

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ВИРОБНИЦТВО КОРМІВ
ТА КОРМОВИХ ДОБАВОК**

Курс лекцій

для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП
«Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та
біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти

Миколаїв
2025

УДК 579.64:636.085

М59

Рекомендовано до друку рішенням науково-методичної комісії факультету ТВППТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 16.04.2025 р., протокол № 8

Укладачі:

- О. І. Каратєєва – канд. с.-г. наук, доцентка, доцентка кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет.
- І. М. Люта – асистентка кафедри біотехнології та біоінженерії, Миколаївський національний аграрний університет.

Рецензенти:

- С. І. Луговий – д-р с.-г. наук, професор, завідувач кафедри виробництва продукції тваринництва, Миколаївський національний аграрний університет
- С. П. Кот – канд. вет. наук, доцент, доцент кафедри ветеринарної медицини та гігієни, Миколаївський національний аграрний університет.

Мікробіологічне виробництво кормів та кормових добавок : курс лекцій з дисципліни для здобувачів вищої освіти ступеня «бакалавр» спеціальності 162 “Біотехнологія та біоінженерія” денної форми навчання / уклад. : О. І. Каратєєва, І. М. Люта. – Миколаїв : МНАУ, 2025. – 115 с.

У курсі лекцій викладено зміст дисципліни «Мікробіологічне виробництво кормів та кормових добавок» – науки яка 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.

УДК 579.64:636.085

Зміст

Тема 1. Наукові основи та основні елементи біотехнології	4
Тема 2. Мікробіологічне виробництво білка на торфі, зерно-картопляній і мелясній барді	11
Тема 3. Мікробіологічне виробництво амінокислот	24
Тема 4. Виробництво кормових ліпідів	38
Тема 5. Технологічні особливості культивування мікроорганізмів продуцентів ліпідів	45
Тема 6. Виробництво пробіотиків	54
Тема 7. Отримання та використання бактеріальних заквасок	60
Тема 8. Виробництво ферментних препаратів	72
Тема 9. Мікробіологічний синтез вітаміну B ₁₂	84
Тема 10. Виробництво органічних кислот	92
Тема 11. Мікробіологічне виробництво кормових антибіотиків	100
Список використаної літератури	112

Тема 1

Наукові основи та основні елементи біотехнології

План

1. Мета і задачі дисципліни.
2. Наукові основи біотехнології.
3. Основні стадії біотехнологічного процесу.

1. Мета і задачі дисципліни

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.

Основна мета дисципліни – формування у студентів системи теоретичних і практичних знань щодо отримання промисловим способом цінних продуктів життєдіяльності мікроорганізмів, їх біомаси, отримання корисних речовин (препаратів), що використовуються в годівлі тварин.

В результаті вивчення дисципліни *студент повинен знати:*

- історію, сутність, значення, проблеми і перспективи розвитку мікробіологічного виробництва кормів та кормових добавок;
- типову схему біотехнологічного виробництва, способи культивування продуцентів;
- принципи біосинтезу ферментних, бактеріальних препаратів і антибіотиків;
- промислове використання мікроорганізмів (застосування мікроорганізмів-продуцентів для отримання білкових препаратів, амінокислот, вітамінів та ферментних препаратів);
- технологію приготування живильних середовищ для різноманітних промислових штамів мікроорганізмів.

Студент повинен вміти:

- користуватися основною, додатковою та довідковою літературою з питань мікробіологічного виробництва кормів та кормових добавок, термінами біотехнології;
- отримувати посівний матеріал з чистих культур мікроорганізмів;
- вирощувати культури мікроорганізмів в колбах і ферментерах, контролювати ферментну активність мікроорганізмів – продуцентів;

- проводити селекцію активних штамів продуцентів,
- складати типову схему біотехнологічного виробництва;
- керувати процесами культивування мікроорганізмів у промислових умовах шляхом збирання, опрацювання і аналізу інформації, експериментального освоєння методів роботи з різними промисловими мікроорганізмами в умовах лабораторії та під час навчальних практик в науково-дослідних установах та біохімічних підприємствах.

2. Наукові основи біотехнології

Розвиток і перетворення біотехнології обумовлено глибокими змінами, що відбулися в біології протягом останніх 25-30 років. Основу цих подій склали нові уявлення в області спадковості та методичні удосконалення, які наблизили людство до пізнання перетворень її матеріального субстрату і проклали дорогу новітнім промисловим процесам. Крім цього, ряд найважливіших відкриттів в інших областях також вплинув на розвиток біотехнології.

Генетична інженерія існує трохи більше 25 років. Вона блискуче розкрила свої можливості в області прокаріотів. Однак нові технології, застосовувані до вищих рослин і тварин, поки не такі значні. Спроби застосування прийомів генетичної інженерії до вищих рослин і тварин стикаються з величезними труднощами, зумовленими як недосконалістю наших знань з генетики еукаріот, так і складністю організації вищих організмів.

Використання наукових досягнень і практичні успіхи біотехнології забезпечуються фундаментальними дослідженнями і реалізується на найвищому рівні сучасної науки. У цьому плані не можна не відзначити дивовижну наукову багатогранність біотехнології: її розвиток і досягнення найтіснішим чином пов'язані і залежать від комплексу знань не тільки наук біологічного профілю, але також і багатьох інших.

Біологічні технології (біотехнології) забезпечують кероване отримання корисних продуктів для різних сфер людської діяльності. Ці технології базуються на використанні каталітичного потенціалу різних біологічних агентів і систем – мікроорганізмів, вірусів, рослинних і тваринних клітин і тканин, а також позаклітинних речовин і компонентів клітин. В даний час розробка й освоєння біотехнології займають важливе місце в діяльності практично всіх країн. Досягнення переваг в біотехнології є одним з центральних завдань в економічній політиці розвинених країн. Лідерами біотехнології вважаються сьогодні США і Японія, що накопичили багаторічний досвід біотехнологій для сільського господарства, фармацевтичної, харчової та хімічної промисловості. Міцне становище у виробництві ферментних препаратів, амінокислот, білка, медикаментів займають країни Західної Європи (Німеччина, Франція, Великобританія). Ці країни характеризуються потужним потенціалом нової техніки і технології, інтенсивними фундаментальними і прикладними дослідженнями в різних областях біотехнології. Визначити сьогодні, що ж таке біотехнологія, вельми

непросто. Разом з тим, сама поява цього терміну в нашому словнику глибоко символічна. Воно відображає думку, що застосування біотехнологічних матеріалів і принципів у найближчі роки радикально змінить багато галузей промисловості і саме людське суспільство. Інтерес до цієї науки і темпи її розвитку в останні роки ростуть дуже швидко.

