центр лікарських засобів, який розвинувся на базі створення у квітні 1920 Харків хіміко-фармацевтичний інститут – 1-ї наукової установи у галузі фармації в Україні і є лідером у створенні різноманітних медичних препаратів. Вагомий внесок у розробку нових лікарських препаратів (вітамінів) здійснили інститути НАНУ та АМНУ, де зберігся науковий потенціал і науково-технічна база. Це, в першу чергу, Інститути біохімії, геронтології, фармакології та токсикології (усі – Київ). Серед галузей інститутів провідне місце посідає Інститут медичної радіології АМНУ (Харків). До специфічних особливостей вітамінних препаратів. належать: багатостадійність процесів, значна матеріалоємність, що зумовлює необхідність розміщення підприємств

поблизу сировинної баз, застосування спеціального устаткування для роботи з агресивними середовищами, висока чистота виробництва. Як і для всієї медичної галузі, основними причинами, що стримують подальший розвиток вітамінної промисловості, є обмеженість власних обігових коштів і практична відсутність фінансової підтримки з боку держави, невисокий технічний і технологічний рівень виробництва, що гальмує розвиток виробництва експортоспроможної продукції, відсутність низки сировинних ресурсів.

Таблиця 11

Виробництво окремих видів вітамінів (т)

Продукція	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Вітамін Е (синтетичний)	–	–	–	–	–	–	2,4	–
Аскорбінова кислота (вітамін С)	–	823,0	546,4	26,2	1,0	1,3	–	–
Нікотинова кислота (вітамін РР, враховуючи нікотинамід)	276,3	209,1	137,1	64,1	15,5	–	–	–
Кальцію пантотенат (вітамін В ₃ для сільського господарства)	175,8	159,3	157,2	109,1	77,3	1,0	–	–
Кормовий вітамін В ₁₂	166,55	185,25	67,22	37,15	12,08	0,03	0,02	6,5

Технологічна схема представлена на рис. 17. Ацетоно-бутилова барда з нижньої частини бражної колони надходить у збірник барди 1 і насосом подається в декантатор 3. Відстій барди збирається в збірнику 4 і використовується на корм худобі. Декантат, охолоджений до температури 55-57 ° С, метанол і хлористий кобальт надходять в ферментер 12. Зброджену масу з верхньої частини ферментера відбирають і направляють в реактор 19, де здійснюють стабілізацію вітаміну В₁₂ шляхом додавання сульфату натрію і соляної кислоти, змішаних в змішувачі 18. З стабілізованою бражки видаляють гази в сепараторі газів 22, бражку упарюють у випарній установці 24 і збирають в збірниках 26. Згущена метанова бражка перекачується насосом 27 у збірник метанової бражки 28, а звідти насосом 29 в розпилюючу сушарку 31.

В якості теплоносія для сушіння використовують газі бродіння, спалювані в печі 39. Сухий порошок надходить в бункер 33 і розфасовується в поліетиленові мішки, вкладені в крафт-пакети.

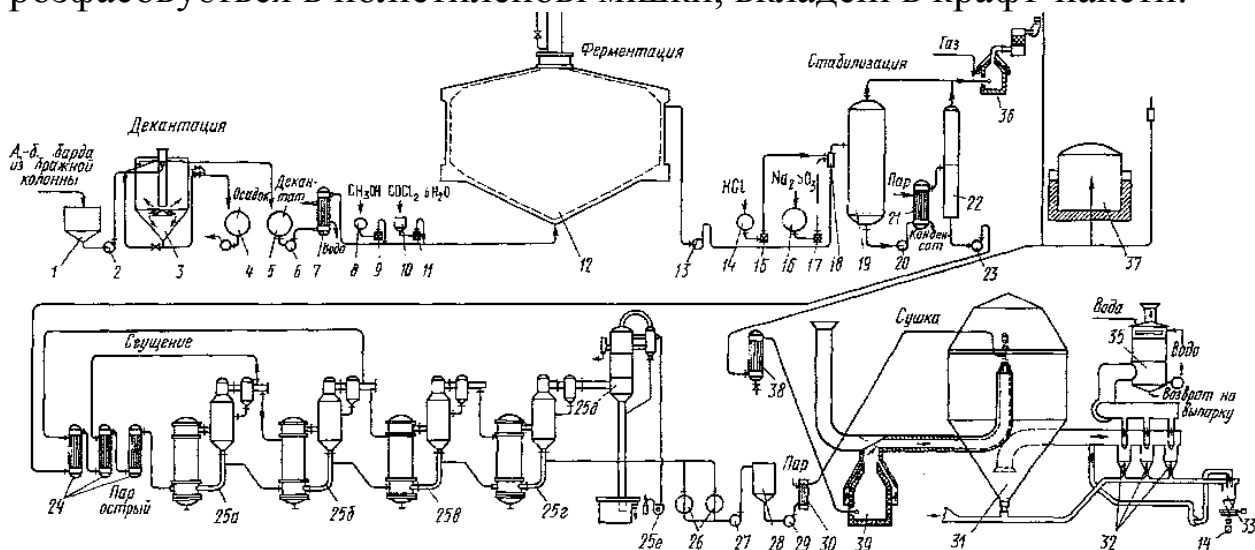


Рис.17. Технологічна схема отримання концентрату вітаміну В₁₂ за допомогою змішаної культури метаноутворюючих бактерій.

1 – збірник барди; 2 – насос для барди; 3 – декантатор барди; 4 – збірник згущеної барди; 5 – насос для декантата барди; 6 – насос для декантата барди; 7 – холодильник для охолодження декантата барди; 8 – збірник-мірник метанолу; 9 – насос-дозатор метанолу ; 10– збірник-мірник розчину хлориду кобальту; 11 – насос-дозатор розчину хлориду кобальту; 12 – ферментер для метанового бродіння; 13 – насос для метанової бражки; 14 – збірник-мірник соляної кислоти; 15 – насос-дозатор соляної кислоти; 16 – збірник-мірник сульфату натрію; 17 – насос-дозатор розчину сульфату натрію; 18 – змішувач метанової бражки, соляної кислоти та розчину сульфату натрію; 19 – реактор для стабілізації вітаміну В₁₂ в метановій бражці; 20 – насос для стабілізування метанової бражки; 21 – підігрівач стабілізованої метанової бражки; 22 – сепаратор газів; 23 – насос для подачі стабілізованої метанової бражки до випарної установки; 24 – підігрівачі метанової бражки; 25 – випарна установка для згущення метанової бражки; 26 – збірник згущеної метанової бражки; 27 – насос для згущеної метанової бражки; 28 – збірник метанової бражки; 29 – насос для згущеної метанової бражки; 30 – підігрівач згущеної метанової бражки; 31 – розпилююча сушарка; 32 – циклони розпилюючої сушарки; 33 – бункер сухого концентрату; 34 – фасування в мішки; 35 – скруббер для очищення димових газів сушарки від порошка концентрату ; 36 – установка для каталітичного

спалювання газів , які виділяються при підкислені та нагріванні метанової бражки; 37 – газгольдер для газів бродіння; 38 – холодильник для відділення води з газів бродіння; 39 – газова піч розпилюючої сушарки.

Питання для самоконтролю:

1. Надати характеристику терміну «вітаміни».
2. Надати характеристику терміну «вітамінна промисловість».
3. В якому році почались роботи з одержання вітамінних препаратів в Україні?
4. В якому році випущено препарат синтетичного вітаміну D₂?
5. Де були розміщені перші спеціалізовані підприємства з виготовлення вітамінів?
6. Назвіть специфічні особливості вітамінних препаратів.
7. Що використовують в якості теплоносія для сушіння вітамінів?
8. Охарактеризуйте технологічну схему виробництва концентрату вітаміну B₁₂.

Лабораторна робота № 21

Тема: Технологічні схеми та обладнання для виробництва ферментів

Мета заняття: ознайомитись з технологічною схемою та обладнанням для виробництва ферментів

Методичні вказівки:

Ферменти притаманні всім живим об'єктам і містяться практично в усіх живих рослинах, тваринах і мікроорганізмах. Однак процес біосинтезу ферментів у організмі пов'язаний із забезпеченням метаболізму клітин і кількість синтезованих ферментів суворо визначається життєвою потребою організму. Такі об'єкти не можуть слугувати джерелом одержання ферментних препаратів. Для цього підходять лише мікроорганізми, деякі рослини або окремі органи рослин і тварин, здатні накопичувати значну кількість ферментів.

Найширшим спектром використання відзначаються мікробні ферментні препарати. Це, як правило, так звані промислові або технічні ферментні препарати. Залежно від складу ферментів їх прийнято класифікувати на амілолітичні препарати; ферменти, що діють на пектинові речовини; целюлолітичні препарати; ферменти, що деградують лігнін; геміцелюлазні препарати; ліполітичні препарати; протеолітичні препарати; протеолітичні препарати, що здатні приводити до зсідання білка молока (ренніноподібні протеїнази); препарати, що містять глюкозооксидазу і каталазу; ферменти, що здійснюють перекисне окиснення поліненасичених жирних кислот (ліпоксигеназа, простагландинсинтетаза); препарати глюкозоізомерази; препарати β -галактозидази; препарати β -фруктофуранозидози.