Людина використовує біотехнологію багато тисяч років: люди займалися пивоварінням, пекли хліб, отримували кисломолочні продукти, застосовували ферментації для отримання лікарських речовин і переробки відходів. Але тільки новітні методи біотехнології, включаючи методи генетичної інженерії, засновані на роботі з рекомбінантними ДНК, призвели до «біотехнологічного буму», свідками якого є ми в даний час. Новітні технології генетичної інженерії дозволяють істотно вдосконалити традиційні біотехнологічні процеси, а також отримувати принципово новими, раніше недоступними способами різноманітні цінні продукти.

Сучасний етап науково-технічного прогресу характеризується революційними змінами в біології, яка стає лідером природознавства. Біологія вийшла на молекулярний та субклітинний рівень, у ній інтенсивно застосовуються методи суміжних наук (фізики, хімії, математики, кібернетики та ін.), системні підходи. Бурхливий розвиток комплексу наук біологічного профілю з розширенням практичної сфери їх застосування обумовлено також соціально-економічними потребами суспільства. Такі актуальні проблеми, що стоять перед людством другої половини ХХ століття, як дефіцит чистої води і харчових речовин (особливо білкових), забруднення навколишнього середовища, брак сировинних і енергетичних ресурсів, необхідність розвитку нових засобів діагностики і лікування, не можуть бути вирішені традиційними методами. Тому виникла гостра необхідність у розробці та впровадженні принципово нових методів і технологій. Велика роль у вирішенні комплексу цих проблем відводиться біотехнології, в рамках якої здійснюється цільове застосування біологічних систем і процесів у різних сферах людської діяльності. У сучасній біотехнології відповідно до специфіки сфер її застосування доцільно виділити в якості самостійних розділів наступні:

- Промислова мікробіологія.
- Медична біотехнологія.
- Технологічна біоенергетика.
- Сільськогосподарська біотехнологія.
- Біогідрометалургія.
- Інженерна ензимологія.
- Клітинна і генетична інженерія.
- Екологічна біотехнологія.

Перспективність і ефективність застосування біотехнологічних процесів у різних сферах людської діяльності, від отримання їжі та напоїв до відтворення екологічно чистих енергоносіїв та нових матеріалів обумовлені їх компактністю і одночасно великомасштабністю, високим рівнем механізації і продуктивності праці. Ці процеси піддаються контролю, регулюванню та автоматизації. Біотехнологічні процеси, на відміну від хімічних, реалізуються в «м'яких» умовах, при нормальному тиску і невисоких температурах

середовища; вони в меншій мірі забруднюють навколишнє середовище відходами і побічними продуктами, мало залежать від кліматичних і погодних умов, не вимагають великих земельних площ, не потребують застосування пестицидів, гербіцидів та інших чужорідних для навколишнього середовища агентів. Тому біотехнологія в цілому та її окремі розділи знаходяться в ряду найбільш пріоритетних напрямів науково-технічного прогресу і є яскравим прикладом «високих технологій», з якими пов'язують перспективи розвитку багатьох виробництв. Біологічні технології знаходяться в даний час в фазі бурхливого розвитку, але рівень їх розвитку в цілому визначається науково-технічним потенціалом країни. Всі високорозвинені країни світу відносять біотехнологію до однієї з найважливіших сучасних галузей, вважаючи її ключовим методом реконструкції промисловості відповідно до потреб часу, і вживають заходів зі стимулювання її розвитку.

Біотехнологічні процеси багатогранні за своїм історичним корінням і за своєю структурою, вони об'єднують елементи фундаментальних наук, а також ряду прикладних галузей, таких як хімічна технологія, машинобудування, економіка. Наукова багатогранність біотехнології в цілому та її розділи, що мають на меті вирішення природоохоронних завдань, дивовижна: вона використовує досягнення наук біологічного циклу, які вивчають надорганізмний рівень (екологія), біологічні організми (мікробіологія, мікологія), суборганізмні структури (молекулярна біологія, генетика). Через біологію на біотехнологію впливають хімія, фізика, математика, кібернетика, механіка. Сучасні біотехнології також гостро потребують науково обґрунтованої опрацьованої технології та апаратурного оформлення. Тому необхідний органічний зв'язок з технічними науками – машинобудуванням, електронікою, автоматикою.

Найважливішим завданням будь-якого біотехнологічного процесу є розробка та оптимізація науково-обґрунтованої технології та апаратури для нього. При організації біотехнологічних виробництв частково був запозичений досвід розвиненої на той час хімічної технології. Однак біотехнологічні процеси мають істотну відмінність від хімічних в силу того, що в біотехнології використовують більш складну організацію матерії – біологічну. Кожен біологічний об'єкт (клітка, фермент та інш.) це автономна саморегулююча система. Природа біологічних процесів складна і далеко не з'ясована остаточно. Для мікробних популяцій, наприклад, характерна істотна гетерогенність за рядом ознак – вік, фізіологічна активність, стійкість до впливу несприятливих факторів середовища. Вони також схильні до випадкових мутацій, частота яких становить від 10^{-4} до 10^{-8} . Гетерогенність також може бути обумовлена наявністю поверхонь розділу фаз і неоднорідністю умов середовища.

3. Основні стадії біотехнологічного процесу

У загальному вигляді будь-який біотехнологічний процес включає три основні стадії: предферментаційну, ферментаційну і постферментційну.

На предферментаційній стадії здійснюють зберігання та підготовку

культури продуцента (інокулята), отримання та підготовку поживних субстратів і середовищ, ферментаційної апаратури, технологічної та рециркулюємої води і повітря. Підтримання та підготовка чистої культури є дуже важливим моментом предферментаційної стадії, оскільки продуцент, його фізіолого-біохімічні властивості і характеристики визначають ефективність всього біотехнологічного процесу. У відділенні чистої культури здійснюють зберігання виробничих штамів і забезпечують їх реактивацію і напращування інокуляту в кількостях, необхідних для початку процесу. При вирощуванні посівних доз інокулята застосовують принцип масштабування, тобто проводять послідовне нарощування біомаси продуцента в колбах, бутлях, далі в серії ферментерів. Кожен наступний етап даного процесу відрізняється за обсягом від попереднього зазвичай на порядок. Отриманий інокулят по стерильній посівній лінії направляється далі в апарат, в якому реалізується ферментаційна стадія. Приготування поживних середовищ здійснюється в спеціальних реакторах, обладнаних мішалками. Залежно від розчинності і сумісності компонентів середовищ можуть бути застосовані окремі реактори. Технологія приготування середовищ значно ускладнюється, якщо до їх складу входять нерозчинні компоненти. У різних біотехнологічних процесах застосовуються різні за походженням і кількістю субстрати, тому процес їх приготування варіюється. Дозування поживних компонентів здійснюється індивідуально на кожному виробництві відповідно до технологічного регламенту конкретного процесу. В якості дозуючого обладнання при цьому застосовуються вагові та об'ємні пристрої, що використовуються в харчовій та хімічній промисловості. Транспорт речовин здійснюється насосами, стрічковими і шнековими транспортерами. Сипучі компоненти подають в ферментери за допомогою вакуумних насосів. Часто застосовують принцип попередніх сумішей, тобто солі попередньо розчиняють і потім транспортують по трубопроводах, дозуючи їх подачу за об'ємом. В силу виняткового різноманіття біотехнологічних процесів і застосовуваних для їх реалізації середовищ, методів і апаратури розгляд даних елементів далі буде пов'язано з конкретними біотехнологічними виробництвами.

Стадія ферментації є основною стадією в біотехнологічному процесі, оскільки під час неї відбувається взаємодія продуцента з субстратом і утворення цільових продуктів (біомас, ендо- та екзопродуктів). Ця стадія здійснюється в біохімічному реакторі (ферментері) і може бути організована в залежності від особливостей використовуваного продуцента і вимог до типу і якості кінцевого продукту різними способами. Ферментація може проходити в суворо асептичних умовах і без дотримання правил стерильності (так звана незахищена ферментація); на рідких і на твердих середовищах; анаеробно і аеробно. Аеробна ферментація, в свою чергу, може протікати поверхнево або глибинно (у всій товщі живильного середовища).

Культитивування біологічних об'єктів може здійснюватися в періодичному і проточному режимах, напівбезперервно з підживленням субстрату. При періодичному способі культивування ферментер заповнюється вихідним поживним середовищем і інокулятом мікроорганізмів ($X_0 + S_0$).

Протягом певного періоду часу в апараті відбувається взаємодія мікроорганізмів і субстрату, що супроводжується утворенням в культурі продукту ($X + S \rightarrow P$).

Біохімічні перетворення в цьому апараті тривають від десятків годин до декількох діб. Регуляція умов всередині ферментера – найважливіше завдання періодичного культивування мікроорганізмів. У ході періодичної ферментації вирощується культура проходить ряд послідовних стадій: лаг-фазу, експоненційну, уповільнення зростання, стаціонарну і відмирання. При цьому відбуваються суттєві зміни фізіологічного стану біооб'єкту, а також ряду параметрів середовища. Цільові продукти утворюються в експоненційній (первинні метаболіти – ферменти, амінокислоти, вітаміни) та стаціонарній (вторинні метаболіти – антибіотики) фазах, тому в залежності від цілей біотехнологічного процесу в сучасних промислових процесах застосовують принцип диференційованих режимів культивування. У результаті цього створюються умови для максимальної продукції того чи іншого цільового продукту. Періодично ферментер спорожняють, проводять виділення та очищення продукту, і починається новий цикл.

Безперервний процес культивування мікроорганізмів має істотні переваги перед періодичним. Безперервна ферментація здійснюється в умовах сталого режиму, коли мікробна популяція і її продукти найбільш однорідні. Застосування безперервних процесів ферментації створює умови для ефективного регулювання та управління процесами біосинтезу. Системи безперервної ферментації можуть бути організовані за принципом повного витіснення або повного змішування.

Перший приклад – так звана тубулярна культура. Процес ферментації здійснюється в довгій трубі, в яку з одного кінця безперервно надходять поживні компоненти та інокулят, а з іншого з тією ж швидкістю витікає культуральна рідина. Дана система проточної ферментації гетерогенна.

При безперервній ферментації у ферментерах повного змішування (гомогенно-проточний спосіб) у всій масі ферментаційного апарату створюються однакові умови. Застосування таких систем ферментації дозволяє ефективно керувати окремими стадіями, а також усім біотехнологічним процесом і стабілізувати продуцент в практично будь-якому необхідному експериментатору або біотехнологу стані. Керування подібними установками здійснюється двома способами.

Забезпечення процесу ферментації з точки зору інженерної реалізації зводиться до дозованого надходження в ферментер потоків (інокулята, повітря (або газових сумішей), поживних біогенів, піногасників) і відведення з нього тепла, відпрацьованого повітря, культуральної рідини, а також вимірюванню і стабілізації основних параметрів процесу на рівні, необхідному для оптимального розвитку продуцента і утворення цільового продукту. У ході ферментації утворюються складні суміші, що містить клітини, позаклітинні метаболіти, залишкові концентрації вихідного субстрату. При цьому цільові продукти, як правило, знаходяться в цій суміші в невеликих концентраціях, а багато з них легко руйнуються. Все це накладає суттєві обмеження на методи виділення та сушіння біологічних препаратів.

Постферментаційна стадія забезпечує отримання готової товарної продукції і також, що не менш важливо, знешкодження відходів і побічних продуктів. В залежності від локалізації кінцевого продукту (клітина чи культуральна рідина) і його природи на постферментаційній стадії застосовують різну апаратуру і методи виділення та очищення. Найбільш трудомістким є виділення продукту, що накопичується в клітинах. Першим етапом постферментаційної стадії є фракціонування культуральної рідини і відділення зваженої фази – біомаси. Найбільш поширений для цих цілей метод – сепарація, здійснювана в спеціальних апаратах – сепараторах, які працюють за різними схемами в залежності від властивостей оброблюваної культуральної рідини. Основні проблеми виникають при необхідності виділення дрібнозважених часток з розміром 0,5-1,0 мкм і менше (бактеріальні клітини) і необхідністю переробки великих об'ємів рідини (виробництво кормового білка, ряду амінокислот). Для підвищення ефективності процесу сепарації застосовують попередню спеціальну обробку культури – зміна рН, нагрівання, додавання хімічних агентів. Для збільшення термінів придатності біотехнологічних продуктів проводять їх зневоднення і стабілізацію. В залежності від властивостей продукту застосовують різні методи висушування. Сушка термостабільних препаратів здійснюється на підносах, стрічковому конвеєрі, а також в киплячому шарі. Особливо чутливі до нагрівання препарати висушують у вакуум-сушильних шафах при зниженому тиску і температурі і в розпилювальних сушарках. До стабілізації властивостей біотехнологічних продуктів веде додавання в якості наповнювачів різних речовин. Для стабілізації кормового білка застосовують пшеничні висівки, кукурудзяне борошно, що володіють додатковою поживною цінністю. Для стабілізації ферментних препаратів використовують гліцерин і вуглеводи, які перешкоджають денатурації ферментів, а також неорганічні іони кобальту, магнію, натрію, антибіотики та ін.

Тема 2

Мікробіологічне виробництво білка на торфі, зерно-картопляній і м'ясній барді

План

1. Культивування мікроорганізмів на гідролізаті торфу.
2. Культивування мікроорганізмів на зерно-картопляній і м'ясній барді.

1. Культивування мікроорганізмів на гідролізаті торфу

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).

Згідно з даними таблиці 2 при гідролізі легко гідролізованих полісахаридів 2% соляною кислотою розчиняється 41,7-61,2% органічних речовин торфу. При цьому кількість моносахаридів складає тільки 41,6-46,7% від речовин, що перейшли в розчин. Слід зазначити, що 18,9-24,1% від суми

органічних речовин гідролізату складають уронові кислоти, приєднані в молекулі ксилана до основного лінійного ланцюга α -зв'язку в положенні 1 $\rightarrow$ 2. При м'якому гідролізі цей зв'язок рветься і від 76,0 до 81,6% уронових кислот, що містяться в торфі, переходить в розчин.