Українські виробники промислових ферментних препаратів

Ладизинський завод біо- та ферментних препаратів “Ензим” (Вінницька обл., м. Ладизин). Єдиним великим біотехнологічним підприємством в Україні після розпаду СРСР залишився Ладизинський завод біо- та ферментних препаратів, який на сьогодні є найбільшим біотехнологічним промисловим майданчиком на території України, здатним випускати до 6000 товарних тонн продукції на рік, і спеціалізується на виробництві технічних ферментних препаратів.

Після тимчасового занепаду в 90-х рр. підприємство відновило свою діяльність і навіть розширило асортимент продукції. Використовуючи 30-річний досвід роботи і сучасні технологічні рішення, воно виробляє продукцію високої якості, оперативно підбираючи оптимальні рішення для кожного конкретного споживача.

ТОВ “Дніпровська асоціація-К” (м. Київ). Підприємство створене в 2004 р. Напрями роботи підприємства — науково-виробнича діяльність, зокрема синтез і виробництво ферментних препаратів класу оксидаз і їх модифікацій, атестація препаратів для застосування в Україні та інших країнах, розроблення і впровадження проектів і технологій застосування ферментних препаратів.

Вказані напрями діяльності присвячені роботі з трьома препаратами: Агрозином, Оксізином і Дорзином. У характеристиках щодо складу препаратів, наведених на сайті виробника, зазначено, що Агрозин та Оксизин становлять комплексну органічну композицію, одержану ферментацією патоки цукрового буряку. Склад Дорзину виробники на сайті не подають.

Сфери використання ферментних препаратів є такими:

- Агрозин використовують для обробки сільгоспугідь із зерновими, овочевими, садовими культурами і виноградниками для поліпшення структури ґрунту та його водно-кисневого балансу, а також для активізації аеробних мікроорганізмів, що підвищує врожайність культур; для обробки ділянок, що не піддаються механічній обробці (сінокоси, пасовища, паркові лужки, футбольні поля); для обробки важких закислених ґрунтів з метою покращення їх структури і рівня рН.

- Оксизин використовують для очищення ємностей, технологічного устаткування переробної та харчової промисловості, водойм, стічних вод, ґрунту від органічних забруднювачів, нафти і нафтопродуктів; для дезактивації устаткування атомних електростанцій; для переробки медичних відходів; для миття місць громадського користування і залізничного транспорту; як засіб для ліквідації плям бензину, дизельного палива і олій на автозаправних станціях; для переробки органічних залишків, гною і посліду з метою швидкого отримання органічних добрив; для переробки відхожих місць з метою знищення запаху, прискореної переробки фекалій і збільшення глибини їх переробки; для обробки компостних ям з метою прискорення і глибини переробки компосту; для переробки

нафтошламу в шламосховищах на нафтопереробних заводах і в місцях очищення залізничних цистерн; для очищення каналізаційних колекторів і відстійників; для очищення шкур тварин від жиру; для поліпшення санітарногігієнічного стану сховищ твердих побутових відходів (зникає запах, знищуються гельмінти, прискорюється процес переробки, збільшується глибина переробки); для поліпшення санітарно-гігієнічного стану (пропадає запах) у виробничих цехах м'ясокомбінатів, молокозаводів, харчосмакових фабрик; як аварійний запас у портах на випадок аварійної протоки паливно-мастильних матеріалів; як екологічно чистий розчинник органіки.

- Дорзин використовують при будівництві доріг, а саме для конструювання нових міцніших і менш проникних для вологи дорожніх основ і покриттів з використанням існуючих ґрунтових матеріалів. Перевагою ферментного препарату є те, що його потрібно всього 37 дм³ для обробки одного кілометра дорожнього покриття 8-метрової ширини завтовшки 15 см.

Виробництво медичних ферментних препаратів в Україні

На сьогодні в Україні діє низка підприємств, які виробляють біофармацевтичну продукцію, зокрема медичні ферментні препарати.

ПАТ “Вітаміни” (Черкаська обл., м. Умань). Це фармацевтичне підприємство з виготовлення готових лікарських засобів. Позиціонує себе як підприємство, що займає на фармацевтичному ринку України позиції лідера з виробництва ферментних препаратів.

Завод був заснований у лютому 1953 р. як одне з перших у Радянському Союзі підприємств з виробництва вітамінів. Початок діяльності підприємства пов'язаний із освоєнням нових для країни промислових технологій: виробництва нікотинової кислоти і нікотинаміду, ментолу рацемічного, кальцію пантотенату.

У 2012 р. проведено реконструкцію виробничих цехів. Виробничі ділянки оснащені сучасним і високоефективним обладнанням. Виробництво відповідає національним та міжнародним правилам належної виробничої практики GMP.

ЗАТ “Технолог” (Черкаська обл., м. Умань). У м. Умань діє ще одне підприємство, в асортименті продукції якого є медичні ферментні препарати — завод “Технолог”. Підприємство швидко розвивається і пройшло шлях від фасування “in bulk” до сучасного високотехнологічного виробництва. Номенклатура продукції охоплює такі групи, як вітамінні препарати, ферментні препарати, нестероїдні протизапальні засоби, серцево-судинні засоби.

“Технолог” — лідер в Україні з виробництва препаратів із плівковим покриттям, препаратів пролонгованої дії.

Продукція на сайті виробника класифікована за групою дії, за алфавітом, за діючою речовиною, що дає змогу легко виокремити в її спектрі саме ферментні препарати, що належать до групи А — засоби, що впливають на травну систему і метаболізм: Панкреазим, Креазим (діюча речовина панкреатин), Панкреатин, Солізим.

ПрАТ “Біофарма” (м. Київ). Компанія “Біофарма” — це одне з найстаріших підприємств на території сучасної України. Історія підприємства бере свій початок з 1896 р., коли за ініціативою групи лікарів Київського університету Святого Володимира було організовано Товариство боротьби із заразними хворобами. На одному із засідань його члени ухвалили рішення побудувати на околиці Києва, на схилі Байкової гори, бактеріологічний інститут. З 21 жовтня 1896 р. інститут почав свою діяльність.

На базі підприємства уперше був налагоджений випуск протидифтерійної сироватки. Надалі підприємство займалося виготовленням протихолерної, протитифозної, протигонококової та інших вакцин, діагностиків — проти холери, тифу і паратифу, сибірської виразки, а також виробництвом туберкуліну.

Технологічні стадії одержання ферментних препаратів біотехнологічними методами:

1. Допоміжні роботи (підготовка і стерилізація приміщення, персоналу, посуду, поживних середовищ та обладнання).
2. Вирощування посівного матеріалу вихідної культури.
3. Посів і вирощування (культивування) мікроорганізмів (продуцентів ферментів) у ферментаторі (глибинним способом при певному рН, часі і температурі).

Стадії 4, 5 і 6 використовують для виділення позаклітинних ферментів.

4. Відокремлення культуральної рідини від біомаси (центрифугування, сепарування або фільтрування крізь тканини з активованим вугіллям чи перлітом).

5. Співосадження і висолювання баласних речовин з фільтрату (розчином амонію сульфату).

6. Мікрофільтрування і стерильне фільтрування розчину.

Стадії 7, 8 і 9 для виділення внутрішньоклітинних ферментів.

7. Руйнування клітин мікроорганізмів (механічною, гідродинамічною, ультразвуковою дезінтеграцією або ферментативним хімічним лізисом).

8. Екстрагування білків із клітин.

9. Відділення екстракту від клітин (центрифугуванням, сепаруванням, фільтруванням).

10. Очищення та виділення ферментів з розчину культуральної рідини і екстракту зруйнованих клітин (фракціонуванням нейтральними солями, ізоелектричним осадженням, хроматографічними методами).

11. Виготовлення лікарської форми.

12. Фасування та упакування.

Виробництво ферментних препаратів здійснюється двома способами – поверхневим і глибинним. Поверхневий спосіб в основному застосовується для культивування мікроскопічних грибів. В його основі лежить вирощування мікроорганізмів на твердих (рідше рідких), пухких поживних середовищах; при глибинному культивуванні мікроорганізми вирощують в рідких поживних середовищах. У цих умовах можна культивувати як аеробні, так і анаеробні мікроорганізми.

Поверхневий спосіб. Технологічний процес виробництва ферментних препаратів при поверхневому культивуванні мікроорганізмів-продуцентів складається з наступних основних стадій: отримання посівного матеріалу, приготування поживного середовища, вирощування культури мікроорганізму, сушка культури або виділення з культури очищених ферментних препаратів.