У торфі є і інші групи органічних сполук, при м'якому гідролізі яких утворюються редуруючі речовини, що наприклад екстрагуються сумішшю спирт-бензол бітуми, при гідролізі яких утворюється до 40-60% розчиненої речовини, половину з яких складають вуглеводи.

До складу гумінових речовин входять легко гідролізовані полісахариди, кількість яких складає 9,9-14,6%. За рахунок гумінових кислот, вміст яких у верхових торфах малої міри розкладання складає 10-20%, при гідролізі утворюється від 1 до 3% розчиненої речовини в перерахунку на абсолютно сухий торф.

Таблиця 2

Встановлення природи речовин

Компонент 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

Азотовмісні речовини торфу, представлені різними класами сполук (нітратами, солями амонію, амініними сполуками, білковими речовинами і т. д.), знаходяться в усіх групах органічних сполук. Зокрема, в пушинцевому торфі із загальним вмістом азоту 1,5% азот розподіляється у групах сполук таким чином (у % від загальної кількості): бітуми 5,6; лігнін і целюлоза (целлолігнін) 13,3; гумінові речовини 81,1. До числа гумінових речовин входять як гумінові кислоти і їх солі, так і можливі комплекси кислот з протеїнами.

Азотовмісні речовини гумінових кислот з основним комплексом органічних сполук торфу пов'язані з різною мірою міцності. Велика частина цих сполук (64-75%) є дуже легко гідролізованими продуктами розпаду білків або амінокислотами, неміцно пов'язаними з гуміновими речовинами.

Торф як сировина для вирощування мікроорганізмів має переваги перед іншими видами сировини, оскільки він містить азот і фосфор в легкозасвоюваній мікроорганізмами формі, тому витрати на введення до складу середовища поживних солей (сірчанокислого амонію і суперфосфату) значно скорочуються і собівартість отримуваних дріжджів знижується.

Способи і особливості гідролізу торфу. Спосіб перколювання гідролізу, що знайшов широке поширення в гідролізній промисловості, непридатний для торфу. Головна причина цього полягає в тому, що торф чинить значний опір рідині, що проходить через нього, що не дозволяє створити необхідну швидкість перколювання. Низький вміст целюлози в торфі не дає помітного підвищення розчиненої речовини зі збільшенням тривалості варіння, а уповільнена швидкість фільтрації призводить до розкладання моносахаридів, що утворилися. Дифузія цукрів при гідролізі усередині частинок торфу протікає дуже повільно, внаслідок чого варильний розчин не насичується цукрами і не вимиває їх з гідролізованої маси.

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 сцежу, 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 %): редуруючі 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, змізнернюють 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	Важко гідролізовані розчинні речовини % від
			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

Як видно з таблиці, при гідролізі торфу гідромодуль кислоти на утворення водорозчинних рідких речовин практично не впливає.

Хімічний склад гідролізату торфу малої міри розкладання, отриманого при гідролізі концентрованою сірчаною кислотою, наступний (у %) :

Органічні речовини	6,0-9,4
Зола	0,03-0,96
Рідкі речовини загальні	3,6-5,54
Моносахариди	1,7-3,9
у тому числі в % до органічних речовин	28,0-45,4
Речовини, що бромуються	0,18-0,42
Колоїдні речовини	2,2-3,4
Азот (у % до азоту торфу)	23,6-52,1
Амінокислоти	0,01-0,03
у тому числі в % до органічних речовин	0,14-0,36
Леткі органічні речовини	0,07-0,11
у тому числі в % до органічних речовин	1,0-1,3
Нелеткі органічні кислоти	0,33-1,35
у тому числі в % до органічних речовин	4,1-16,0
Залізо	0,13-0,18

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.

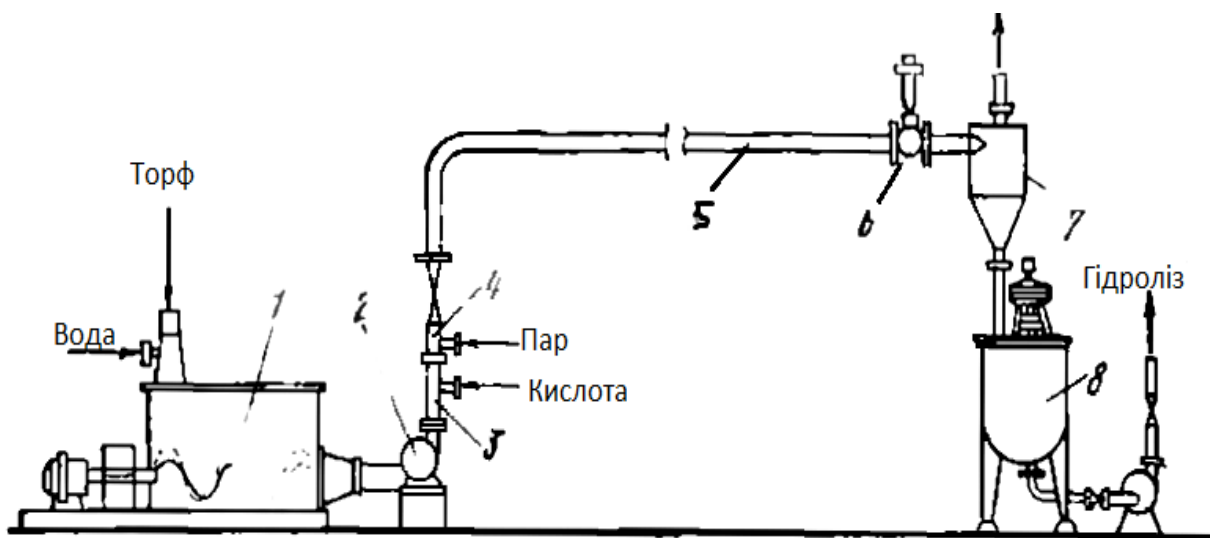


Рис. 1. Схема безперервного гідролізу торфу із застосуванням реактора ідеального витіснення

З цеху гідролізу торфу гідролізат подається у відстійники 27. Розчин після відстоювання поступає у збірку 26, а шлам – у збирач з мішалкою 24, з якого насосами 25 він періодично відкачується на зневоднення. Зі збірника 26 насосом 23 гідролізат безперервно подається в триступінчатий вакуум-апарат, де його температура знижується з 60-65 до 25-30°C. При охолодженні гідролізату з парами самовипаровування частково відганяється фурфурол. З вакуум-апарата гідролізат через пластинчатий теплообмінник і апарат змішувача безперервно подається в головні дріжджоростові апарати 20. У апарат змішувача одночасно подаються вода для розбавлення гідролізату до вмісту розчиненої речовини 1,6–1,8% і розчин, що містить фосфор і калій. У дріжджоростові апарати надходить також посівний матеріал (у пусковий момент або в процесі культивування), автолізат дріжджів з апарату 7 і у разі потреби – аміачна вода. З головних апаратів 20 дріжджова суспензія самоплинно надходить в хвостовий апарат, де завершується процес вирощування дріжджів. Звідси дріжджова суспензія самоплинно надходить в двоступінчатий флотатор 19, з якого післядріжджова брага перекачується в систему очисних споруд, а дріжджова суспензія, розбавлена водою від другого промивання і чистою холодною водою, насосом подається в сепаратори 8 першого промивання. Промивна вода подається на II ступінь флотатора, а дріжджова суспензія, що містить в 1 л близько 400 г вологих пресованих дріжджів, спрямовується у збірник з мішалкою 18. Тут дріжджі розбавляються чистою холодною водою, після чого перекачуються в сепаратори 9 другого промивання. З останніх вода надходить в центральну посудину флотатора, а дріжджова суспензія, що містить в 1 л близько 600 г пресованих дріжджів, – у збірник 17. Промиті дріжджі безперервно подаються через плазмолізатор 16 на випарну установку 10, де вони упарюються під вакуумом в двох послідовно сполучених корпусах до вмісту абсолютно сухих дріжджів близько 25%. З другого корпусу дріжджі надходять у збірник 14, а потім насосом 15 безперервно подаються через розподільний диск в корпус сушарки 12. Сюди ж надходить і повітря, нагріте до 280–300°C в паливному агрегаті 11, в якому спалюється фрезерний торф. Дріжджі, що осіли в сушарному корпусі і циклоні, осередковим вивантажником подаються у бункер 13. Сухі дріжджі фасують в паперові мішки і направляють споживачам.

При культивуванні дріжджів *Candida tropicalis* вихід дріжджів складає 50,0-65,5% від розчиненої речовини, вміст білку – 38,0-47,2%. Кормові дріжджі, вирощені на торф'яних субстратах, перевершують (особливо за вмістом амінокислот) дріжджі, отримані на деревній сировині: вміст білку в них досягає 46-50%, ліпідів – 5,2-5,6, золи – 5,8-7,9%. Вміст амінокислот (у г на 100 г білку) наступний: лізин – 7,5; метіонін – 0,7; аргінін – 9,8; гістидин – 2,8; треонін – 5,5; ізолейцин – 7,5; лейцин – 7,9; фенілаланін – 4,2; аспарагінова кислота – 10,0; глютамінова кислота – 14,0.

2. Культивування мікроорганізмів на зерно-картопляній і мелясній барді

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

Із засвоюваних кормовими дріжджами форм вуглецю в найбільшій кількості у барді є присутніми карбонові кислоти. Склад летких і нелетких карбонових кислот, що переходять у барду з м'яси і іншої сировини та утворюються при спиртовому бродінні, різноманітний: у барді виявлені молочна, оцтова, мурашина, пропіонова, гліколева і інші кислоти. У значно меншій кількості (4-7%) у барді міститься незброджений цукор, включаючи глюкозу, фруктозу, арабінозу, кестозу, рафінозу та ін. Гліцерин і незначні кількості етилового, ізоамілового і деяких інших вищих спиртів залишаються у барді при перегонці браги.

У м'ясній і зерно-картопляній барді в невеликих кількостях є різні форми азоту (розчинний, аміний, аміачний). Хроматографічними методами аналізу у барді виявлені наступні амінокислоти: лейцин, аргінін, валін, гліцин, тирозин, серин, аспарагін, фенілаланін, глутамінова і γ -аміномасляна. Багато з них асимілюється дріжджами. Проте переважаюча доза азотовмісних речовин барди, бетаїн і глутамінова кислота дріжджами не засвоюються.

Загальна кількість вуглецевмісних речовин в 1 м³ м'ясної барди з концентрацією сухих речовин 8–9% коливається в межах 25–30 кг. Співвідношення вуглецевмісних речовин, що засвоюються дріжджами, в м'ясній барді складає, за усередненими даними, наступні величини (у кг/м³):

Карбонові кислоти	12-13
Амінокислоти	2-3
Гліцерин і інші спирти	6-7
Цукри	3-4
Інші речовини	2-3
Карбонові кислоти	25-36
Що редукують цукор	40-45
Глюкоза	56,7
Етиловий спирт	69,0

При використанні різних джерел вуглецю дріжджі накопичують неоднакову кількість біомаси. Вихід повітряно-сухих дріжджів залежить від джерела вуглецю буде наступним (у кг дріжджів на 100 кг джерела вуглецю):

Враховуючи вміст цих джерел вуглецю у барді, практичний вихід дріжджів з вологістю 10% можна прийняти рівним 42-43 кг з 100 кг джерел вуглецю, що відповідає виходу 11-13 кг сухих дріжджів з 1 м³ барди, що містить 8-9% сухих речовин. Нестача у барді легкозасвоюваних форм азоту і фосфору поповнюється поживними солями.

Для підвищення виходу дріжджів у барду, що переробляється і містить відносно невелику кількість джерел вуглецю (це особливо відноситься до мелясної барди), додають додаткові легкозасвоювані вуглецевмісні речовини: бурякоцукрову мелясу, кукурудзяний екстракт, гідрол, ефіро-альдегідні фракції. Проте такі добавки значно підвищують собівартість кормових дріжджів. Економічно вигідним є вирощування дріжджів на суміші барди і гідролізату рослинних відходів.

Післяспиртова барда багата вітамінами, зокрема в мелясній барді виявлені наступні вітаміни (у мг/г) :

Рибофлавін	8
Пантотенова кислота	39
Нікотинова кислота	21
Піридоксин	30
Біотин	1,5
Фолієва кислота	0,3

У значних кількостях у барді є присутніми солі калію, натрію, кальцію, магнію і мікроелементи : залізо, марганець, мідь, цинк, кобальт та ін. Післяспиртова барда має рН 5,2-5,6.

Підготовка сировини для культивування мікроорганізмів. Гаряча післяспиртова барда перед вступом в цех кормових дріжджів додатково стерилізується, звільняється від гіпсу і охолоджується. Стерилізація барди здійснюється 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.

Нестача у барді засвоюваних форм азоту і фосфору заповнюється додаванням поживних солей і мінеральних кислот. Для інтенсивного розмноження дріжджів і забезпечення в дріжджах P₂O₅ 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, які споживаються в процесі культивування. При використанні моногідрата сірчаної кислоти витрата складає 8-10 кг на 1 м³ барди, або 550-650 кг на 1 тонну сухих дріжджів, при використанні соляної кислоти – 7-8 кг/м³, або 450 кг/т з розрахунку на 100%-ну кислоту.

Розчини поживних солей, водний витяг суперфосфату і розчини кислот готують в окремих посудинах і подають в певній кількості до охолодженої барди.