Одержання посівного матеріалу. Для промислового отримання ферментних препаратів з мікроорганізмів, вирощених в поверхневих умовах, у якості посівного матеріалу використовують культуру мікроскопічних грибів, вирощену на твердому поживному середовищі, а також спори (конідії) і міцеліальну масу продуцента, вирощеного в глибинних умовах на рідкому поживному середовищі. Для отримання посівної культури на твердому поживному середовищі використовуються зволожені пшеничні висівки. Середовище повинне бути рихлим. З цією метою до пшеничних висівок додають 5-10% деревної тирси або 15-20% солодових паростків. Після стерилізації протягом години при 0,15 МПа вологість поживного середовища повинна становити 35-60 %.

Глибинний спосіб. Даний спосіб вирощування мікроорганізмів має ряд переваг у порівнянні з поверхневим: дозволяє змінювати склад поживного середовища, що забезпечують максимальний вихід того чи іншого ферменту, виключає важкий малопродуктивний ручну працю, спрощує механізацію і автоматизацію різних пристроїв, контролюючих параметри процесу в динаміці.

Процес виробництва ферментних препаратів при глибинному культивуванні складається з наступних технологічних стадій: отримання посівного матеріалу, приготування поживного середовища та його стерилізація, стерилізація повітря, вирощування мікроорганізмів-продуцентів у виробничих ферментаторах, відділення біомаси від культуральної рідини, очищення і виділення ферментів.

Технологічна схема отримання очищених ферментних препаратів при глибинному способі культивування вказана на рис. 1. Вона складається з наступних стадій: отримання посівного матеріалу, підготовка і стерилізація поживного середовища, стерилізація повітря, посівного поживного середовища, культивування мікроорганізмів-продуцентів у ферментаторах, розпилюючих камерах на кюветах або механізованих ростових установках, відділення біомаси від культуральної рідини, екстракція ферментів з культури гриба, вирощеним поверхневим способом на твердому поживному середовищі, концентрування культуральної рідини, стандартизація ферментних препаратів, сушка стандартизованих ферментних розчинів у розпилювальних сушарках.

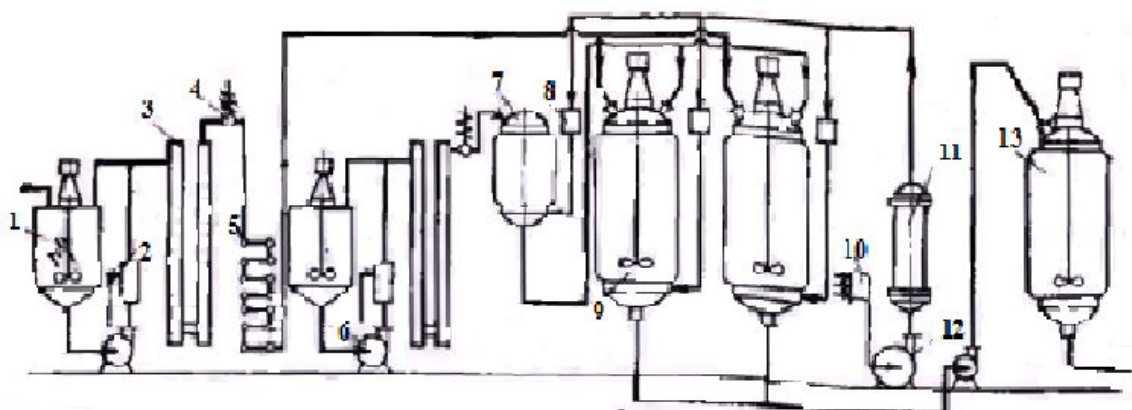


Рис. 18. Технологічна схема вирощування мікроорганізмів глибинним методом

1 – змішувач поживного середовища; 2 – стерилізатор; 3 – витримувач; 4 – редукційний клапан; 5 – теплообмінник; 6 – центробіжний насос; 7 – інокулят (маточник) 8 – індивідуальний повітряний фільтр; 9 – ферментатор; 10 – повітряний фільтр; 11 – загальний повітряний фільтр; 12 – повітродувка; 13 – збірник готової культури.

Найбільш ефективною є противоточна екстракція. В промисловості для екстракції ферментів із поверхневих культур мікроскопічних грибів використовують спеціальні 8-секційні дифузійні батареї Роберта для яких використовується цей принцип (рис. 2).

Всі дифузійні батареї уніфіковані і мають форму вертикального циліндру з відкритою кришкою, що герметично закривається. В процесі роботи всі дифузори заповнені культурою. Кожен із дифузорів ємністю 300л завантажують 54-60 кг культури за абсолютно сухої речовиною (АСР). Вода температурою 25-27°C з невеликою кількістю антисептика (0,02% розчин формаліну) надходить у перший (хвостовий) дифузор. Після його заповнення воду перекривають і масу витримують 30 хв. Потім відновлюють подачу води і рідке середовище з першого дифузора переходить у другий. Масу у другому апараті також витримують 30 хв. Процес продовжується до головного восьмого-дифузора, з якого витяжка збирається в збірник. Отримана витяжка містить 10-12 % СР. Вихід ферментів в екстракт значною мірою залежить від кількості відібраної витяжки по відношенню до культури, що знаходиться в дифузорі. Наприклад, повне вилучення амілолітичних і протеолітичних ферментів з культури *Asp. oryzae* досягається при відборі екстракту не менше 220% до абсолютно сухої маси завантаженої культури, а пектолітичні ферменти з культури гриба *Asp. awamori* – при відборі 350% екстракту до завантажуваної маси. Повнота вилучення амілолітичних ферментів з культури гриба *Asp. awamori* досягається при відборі екстракту 400% до завантаженої культури.

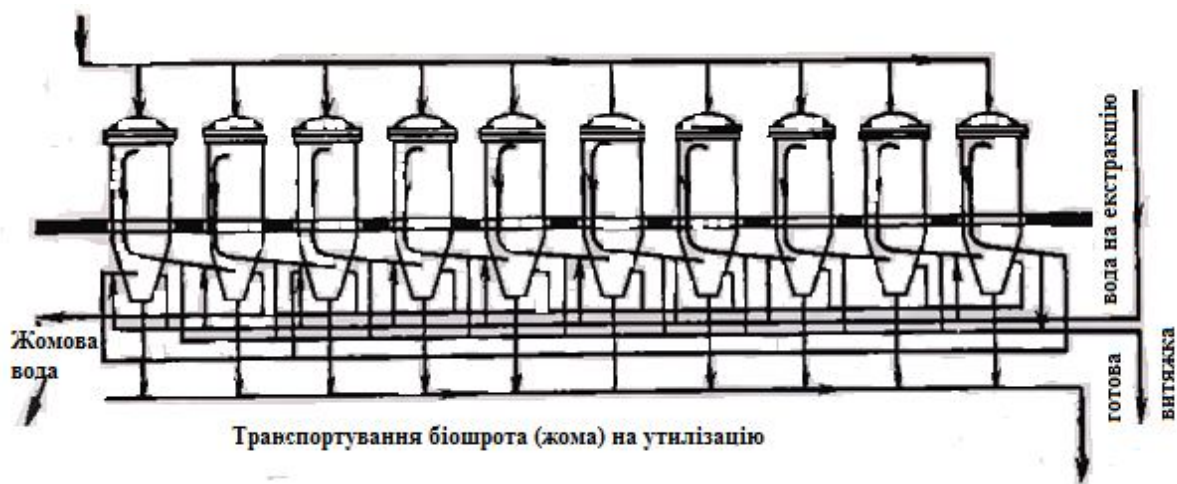


Рис. 19. Дифузійна батарея

Отриману дифузійну витяжку направляють на вакуум-випарну установку, де концентрація сухих речовин підвищується до 50%. Витяжка концентрується у вакуум-випарній установці плівкового типу при температурі випарювання 30-32°C і температурі підігрівання пара 80-85°C. Отриманий препарат у вигляді сиропу стандартизуються хлоридом натрію, так як вміст СР повинен бути не нижче 50%, і направляють споживачу.

Питання для самоконтролю:

1. Перерахуйте українські виробники промислових ферментних препаратів.
2. Які існують сфери використання ферментних препаратів?
3. В чому полягає виробництво медичних ферментних препаратів в Україні?
4. Охарактеризуйте технологічні стадії одержання ферментних препаратів біотехнологічними методами.
5. Якими способами характеризується виробництво ферментних препаратів?
6. Охарактеризувати технологічну схему отримання очищених ферментних препаратів при глибинному способі культивування.

Лабораторна робота № 22

Тема: Промислова технологія отримання ферментів з мікроорганізмів

Мета заняття: ознайомитись з промисловою технологією отримання ферментів з мікроорганізмів

Методичні вказівки:

Технологічна схема отримання очищених ферментних препаратів при глибинному способі культивування вказана на рис. 1. Вона складається з наступних стадій: отримання посівного матеріалу, підготовка і стерилізація поживного середовища, стерилізація повітря, посівного поживного середовища, культивування мікроорганізмів-продуцентів у ферментаторах, розпилюючих камерах на кюветах або механізованих ростових установках, відділення біомаси від культуральної рідини, екстракція ферментів з культури гриба, вирощеним поверхневим способом на твердому поживному середовищі, концентрування культуральної рідини, стандартизація ферментних препаратів, сушка стандартизованих ферментних розчинів у розпилювальних сушарках.

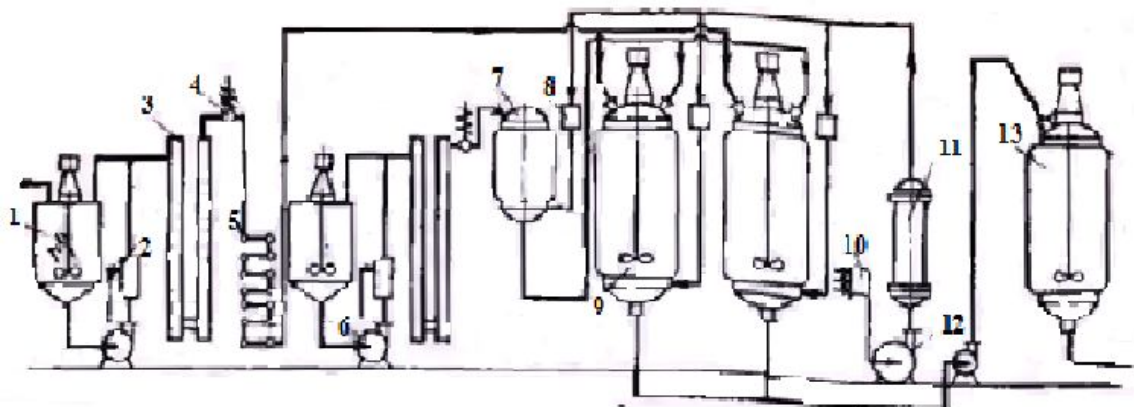


Рис. 20. Технологічна схема вирощування мікроорганізмів глибинним методом

1 – змішувач поживного середовища; 2 – стерилізатор; 3 – витримувач; 4 – редукційний клапан; 5 – теплообмінник; 6 – центробіжний насос; 7 – інокулят (маточник) 8 –індивідуальний повітряний фільтр; 9 – ферментатор; 10 – повітряний фільтр; 11 –

загальний повітряний фільтр; 12 – повітродувка; 13 – збірник готової культури.

Найбільш ефективною є противоточна екстракція. В промисловості для екстракції ферментів із поверхневих культур мікроскопічних грибів використовують спеціальні 8-секційні дифузійні батареї Роберта для яких використовується цей принцип (рис. 21).

Всі дифузійні батареї уніфіковані і мають форму вертикального циліндру з відкритою кришкою, що герметично закривається. В процесі роботи всі дифузори заповнені культурою. Кожен із дифузорів ємністю 300л завантажують 54-60 кг культури за абсолютно сухої речовиною (АСР). Вода температурою 25-27°C з невеликою кількістю антисептика (0,02% розчин формаліну) надходить у перший (хвостовий) дифузор. Після його заповнення воду перекривають і масу витримують 30 хв. Потім відновлюють подачу води і рідке середовище з першого дифузора переходить у другий. Масу у другому апараті також витримують 30 хв. Процес продовжується до головного восьмого-дифузора, з якого витяжка збирається в збірник. Отримана витяжка містить 10-12 % СР. Вихід ферментів в екстракт значною мірою залежить від кількості відібраної витяжки по відношенню до культури, що знаходиться в дифузорі. Наприклад, повне вилучення амілолітичних і протеолітичних ферментів з культури *Asp. oryzae* досягається при відборі екстракту не менше 220% до абсолютно сухої маси завантаженої культури, а пектолітичні ферменти з культури гриба *Asp. awamori* – при відборі 350% екстракту до завантажуваної маси. Повнота вилучення амілолітичних ферментів з культури гриба *Asp. awamori* досягається при відборі екстракту 400% до завантаженої культури.

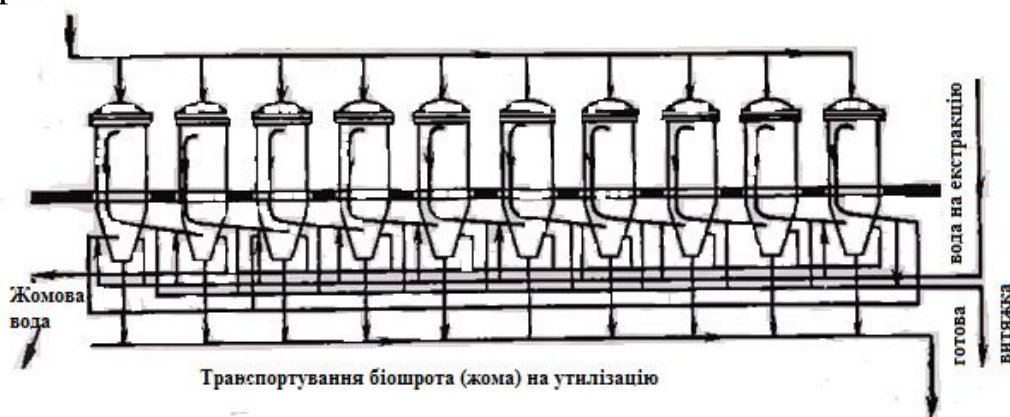


Рис. 21. Дифузійна батарея

Отриману дифузійну витяжку направляють на вакуум-випарну установку, де концентрація сухих речовин підвищується до 50%. Витяжка концентрується у вакуум-випарній установці плівкового типу при температурі випарювання 30-32°C і температурі підігрівання пара 80-85°C. Отриманий препарат у вигляді сиропу стандартизуються хлоридом натрію, так як вміст СР повинен бути не нижче 50%, і направляють споживачу.

При формуванні складу кормових ферментних препаратів враховуються також вид і вік тварин та птиці. У цілому позитивний ефект більшості відомих кормових ферментних препаратів при введенні їх в комбікорми для тварин, птахів полягає в наступному:

1. Руйнування стінок рослинних клітин, завдяки цьому підвищується доступність наявності крохмалю, протеїну і жирів для дії ферментів травного тракту.
2. Підвищення перетравності поживних речовин та поліпшення їх всмоктування в тонкому відділі кишечника.
3. Компенсація дефіциту власних травних ферментів, особливо у молодняку, та в стресових ситуаціях.
4. Поліпшення мікрофлори в тонкому відділі кишечника за рахунок зниження в'язкості хімусу та підвищення рівня моносахаридів.

Перераховані функції кормових ферментних препаратів, супроводжуються зміною наступних виробничих показників у тваринництві:

- 1) Кормова цінність раціонів зростає на 5-10% за рахунок більш повного вилучення поживних речовин і вивільнення енергії при цьому їх засвоюваність підвищується на 6-10%.
- 2) Знижується витрата кормів на одиницю продукції на 5-14%.
- 3) Зростає продуктивність тварин на 5-12%.
- 4) З'являється можливість заміни таких дорогих компонентів кормів як кукурудза та соєвий шрот, більш дешевими (пшениця, ячмінь, овес, жито, соняшкові шроти та макуха) з підвищеним вмістом клітковини, без зниження продуктивності.
- 5) Зменшується кількість і вологість посліду і як наслідок вологість підстилки.
- 6) Поліпшується екологічна ситуація навколишнього середовища за рахунок повного засвоєння азоту та фосфору організмом тварин та зниження викиду цих речовин у навколишнє середовище на 20-40%.

Отже, правильний підбір і використання ферментних препаратів в кормовиробництві дає можливість знизити витрати на годівлю та підвищити продуктивність тварин, при тих же витратах на виробництво.

Питання для самоконтролю:

1. Вказати стадії технології отримання очищених ферментних препаратів при глибинному способі культивування.
2. Від чого залежить вихід ферментів в екстракт?
3. Від чого залежить ефект більшості відомих кормових ферментних препаратів?
4. Які існують зміни виробничих показників у тваринництві?

Лабораторна робота № 23

Тема: Технологічні схеми та обладнання для виробництва пробіотиків

Мета заняття: ознайомитись з технологією отримання пробіотиків та обладнанням для їх отримання

Методичні вказівки:

Пробіотики – це живі мікробіологічні харчові добавки, які уражають шкідливі мікроорганізми, відновлюючи мікробний баланс кишківника.

Пробіотики містять потенційно корисні бактерії або дріжджі, частіше за все молочнокислі бактерії.

Молочнокислі бактерії використовуються в харчовій промисловості протягом багатьох років, тому що вони можуть перетворювати цукор (зокрема лактозу) та інші вуглеводи на молочну кислоту. Це не тільки забезпечує характерний кислий смак молочнокислих продуктів, таких як кефір, але і служить консервантом, знижуючи рН і створюючи менше можливостей для росту інших організмів.