Динаміка споживання поживних речовин барди залежить від початкової концентрації в ній сухих речовин. При використанні нерозбавленої барди (вміст сухих речовин 8-9%) 82-85% сухих речовин залишаються невикористаними, але навіть розбавлення барди в 2 рази підвищує використання сухих речовин середовища тільки на 25%, а 75% сухих речовин залишаються не утилізованими.

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

Спостерігаються відмінності і в швидкості споживання окремих сполук. Наприклад, послідовність споживання низькомолекулярних окси-, моно- і дикарбонових кислот при вирощуванні культур *Candida guilliermondii* і *Rhodotorula utilis* на барді бурякової меляси була наступною: спочатку інтенсивно споживалася оцтова кислота, потім молочна, бурштинова і лише через великий проміжок часу – гліколева. Ці дані свідчать також про неоднакову поживну значущість для мікроорганізмів не лише цілих груп сполук, але і окремих їх складових.

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 вспінюється 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.

Тема 3

Мікробіологічне виробництво амінокислот

План

1. Галузі застосування амінокислот.
2. Продуценти амінокислот.
3. Мікробіологічний спосіб отримання амінокислот.
4. Виробництво лізину мікробіологічним шляхом.
5. Біосинтез лізину.
6. Основні етапи виробництва лізину мікробіологічним шляхом.
7. Апаратурно-технологічна схема отримання препаратів лізину різного ступеня очищення.

1. Галузі застосування амінокислот

Найбільше народногосподарське значення і особливо в тваринництві, мають амінокислоти. Збалансованість кормів за амінокислотним складом є важливим показником повноцінності їх використання тваринами та величини витрати корму на одиницю продукції: збагачення кормів відсутніми незамінними амінокислотами дозволяє знизити витрати кормів в 1,65-2,55 рази.

Однією з найбільш важливих амінокислот є лізин, оскільки багато білків рослин саме цю амінокислоту містять в незначній кількості, а використання і засвоєння білкового азоту пропорційно мінімальному вмісту в ньому лімітуючої незамінної амінокислоти.

В даний час додавання лізину в корми сільськогосподарських тварин здійснюється досить широко. Його використовують для збагачення кормів, призначених для молодняка (свиней, курей, птиці, ВРХ). При цьому збільшується швидкість росту тварин і птиці, поліпшується якість м'яса, у овець покращуються кількість і якість вовни. Лізин використовують і для збагачення прикорму в рибному господарстві.

Інший напрямок використання амінокислот для сільського господарства пов'язаний з отриманням ефективних засобів захисту рослин, які не мають згубних наслідків для навколишнього середовища і не проявляють токсичність по відношенню до теплокровних тварин і людини. Успішна боротьба з бур'янами, шкідниками та хворобами рослин може на $\frac{1}{3}$ підвищити обсяг отримуваної сільськогосподарської продукції, що ставить цю проблему в число найважливіших.

За допомогою амінокислот отримують сполуки, які застосовуються для видалення листя з різних культурних рослин (для цієї мети використовуються *L*- лізин і деякі його попередники).

Крім сільського господарства потребу в лізині і інших амінокислотах має харчова промисловість. Амінокислоти, насамперед лізин, можуть бути використані в якості збагачувача харчових рослинних продуктів для підвищення їх харчової цінності і для збалансування їжі по незамінним

амінокислотам. У Японії ведуться дослідження і отримані позитивні результати по балансуванні харчових продуктів шляхом введення в них *L*-треоніна і *DL*-триптофану, особливо перспективне введення відсутніх амінокислот в дитяче харчування, в дієтичні і спеціальні харчові продукти.

Амінокислоти можуть з успіхом використовуватися не тільки для підвищення поживної цінності харчового продукту, але і як сполуки, що допомагають зняти неприємні або небажані запахи. Лізин, аргінін, гістидин, аланін, пролін, валін, лейцин та деякі інші амінокислоти використовуються як дезодоранти різних харчових продуктів.

У харчовій промисловості амінокислоти можуть бути використані як антиокислювачі. Такими властивостями володіють метіонін, лізин, триптофан, аргінін, аспарагін, ізолейцин. Жири в харчових продуктах прогіркають значно менше, якщо в них додані солі лізин.

Крім харчової промисловості та сільського господарства амінокислоти та їх похідні можуть бути використані при синтезі поверхнево-активних речовин (ПАР), як добавки до моторних палив, при синтезі полімерів, в електрохімії, фотографії, медицині, при отриманні гербіцидів і т. д.

Амінокислоти широко використовуються у фармакології. Для фармацевтичних цілей амінокислоти дуже ретельно очищають, і тому їх вартість значно вища за вартість амінокислот, вироблених для всіх інших цілей.

Можливе використання амінокислот і їх похідних в косметичі. Додавання амінокислот в різні косметичні засоби допомагає підтримувати нормальну функцію шкіри, захищає проти бактерій, тонізує шкіру, підвищує зволожуючий ефект, робить більш нешкідливими барвники для волосся, укріплює і живить волосся, допомагає позбавити волосся від надлишку жиру, покращує якість губної помади, лаку для волосся і т. ін.

Таким чином, навіть короткий огляд можливих шляхів використання амінокислот показує їх велике значення і перспективність використання в багатьох галузях промисловості, в сільському господарстві та медицині.

Однак далеко не всі амінокислоти отримують в світовій практиці в достатній кількості і необхідного рівня очищення. Їх широке застосування призупиняється зараз не стільки малим обсягом виробництва, скільки високою вартістю. Мабуть, здешевлення виробництва амінокислот дозволить різко розширити область їх застосування і збільшити обсяг виробництва.

2. Продуценти амінокислот

Мікробіологічний метод синтезу амінокислот заснований на здатності багатьох мікроорганізмів накопичувати в середовищі значні кількості таких продуктів. Серед мікроорганізмів, які отримали оцінку як потенційні продуценти глютамінової кислоти, виявлено багато бактерій, ряд дріжджів та інших грибів. Більшість обстежених штамів мікроорганізмів незалежно від їх систематичного положення переважно нагромаджують α -аланін і глютамінову 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. 3) і деяким іншим.

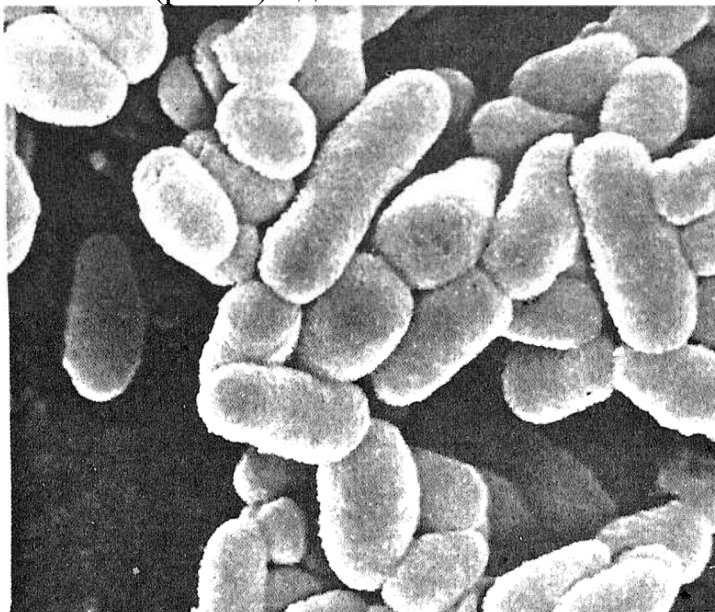


Рис. 3. Продуцент лізину *Brevibacterium* sp.22 (x22000)

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

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

1. Гомосеринові ауксотрофи з відсутньою активністю гомосериндегідрогенази.