Вперше термін «пробіотики» був запропонований у 1954 році Ф. Вергіо, який проводив порівняння різних сполук, що характеризуються антимікробними й позитивними ефектами на кишкову мікрофлору. Зокрема, вони сприяють розкладу молочного цукру у випадку незасвоєння лактози, профілактиці діареї, підвищенню вмісту у товстій кишці ферментів, які стимулюють імунну систему.

Сухі закваски. Сухі закваски готують на основі бактеріальної маси в захисному середовищі розведенням сухого бактеріального концентрату наповнювачем і висушуванням комбінації культур в захисному середовищі. Сухі закваски, приготовані на основі бактеріальної маси за складом мікрофлори ідентичні сухому бактеріальному концентрату і відрізняються від нього лише за кількістю клітин молочнокислих бактерій. Вони містять приблизно в 100 разів менше бактеріальних клітин, ніж бактеріальний концентрат, через більшу розведення бактеріальної маси захисної середовищем. Знежирене молоко стерилізують, витримують у термостаті для перевірки його на стерильність, після чого контролюють

мікрокопіюванням забарвлених препаратів. Потім у молоко вносять комбінацію культур в кількості 0,5-1,0% і витримують при оптимальній температурі до утворення згустку. Вирощену комбінацію культур в кількості 30% вносять в захисне середовище – водний розчин, що містить сахарозу (10%), трьохзаміщений лимоннокислий натрій (5%), глутамат натрію (2,5%) і желатинозу (5%); суміш добре перемішують, фасують порціями по 1 мл у флакони, заморожують і висушують при сублімаційного сушіння. Режим заморожування і сушіння заквасок аналогічний режимам отримання сухого бактеріального концентрату. Зберігати суху закваску можна не більше 4 міс при температурі 3-8°C з дня вироблення, зокрема 1 міс на підприємстві виготовлювача.

Технологічний процес виробництва сухих заквасок на основі бактеріальної маси не відрізняється від технологічного процесу сухого бактеріального концентрату.

Рідкі закваски. Рідкі закваски готують на стерильному знежиреному молоці або цільному. Технологічний процес приготування рідких заквасок проводять в наступній послідовності. Знежирене чи незбиране молоко стерилізують протягом 10-15 хв при тиску 0,1 МПа, охолоджують до температури $37 \pm 1^\circ\text{C}$ і витримують молоко при цій температурі протягом 2 діб для перевірки на стерильність. Перед закваскою молоко контролюють мікрокопіюванням пофарбованого препарату.

У препараті повинні бути відсутні вегетативні клітини і спори (при перегляді не менш ніж в 10 полях зору мікроскопа). Після цього в молоко вносять комбінацію культур і витримують його при оптимальній температурі розвитку до утворення згустку. Закваску фасують в скляні флакони по 20, 50 і 100 мл, флакони закупорюють і маркують (етикетують). Рідкі закваски мають термін придатності в залежності від температури зберігання: 10 діб при 3-8°C і 5 діб при кімнатній температурі. Характеристика рідкої закваски наведена нижче.

Сухий бактеріальний концентрат. Для виробництва кисломолочних продуктів виробляють сухий бактеріальний концентрат трьох видів: мезофільних молочнокислих стрептококів, термофільних молочнокислих стрептококів і ацидофільних молочнокислих паличок, а також рідкий бактеріальний концентрат мезофільних молочнокислих стрептококів.

Середовищем для нарощування молочнокислих бактерій служить сироватка з додаванням кукурудзяного екстракту (або амінокисотно-мікроелементно-вітамінного комплексу), буферних солей та стимуляторів росту. В якості буферних солей використовують трьохзаміщений лимоннокислий натрій або оцтовокислий натрій. Стимуляторами росту молочнокислих бактерій є сірчанонокислий марганець, аскорбінова кислота, аміак. У живильному середовищі, приготовленому на сироватці, міститься зайва кількість лактози, яка пригнічує ріст молочнокислих бактерій. Для усунення інгібуючої дії в живильне середовище додають певну кількість води. Молочнокислі бактерії розрізняються за потреби до тих чи інших буферних солей і стимуляторів росту, у зв'язку з цим запропоновані різні поживні середовища для нарощування клітин мезофільних молочнокислих стрептококів, термофільних молочнокислих стрептококів і ацидофільних молочнокислих паличок.

Відбір і підготовку молока проводить аналогічно цими операціями при періодичному способі приготування закваски. Перед початком роботи всю лінію піддають ретельній циркуляційній мийці і дезінфекції. Цільне або знежирене молоко стерилізують в потоці при температурі 135°C з витримкою 7–8 сек. Після стерилізації його охолоджують в потоці до оптимальної температури розвитку мікроорганізмів, потім подають через проміжну ємність в перший культиватор, забезпечений мішалкою, датчиком рН і терморегулятором. При заповненні першого культиватора молоком в нього вносять лабораторну закваску. Процес сквашування проводять у два етапи. Після внесення лабораторної закваски молоко ретельно перемішують і залишають у спокої до досягнення рН 5,2, оптимальною для накопичення клітин. У цей період температуру молока підтримують на рівні, оптимальному для росту клітин ($30 \pm 1^\circ\text{C}$), автоматичні регулювання температури води в сорочці культиватора. Для підтримки в першому культиваторі рН на постійному рівні проводять автоматичне регулювання температури води в сорочці культиватора.

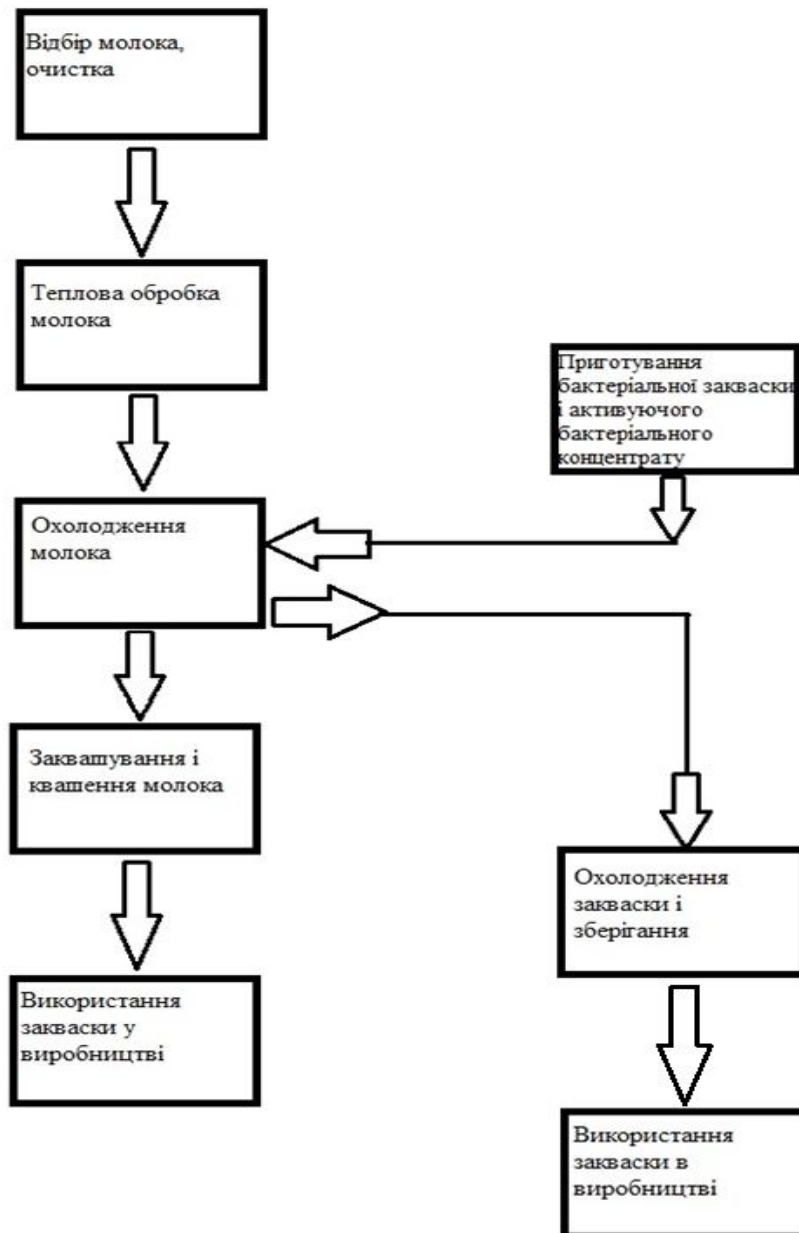


Рис. 22. Отримання виробничої закваски на чистих культурах.

Підсквашене молоко з першого культиватора подається в другій культиватор, який має мішалку, датчик рН, терморегулятор і датчик рівня. У другому культиваторі відбувається процес до сквашування молока при оптимальних значеннях рН (4,7) і температури ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) для утворення згустку в молоці і продуктів життєдіяльності молочнокислих бактерій, що обумовлюють органолептичні показники закваски. Постійну величину рН в другому культиваторі автоматично підтримують шляхом зміни швидкості розведення

досквашуваного молока з проміжної ємності. За допомогою датчика рівня по сигналу здійснюється випуск в приймач готової закваски. Готова закваска має кислотність 70-72°C, чистий кисломолочний смак, ніжний, слабо виражений запах. Консистенція закваски однорідна, без виділення сироватки.

Питання для самоконтролю:

1. Надати загальну характеристику пробіотикам.
2. Надати загальну характеристику сухим закваскам.
3. Охарактеризувати технологічний процес виробництва сухих заквасок.
4. Надати загальну характеристику рідким закваскам.
5. Охарактеризувати технологічний процес виробництва рідких заквасок.
6. Надати загальну характеристику сухому бактеріальному концентрату.
7. Які речовини служать середовищем для нарощування молочнокислих бактерій?
8. Вказати умови стерилізації знежиреного молока.
9. Охарактеризувати технологію отримання виробничої закваски на чистих культурах.

МОДУЛЬ 4

БІОТЕХНОЛОГІЧНА КОНСЕРВАЦІЯ КОРМІВ

Лабораторна робота № 24

Тема: Технологічні схеми та обладнання для виробництва бактеріальних заквасок

Мета заняття: ознайомитись з технологією виробництва бактеріальних заквасок

Методичні вказівки:

Приготування виробничої закваски здійснюють в окремому приміщенні, ізольованому від виробничих цехів і максимально наближеному до цехів – використання заквасок.

Приготування виробничої закваски на чистих культурах і кефірної закваски (грибкової та виробничої) проводять у двох ізольованих приміщеннях заквасочного відділення. На невеликих підприємствах (до 25 т переробки молока за зміну) допускається приготування заквасок на чистих культурах і кефірної в одному приміщенні.

Для дезінфекції повітря в заквасочних відділеннях повинні бути встановлені бактерицидні лампи.

Приготування виробничої закваски на чистих культурах на стерилізованому молоці проводять також у спеціальних цебрах або бідонах з кришками місткістю від 3 до 20л.

Для стерилізації великої кількості молока рекомендуються шафові автоклави. Охолодження стерилізованого молока, заквашування його та охолодження закваски здійснюють у заквасочнику.

Допускаються охолодження стерилізованого молока в ваннах з проточною водою, заквашування молока в термостатах або термостатній камері, охолодження і зберігання закваски в холодильниках або спеціально виділеній холодильній камері.

Приготування закваски на чистих культурах на пастеризованому молоці, культивування кефірних грибків (приготування грибкової закваски) і приготування виробничої кефірної закваски проводять у спеціальних заквасочниках (ОЗ-12, ОЗ-40, ОЗУ-300, ОЗУ-600) або в пастеризаційних ваннах (ВДП-300 і Г6-ОПА-600). При необхідності

грибкову закваску готують в вершководозріваючих резервуарах місткістю 1т.

Для отримання великої кількості виробничої закваски на чистих культурах та виробничої кефірної закваски її готують в резервуарах (вершководозріваючих або для кисломолочних продуктів) місткістю до 6 т. При цьому в заквашувальному відділенні встановлюють трубчасту установку для пастеризації молока, для охолодження молока і закваски (за необхідності) – трубчастий охолоджувач або пластинчастий охолоджувач для кисломолочних продуктів.

Посуд та інвентар, використовувані для приготування закваски, миють і дезінфікують в окремому приміщенні заквасочного відділення. Тара та інвентар заквасочного відділення повинні бути промаркеровані, забороняється їх використовувати для інших цілей. Миття обладнання, тари та інвентарю здійснюють відповідно до інструкції з санітарної обробки обладнання на підприємствах молочної промисловості.

Для дезінфекції використовують розчин дезінфектанту, що містить 150-200 мг/л активного хлору (з подальшим обполіскуванням питною водою або пропарюванням): дрібний інвентар та посуд стерилізують в автоклаві або сушильній шафі.

При виробленні закваски у великих ємностях звертають особливу увагу на мийку та дезінфекцію обладнання (резервуарів, пастеризаційно-охолоджувальних установок, насосів, трубопроводів, кранів) і контроль за якістю дезінфекції обладнання. Для мийки обладнання, що входить до складу лінії з виробництва закваски у великих ємностях, слід керуватися інструкцією по санітарній обробці обладнання на підприємствах молочної промисловості.

При мийці резервуарів миючий розчин циркулює 20-30 хв, періодично їх промивають 0,3-0,5%-вим розчином азотної або сульфатної кислоти протягом 20-30 хв. При мийці установки для теплової обробки молока і заکیلцьованих з нею трубопроводів і насосів час циркуляції миючого розчину збільшують до 45-50 хв, кислоти – до 45-60 хв.

Санітарну обробку окремих вузлів (пастеризатора, охолоджувача, молокопроводу) проводять після пастеризації молока, після охолодження молока й закваски; обробку всієї системи – після закінчення роботи і перед початком роботи. При виконанні всіх операцій приготування закваски суворо дотримуються чистоти.

Особливу увагу слід звертати на дотримання правил особистої гігієни працюючих в цеху.

Спосіб приготування і застосування заквасок. Закваски для кисломолочних продуктів на підприємствах молочної промисловості готують з коров'ячого молока шляхом сквашування його чистими культурами молочнокислих бактерій (іноді з додаванням дріжджів) або природної закваски – кефірними грибками.

Для приготування закваски застосовують молоко коров'яче заготовлене по ДСТУ 13264-70, і сорту і щільністю не менше 1,027 г/см³, без сторонніх, не властивих молоку присмаків і запахів, що не містить інгібуючих речовин. Відібране молоко пропускають через молокоочисник або ретельно фільтрують через ватяний фільтр. При приготуванні закваски на знежиреному молоці незбиране молоко направляють на сепаратор безпосередньо після його миття.

Основними способами теплової обробки молока для приготування заквасок є стерилізація і пастеризація.

Питання для самоконтролю:

1. Яким чином здійснюється приготування виробничої закваски?
2. Що є необхідним в заквасочних відділеннях для дезінфекції повітря?
3. Який розчин використовують для дезінфекції?
4. Охарактеризуйте спосіб приготування і застосування заквасок.
5. За яким ДСТУ відбирають молоко для приготування заквасок?

Лабораторна робота № 25

Тема: Бродильні і окислювальні процеси отримання органічних кислот

Мета заняття: ознайомитися з бродильними та окислювальними процесами отримання органічних кислот

Методичні вказівки:

Органічні кислоти – органічні речовини з кислотними властивостями карбоксильної групи $-\text{COOH}$. Сульфокислоти, що містять групу OSO_3H , є досить сильними кислотами. Відносна стабільність приєднаної основи кислоти визначає її кислотність. Інші групи також можуть надавати кислотні властивості, зазвичай слабкіші, наприклад $-\text{OH}$, $-\text{SH}$, енольна і фенольна групи. В біологічних системах органічні кислоти, що містять тільки ці групи, зазвичай кислотами не вважаються.

Органічні кислоти - багатоосновні оксикислоти, що містяться в клітинному соку рослин у вільному стані і у вигляді солей або ефірів. У плодах переважають вільні органічні кислоти, а в інших органах рослин - пов'язані форми. Виявлено яблучна, лимонна, щавлева, винна, саліцилова, хінна, бензойна, валеріанова, бурштинова, кадова і інші кислоти.

Багато органічних кислот, знаходиться в плодово-ягідних рослинах: винограді, айві, груші, агрус, журавлині, ожині, аличі, вишні, терні, малині, абрикосах, яблуках, смородині чорної, брусниці, ряді цитрусових. Домінують у більшості плодових рослин яблучна, лимонна, винна, саліцилова і щавлева кислоти. Брусниця і журавлина багаті бензойної кислотою.

Органічні кислоти володіють широким спектром фармакологічних властивостей і біологічної дії на організм людини. Вони беруть участь в обміні речовин - є сполучною ланкою між обміном вуглеводів, білків і жирів, підтримують кислотно-лужну рівновагу, активізують секреторну діяльність слинних залоз, збільшують відділення жовчі, шлункового і панкреатичного соків, надають антисептичну дію; показник кислотності рослинних соків в межах 3, 95-5,5.

Відомими прикладами органічних кислот є:

До числа важливих бродильних виробництв (крім гліцерину і етанолу) належить одержання ацетону і бутанолу. Вперше у промисловому масштабі вони були здійснені в Манчестері Вейсманом у ході першої світової війни. Ацетон був необхідний для виробництва кордиту, у важкій артилерії. До початку воєнних дій ацетон низької якості одержували шляхом сухої перегонки деревини, але для згаданих цілей потрібний був високоякісний розчинник.