2. Треонінові ауксотрофи, у яких пригнічена активність гомосериндегідрогенази.

3. Метіонін і треонінчутливі прототрофні штами *B. flavum*, у яких активність гомосериндегідрогенази знижена в 20–50 разів, але цей фермент забезпечує потреби клітин у гомосерині.

В інституті гентики та селекції промислових мікроорганізмів з допомогою генно – інженерних методів сконструйовані високопродуктивні штами *E. coli*, продуценти *L*-треоніну, *L*-лізину, *L*-триптофану, які активно використовуються у промисловості.

Перспективні штами продуцентів постійно покращуються за допомогою селекції мутантів із зміненою генетичною програмою і регуляторними властивостями. Поширені об'єкти селекції продуцентів – мікроорганізми, що відносяться до родів *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* (табл. 6).

Мікроорганізми - продуценти амінокислот

Амінокислота	Мікроорганізми
Аргінін	<i>E. coli, Bacillus subtilis, Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum, Serratia marcescens</i>
Гістидін	<i>B. flavum, C. glutamicum, S. marcescens</i> , види <i>Streptomyces</i>
Ізолейцин	<i>B. flavum, C. glutamicum, B. Subtilis, S. marcescens</i>
Лейцин	<i>Brevibacterium lactofermentum, S. marcescens, C. glutamicum</i>
Лізін	<i>B. flavum, C. glutamicum</i>
Фенілаланін	<i>B. flavum, C. glutamicum</i>
Пролін	<i>B. flavum</i>
Серин	<i>C. glutamicum</i>
Треонін	<i>B. flavum, C. glutamicum, E. coli, S. marcescens</i>
Триптофан	<i>Micrococcus, Candida utilis, B. subtilis</i>
Тирозин	<i>B. flavum, C. glutamicum</i>
Валін	<i>B. flavum, C. glutamicum</i>

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.

3. Мікробіологічний спосіб отримання амінокислот

Існує три можливих шляхи отримання амінокислот: виділення їх з різних гідролізатів білків, хімічним синтезом та використанням мікроорганізмів, здатних продукувати значні кількості вільних амінокислот.

Очевидною перевагою цього способу є те, що мікроорганізми утворюють амінокислоти в біологічно активній *L*-формі, утворення амінокислот в *L*-формі є рідкісним випадком. Це суттєво полегшує виділення і очищення амінокислот, а також дозволяє отримувати технічні препарати для збагачення кормів сільськогосподарських тварин з низькою (прийнятною для тваринництва) собівартістю.

Амінокислоти за допомогою мікроорганізмів одержують у багатьох країнах. У нашій країні з 1971 р. в промислових масштабах мікробіологічним шляхом отримують тільки *L*-лізін, але ведуться широкі дослідження з отримання за допомогою мікроорганізмів *L*-глутамінової кислоти, *L*-триптофана та інших амінокислот.

Незважаючи на високі темпи розвитку мікробіологічної промисловості, потреба в амінокислотах поки задовольняється лише на 25-30%, і тому в

наступні роки намічається всебічний розвиток цього напрямку і подальше збільшення обсягу виробництва амінокислот шляхом мікробного синтезу.

4. Виробництво лізину мікробіологічним шляхом

У 50-х роках в Японії Кінносіта відкрив вид мікроорганізмів *Micrococcus glutamicus*, його краще було б назвати *Corynebacterium glutamicum*, що володіє здатністю до надсинтезу глутамінової кислоти. Поглиблене вивчення цієї групи мікроорганізмів показало, що при певній спрямованій селекції можна отримати мутанти, що володіють також здатністю до надсинтезу *L*-лізіна. Тому більшість продуцентів *L*-лізину в даний час можна віднести до групи бактерій, званої *Corynebacterium*.

Відомо, що синтез амінокислот в клітині ведеться дуже економно і цілеспрямовано, під контролем спеціальних регулюючих систем. Регуляторний контроль зазвичай здійснюється за принципом зворотнього зв'язку на рівні початкового ферменту або ферментів даного специфічного шляху утворення метаболіту. У разі значного підвищення рівня кінцевого продукту (вданому випадку *L*-лізіна) включається механізм регуляції і один з ферментів в ланцюзі послідовних перетворень блокується, синтез припиняється. Мета цього регулювання – запобігти надмірному утворенню і накопиченню даного метаболіту, потреба в якому в організмі зараз повністю задовольняється. Але така бездоганна логіка синтезу існує лише у мікроорганізмів, що не мають порушень і дефектів в цьому механізмі. В природних умовах такі порушення досить рідкісні, але вони все таки зустрічаються. Наприклад, знайдено чимало природних мікроорганізмів, що володіють здатністю до надмірного синтезу глутамінової кислоти, аланіна, валіна. У той же час таких продуцентів лізину, гомосерину, треоніну і деяких інших амінокислотам в природних умовах знайдено не було. Для отримання промислових продуцентів довелося піти шляхом отримання мутантів, що мають генетичний дефект регуляторного контролю процесу біосинтезу цих амінокислот.

5. Біосинтез лізину

Біосинтез лізину у різних мікроорганізмів протікає по різному. Існує два принципово різних шляхи біосинтезу лізину. Один з них йде, починаючи з 2-кетоглутарової кислоти, через 2-аміноадипінову кислоту. По цьому шляху лізин утворюється в клітинах дріжджів, грибів, актиноміцетів і деяких видів водоростей.

Регуляція біосинтезу *L*-лізину по аміноадипіновому шляху вивчена порівняно мало, але все ж відомо, що вона йде по першому ферменту, що каталізує перетворення 2-кетоглутарової кислоти в гомолимонну кислоту, тому що надлишок лізину в середовищі помітно інгібує утворення гомолимонної кислоти.

Другий шлях (діамінопиміліновий) починається з аспарагінової кислоти і проходить через 2,6-діамінопимілінову кислоту (ДАП).

Такий шлях має місце в бактеріальних клітинах. Ця складна схема утворення *L*-лізину розшифрована при використанні мутантів, дефіцитних за різними ферментами в ланцюзі перетворення аспарагінової кислоти до *L*-лізину.