Бродильний процес (ферментація) був заснований на переробці крохмалю, концентрація якого складала до 3,8%, анаеробними спороутворюючими бактеріями *Clostridium acetobutylicum*. Перетворенню піддавалося до 30% субстрату, у результаті чого одержували суміш розчинників (60% бутанолу, 30% ацетону, 5–10% етанолу, ізопропанол та ін). Інша частина субстрату в ході процесу, представленого на мал. 1, перетворювалася у водень і вуглекислий газ. Оскільки утворювалося багато газів, при великомасштабному виробництві перемішування не потрібно, а головна складність – це гасіння піни. Залежно від штамів, співвідношення продуктів: ацетон - спирт трохи варіювало. Багато мікроорганізмів, які гідролізують крохмаль і здатні утворювати розчинники, можуть також зброджувати мелясу при вмісті цукру в середовищі до 6%. Фактором, що визначає кількість використаного субстрату, виявилася чутливість організмів, що беруть участь у процесі, до бутанолу (близько 1,2%) і ацетону (0,4%). Зараження бродильних сумішей аеробними бактеріями не відбувалося, а головною проблемою була інфекція бактеріофагами. Згодом з'ясувалося, що мікроорганізми, які беруть участь у процесі, можна імунізувати тепловим шоком і шляхом декількох пересівів у присутності бактеріофага. Розчинники відокремлювали від середовища перегонкою.

Наприкінці першої світової війни головну роль стало відігравати виробництво бутанолу: він знайшов застосування при одержанні широкого кола речовин, включаючи пластмаси, пластифікатори і гальмову рідину. Побічний продукт, водень, став використовуватися у виробництві синтетичного метанолу і для гідрогенізації харчових олій; вуглекислий газ або скраплювали, або перетворювали в сухий лід. Тверді речовини відходів містили велику кількість рибофлавіну (вітаміну B2), і їх можна було використовувати як багату білком добавку до кормів.

Після другої світової війни бродильне виробництво цих розчинників, скоротилося, тому що відносна вартість нафтохімічних продуктів у порівнянні з попередніми була нижчою. Виробництво бутанолу шляхом ферментації продовжувалося лише в ПАР. Однак у даний час одержання бутанолу за допомогою ферментації стає усе більш вигідним, і може бути, що методами генетичної інженерії створяться мікроорганізми-продуценти, здатні витримувати високий вміст спиртів у середовищі, застосування їх буде доцільнішим. Головний недолік існуючих штамів – низька стійкість до кінцевих продуктів і відносно низький вихід розчинників.

Серед органічних кислот найважливіша – оцтова. У минулому основну частину оцтової кислоти одержували шляхом мікробіологічного окиснення етанолу, але сьогодні, за винятком виробництва харчового оцту, цей процес з економічних причин не застосовується. Утім, у результаті досліджень термофільних бактерій, здатних перетворювати целюлозу в оцтову кислоту, а також штамів *Acetobacter* і *Clostridium*, здатних синтезувати її з водню і вуглекислого газу, цей метод, можливо відновить свої позиції. Технічна оцтова кислота використовується при виробництві багатьох хімічних речовин, включаючи каучук, пластмаси, волокна й інсектициди. При звичайному способі виробництва мікробіологічна конверсія етанолу в оцтову кислоту при участі штамів *Acetobacter* і *Gluconobacter* йде в аеробних умовах.

Виробництво лимонної кислоти методом ферментації за участю грибів також належить до числа давніх біотехнологічних процесів; воно було налагоджено у 1893 р. Його розвиток йшов у тісному зв'язку з розробкою багатьох фундаментальних аспектів мікробіології. Спочатку основні проблеми були з мікробним забрудненням. У пошуках їхнього рішення виявлено, що процес можна вести при низьких рН, що не позначається на утворенні кислоти грибами. У таких умовах створювати і підтримувати стерильність набагато простіше. За 1–2 тижні ферментації при високих концентраціях цукру в сировині вихід кислоти досягав 60% від теоретичного. Найбільший вихід одержували, коли тим чи іншим способом обмежували ріст міцелію. Початковий варіант процесу ґрунтувався на поверхневій ферментації, але у 1950 р. було освоєне глибинне культивування. Було показано, що стабільний процес глибинної ферментації можливий тільки в тому випадку, якщо він здійснюється в дві стадії: на першій йде ріст міцелію, а на другій (у

безфосфатному середовищі)—утворення лимонної кислоти. За короткий термін були розроблені схеми виробництва, на використанні дешевої вуглеводної сировини: меляси, крохмалю і глюкозного сиропу. Наявність іонів металів у вихідній сировині приводить до різкого падіння виходу; їх видаляють осадженням гексаціаноферратом, або пропусканням через іонообмінні смоли. Для поживного середовища можна використовувати також метанол та інші нижчі спирти.. У 60-х роках для виробництва лимонної кислоти був запропонований новий процес на основі парафінів і штамів *Corynebacterium*, *Arthrobacter* і *Brevibacterium*, але ринкової продукції з його допомогою отримано не було. Вивчалось також утворення лимонної кислоти дріжджами *Candida*. Вони синтезують суміш лимонної та ізолимонної кислот у співвідношенні, що залежить як від генетичних факторів, так і від умов ферментації.

У промисловому виробництві лимонної кислоти в основному використовується *Aspergillus niger*, але застосовується також і *A. wentii*. Процес ферментації дуже складний, тому що лимонна кислота є продуктом первинного метаболізму цих грибів, і будь-яке виділення цієї проміжної сполуки обміну речовин у навколишнє середовище свідчить про сильне порушення метаболізму, що виникає внаслідок його дисбалансу чи генетичних порушень. Ріст грибів звичайно регулюють шляхом зміни складу середовища (P, Mn, Fe, Zn). Субстрат повинний легко засвоюватися; негідролізовані полімери звичайно не використовують, тому що в цьому випадку позаклітинний гідроліз буде лімітувати швидкість усього процесу.

Надпродукція лимонної кислоти є відповідною реакцією на нестачу фосфату у поживному середовищі, але при вираженій нестачі металів, фактором, що лімітує, не обов'язково є фосфат. Роль металів при цьому до кінця ще не зрозуміла. Оптимум рН складає 1,7–2,0; у більш лужному середовищі відбувається більше утворення щавлевої і глюконової кислот. Таким чином, ретельний контроль за культуральним середовищем дозволяє обійти регуляторні системи обміну і створює оптимальні умови для утворення лимонної кислоти.

У промисловому виробництві лимонної кислоти застосовується кілька варіантів процесу. Традиційним твердофазним варіантом є процес Коджі; він має багато загального з процесом поверхневої ферментації. Глибинна ферментація з технічної точки зору складніша, ніж поверхнева, але можлива в різних варіантах: періодичному з підживленням і безперервному. Періодична

ферментація використовується при роботі з глюкозовмісними субстратами, а її варіант із підживленням частіше застосовується при переробці меляси. Безперервне культивування, що дає найбільший вихід продукту, також можливо, але застосування цього способу в промисловості в найближчому майбутньому малоймовірно. Для процесу характерно два максимуми швидкості: росту продуцента й утворення продукту.

Наприкінці ферментації масу міцелію відокремлюють фільтруванням і промивають. Потім при $\text{pH} < 3,0$ осаджують () щавлеву кислоту у формі оксалату кальцію. Багатий білком міцелій можна використовувати на корм худобі. Лимонну кислоту осаджують з рідкої фази у формі кальцієвої трьохзаміщеної солі в комплексі з чотирма молекулами води. Осад фільтрують, промивають і вільну кислоту одержують шляхом обробки розчину сірчаною кислотою. Далі її очищають за допомогою активованого вугілля та іонообмінних смол.

У лимонної кислоти приємний кислий смак, вона добре розчинна у воді. Її широко використовують у харчовій, фармацевтичній і косметичній промисловості. Ефіри лимонної кислоти застосовуються у виробництві пластмас. Оскільки лимонна кислота зв'язує метали, її використовують в екологічних цілях. У складі детергентів вона легко руйнується живими організмами, і нею заміняють шкідливі для довкілля фосфати.

Питання для самоконтролю:

1. Надати характеристику органічним кислотам.
2. В яких рослинах знаходиться багато органічних кислот?
3. Перерахуйте відомі приклади органічних кислот.
4. На чому заснований бродильний процес?
5. За яким фактором визначають кількість використаного субстрату?
6. Назвіть найважливішу органічну кислоту.
7. Які мікроорганізми використовують у промисловому виробництві лимонної кислоти?
8. Вкажіть умови ферментації маси міцелію.
9. Охарактеризувати процес коджі.

Лабораторна робота № 26, 27

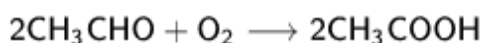
Тема: Технологія отримання оцтової кислоти та пропіонової кислоти

Мета заняття: ознайомитись та вивчити технологію отримання оцтової та пропіонової кислот

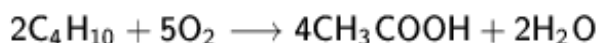
Методичні вказівки:

У промисловості ранніми промисловими методами отримання оцтової кислоти були окислення ацетальдегіду і бутану.

Ацетальдегід окислюється в присутності ацетату марганцю (II) при підвищеній температурі і тиску. Вихід оцтової кислоти становив близько 95% при температурі +50 - +60°C.



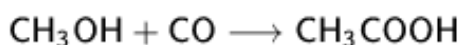
Окислення н-бутану проводилося при 150 атм. Каталізатором цього процесу був ацетат кобальту.



Обидва методи базувалися на окисленні продуктів крекінгу нафти. В результаті підвищення цін на нафту обидва методи стали економічно не вигідними, і були витіснені більш досконаліми каталітичними процесами карбонілювання метанолу.

Каталітичне карбонілювання метанолу

Важливим способом промислового синтезу оцтової кислоти є каталітичне карбонілювання метанолу монооксидом вуглецю, яке відбувається за формальною рівняння:



Реакція карбонілювання метанолу була відкрита вченими фірми BASF в 1913 році. У 1960 році ця компанія запустила перший завод, що виробляє оцтову кислоту цим методом. Каталізатором перетворення служив йодид кобальту. Метод полягав в барботаже монооксиду вуглецю при температурі 180 ° С і тиску 200-700 атм через суміш реагентів. Вихід оцтової кислоти становить 90% по метанолу і 70% по CO. Одна з установок була побудована в Гейсмара (шт. Луїзіана) і довго залишалася єдиним процесом BASF в США.

Удосконалена реакція синтезу оцтової кислоти карбонілюванням метанолу була впроваджена дослідниками фірми Monsanto в 1970 році. Це гомогенний процес, в якому

використовуються солі родію в якості каталізаторів, а також йодид-іони в якості промоторів. Важливою особливістю методу є велика швидкість, а також висока селективність (99% по метанолу і 90% по СО).

Цим способом отримують трохи більше 50% всієї промислової оцтової кислоти.

В процесі фірми ВР в якості каталізаторів використовуються сполуки іридію,

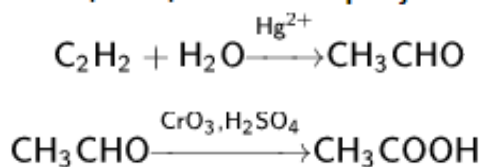
Біохімічний спосіб виробництва

При біохімічному виробництві оцтової кислоти використовується здатність деяких мікроорганізмів окисляти етанол. Цей процес називають оцтовокислим бродінням. В якості сировини використовуються етанолвмісних рідини (вино, заправ соки), або ж просто водний розчин етилового спирту.

Реакція окислення етанолу до оцтової кислоти протікає за участю ферменту алкогольдегідрогенази. Це складний багатоступінчастий процес, який описується формальним рівнянням:



Гідратація ацетилену в присутності ртуті і двовалентних солей ртуті:



Пропіонова кислота – це хімічна речовина, представник одноосновних насичених карбонових кислот. Це кислота, що має неабияке значення для фізіологічних процесів. Свою традиційну назву отримала у зв'язку з тим, що є найменшою кислотою з властивостями жирних. Її солі та ефіри – пропіонати. Перші добре розчиняються в Н₂О і не піддаються розчиненню в розчинниках органічної етимології, другі в Н₂О розчиняються погано, а при поєднанні з орган. розчинниками змішуються.

Цю к-ту продукують бактерії, які населяють кишківник людини. Вироблену для промислових потреб, її застосовують у таких напрямках, як харчопром, фармацевтична галузь, хімія, виготовлення пластмас тощо.

Також можна натрапити на такі назви і позначення цієї речовини: кислота пропанова/метилоцтова, С3, Е280 (консервант).

Про пропіонову кислоту відомо ще з 1844 р., коли вона була вперше отримана (а точніше, виявлена в продуктах розкладання цукру) і описана Й. Готлібом. У наступні роки цю субстанцію різними методами синтезували й інші вчені, не співвідносячи свої відкриття один з одним. Так тривало до 1847 р. В цей час Ж.-Б. Дюма узагальнив усі попередні напрацювання і дав сполуці загальноприйнятту сьогодні назву.

У природному середовищі зазначена кислота присутня в нафті й формується під час вуглеводного бродіння. Промислових же способів синтезу є кілька:

- карбонілування етену при наявності «скелетного нікелю» і води + окислення сформованого в результаті цього пропіональдегіду;
- каталітичне окислення пропаналу за присутності Co/Mn .

Також цей матеріал є побічним продуктом при парофазному окисленні вуглеводнів $\text{C}_4\text{--C}_{10}$. Як варіант – побічний продукт при створенні оцтової кислоти. Хоча більшою популярністю цей метод користувався раніше, сьогодні ж нові способи синтезу $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ витіснили на другий план отримання метилоцтової к-ти таким чином.

Ще ця сполука може бути отримана біоспособом, у ході метаболічного розкладання жирних к-лот, в яких розміщується непарна кількість вуглецевих атомів. Крім того, вона з'являється при розкладанні деяких амінокарбонових кислот. Є також бактерії, у яких продукування C_3 – частина життєдіяльності. Вони присутні в шлунках жуйних, силосі. Не в останню чергу через них швейцарському сиру характерний відомий яскраво виражений аромат.

Питання для самоконтролю:

1. Вказати промислові методи отримання оцтової кислоти.
2. При яких умовах відбувається окислення н-бутанолу?
3. Охарактеризувати каталітичне карбонілювання метанолу.
4. Описати загальну характеристику пропіонової кислоти.
5. Яким чином позначають пропіонову кислоту?
6. Вказати промислові способи синтезу пропіонової кислоти.
7. Ким та коли була вперше описана пропіонова кислота?

ЛІТЕРАТУРА

1. Безбородов А. М. Биотехнология продуктов микробного синтеза: Ферментативный катализ, как альтернатива органического синтеза / А. М. Безбородов – М. : Агропромиздат, 1991. – 238 с.
2. Бекер М. Е. Биотехнология / М. Е. Бекер, Г. К. Лиепиньш, Е. П. Райпулис – М. : Агропромиздат, 1990. – 334 с.
3. Биотехнология микробных ферментов / [А. Г. Лобанок, Н. И. Астапович, Р. В. Михайлова, А. М. Безбородов] – Минск : Наука и техника, 1989. – 204 с.
4. Воробьева Л. И. Промышленная микробиология: учеб. пособие / Л. И. Воробьева – М. : Изд-во МГУ, 1989. – 294 с.
5. Голубев В. Н. Пищевая биотехнология / В. Н. Голубев, И. Н. Жиганов. – М. : Делипринт, 2001. – 123 с.
6. Дехтяр Ю. Ф. Мікробіологічне виробництво кормів та кормових добавок : курс лекцій з дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» спеціальності 162 “Біотехнологія та біоінженерія” денної форми навчання / Ю. Ф. Дехтяр. – Миколаїв : МНАУ, 2017. – 99 с.
7. Егоров Н. С. Биотехнология : микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов : учеб. пособие для вузов. / Н. С. Егоров, В. Д. Самуилов. – М. : Высшая школа, 1997. – 143 с.
8. Машины и аппараты пищевых производств : учебник для вузов / [С. Т. Антипов, И. Т. Кретов, А. Н. Остриков и др.]; под ред. В. А. Панфилова. – М. : Высшая школа, 2001. – 704 с.
9. Неверова О. А. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения / О. А. Неверова, Г. А. Гореликова, В. М. Позняковский. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2007. – 415 с.
10. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: підручник / Т. П. Пирог – К. : НУХТ, 2004. – 471 с.
11. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія: підручник / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. – К. : НУХТ, 2009. – 336 с.
12. Промышленная микробиология : учеб. пособие для вузов / [З. А. Аркадьева, А. М. Безбородов, И. Н. Блохина и др.]; под ред. Н. С. Егорова. – М. : Высшая школа, 1989. – 688 с.
13. Сельскохозяйственная биотехнология / [В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. З. Кочиева и др.]; под ред. В. С. Шевелухи. - [3-е изд., перераб. и доп.] – М. : Высшая школа, 2008. – 710 с.
14. Современная микробиология. Прокариоты / Под ред. И. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М. : Мир, 2005. – Т. 1. – 654 с.

Навчальне видання

МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ВИРОБНИЦТВО КОРМІВ ТА
КОРМОВИХ ДОБАВОК

Методичні рекомендації

Укладач: **Кравченко** Олена Олександрівна

Формат 60×84.1/16. Ум. друк. арк. 6,6

Тираж __ прим. Зам № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

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