Цей шлях утворення *L*-лізину був детально вивчений у *E. coli*, а пізніше було показано, що і у основних продуцентів лізину, і у глутаматсинтезуючих бактерій біосинтез йде по діамінопиміліновому шляху.

Аспарагінова кислота під дією ферменту β-аспартаткінази перетворюється в β-фосфоаспартат, а далі в аспартат-3-напівальдегід. Цей проміжний метаболіт дуже важливий, оскільки з нього можуть синтезуватися п'ять амінокислот: лізин, гомосерин, метіонін, треонін і ізолейцин.

При зіставленні системи регуляції біосинтезу лізину по діамінопиміліновому шляху у різних бактерій можна зробити висновок, що вони неоднакові в разі *Brevibacterium flavum* і *Corynebacterium glutamicum* (промислових продуцентів лізину) перший фермент діамінопимілінового шляху β-аспартаткіназа не має системи ізоферментів і не інгібується жодним з кінцевих продуктів, як це має місце у *E. coli*. Інгібування цього ферменту спостерігається тільки при спільній дії двох кінцевих метаболітів: лізину і треоніна. Ця суттєва відмінність і дозволила отримати ауксотрофних мутантів, у яких немає чинників, що перешкоджають надмірному синтезу *L*-лізину.

Аспарагінова кислота при біосинтезі лізину утворюється у глутаматсинтезуючих бактерій за рахунок реакції переамінування, яка здійснюється між щавелево-оцтовою і глутаміновою кислотами.

6. Основні етапи виробництва лізину мікробіологічним шляхом

На відміну від виробництва кормових дріжджів промислове отримання лізину та інших амінокислот здійснюється в суворо асептичних умовах, стерильних поживних середовищах з використанням чистої культури продуцента. Принципова технологічна послідовність процесу отримання лізину наступна:

- 1) приготування посівного матеріалу;
- 2) приготування і стерилізація живильного середовища, всієї апаратури і комунікацій;
- 3) культивування продуцента в промислових ферментерах (ферментація);
- 4) виділення цільового продукту (*L*-лізину).

Приготування посівного матеріалу. Посівна культура продуцента може бути приготована двома способами: періодично і безперервно. В даний час на біохімічних заводах, що випускають лізин, приготування посівної культури переважно ведеться періодичним методом.

Вільна від контамінантів вихідна культура продуцента з чашок Петрі з агаром Хоттінгера пересівається в пробірки з 2%-вим м'ясопептонним агаром і вирощується протягом доби при температурі 29-30°C. На основі цієї культури готують на стерильній воді суспензію щільністю 108 клітин на 1 мл.

Середовище підтитровується 20%-вим розчином NaOH до величини рН 7,0-7,2. Після охолодження середовище в кожній колбі засівається 2-ма мл посівної суспензії та культура вирощується протягом доби на гойдалках (180–200 об/хв) при температурі 29-30°C.

Приготування і стерилізація живильного середовища, апаратів і комунікацій. Живильне середовище для вирощування продуцентів лізину складається з меляси, кукурудзяного екстракту або іншого джерела ростових речовин, крейди та піногасника. Живильне середовище готується і стерилізується у дві стадії з урахуванням властивостей компонентів, що входять до його складу. Стадія підготовки та стерилізація середовища складаються з змішування компонентів живильного середовища у відповідній пропорції за допомогою спеціальних дозаторів в реакторі, розчинення солей при перемішуванні, нагрівання до температури стерилізації, витримки при цій температурі та охолодження до температури, при якій проводиться культивування продуцента лізину.

У виробництві лізину використовується меляса, що містить термолабільний компонент – сахарозу. Тому її стерилізують окремо. У реактор, забезпечений мішалкою, подають мелясу і нагрівають її при постійному розмішуванні до температури 80°C, змішуючи її з водою згідно з наявною рецептурою, потім її швидко розігрівають паром до температури 120-122°C в спеціальному апараті і витримують при цій температурі певний час, необхідний для повної загибелі всієї мікрофлори.

Піногасник часто стерилізується окремо, особливо в тому випадку, коли їм являється масло або жир. Режимы стерилізації (температура і тривалість) при обробці піногасника більш жорсткі, ніж це прийнято для стерилізації будь-яких поживних середовищ.

Процес отримання лізину вимагає строгих асептичних умов, і тому особлива увага приділяється стерилізації не тільки середовища, а й усіх реакторів, комунікацій, тощо. При стерилізації апаратури режими стерилізації залежать головним чином від матеріалу, з якого виготовлені його частини. Найефективніша обробка апаратури і комунікацій – під тиском гострою парою при температурах близько 135-140°C. Але окремі блоки апаратів, у тому числі датчики вимірювальних приладів, не витримують таких умов стерилізації, і тому в цих випадках можуть застосовуватися «холодні» способи стерилізації. Для такої обробки можуть бути використані бактерицидні гази (етилен) і розчини хімічних реагентів.

Ступінь стерильності середовища, обладнання та комунікацій може бути перевірена. Простерилізовані середовища або змиви, вироблені стерильною водою з внутрішніх поверхонь апаратів і трубопроводів, висівають на агаризоване або рідке поживне середовища та інкубують в термостаті добу. Якщо середовища залишаються стерильними, то стерилізація проведена якісно. Такий аналіз проводиться при пуску заводу, у разі виявлення інфекції та періодично в профілактичних цілях.

Культивування продуцента в промислових ферментаторах. Вирощування виробничої культури продуцента лізину здійснюється в переважній більшості випадків періодичним способом в ферментаторах. На

відміну від апаратів, що використовуються при виробництві кормових дріжджів, ці реактори порівняно менших габаритів і мають об'єми 50, 63 і 100 м³. Вони всі призначені для вирощування культури в асептичних умовах із суворим дотриманням герметизації процесу.

Коефіцієнт заповнення апарату 0,65-0,75 в залежності від ступеня піноутворення в даних умовах культивування.

У ферментаторі встановлюють певний режим культивування залежно від особливостей продуцента. Для продуцентів лізину тривалість ферментації 58-72 год.

У першу добу мікроорганізми асимілюють приблизно 25% від загального азоту середовища, вуглеводів і майже всі амінокислоти, накопичується майже вся біомаса. Друга стадія зростання культури супроводжується різким уповільненням накопичення біомаси та найвищими швидкостями біосинтезу лізину. Живильне середовище дуже сильно виснажується, змінюється рН середовища. У цей час доцільно проводити підтитрування середовища 25%-вим розчином аміаку або 15%-вим розчином NaOH з метою стабілізації рН і здійснювати додаткове введення поживних речовин (підживлення). Остання стадія вирощування продуцента лізину характеризується деяким спадом біомаси за рахунок невеликого автолізу клітин і різким зниженням швидкості накопичення лізину.

При періодичному способі культивування продуцента через 58-72 год. концентрація лізину в культуральній рідині досягає 25-40 г/л, біомаси по сухій масі накопичується 10-15 г/л, економічний коефіцієнт по споживанню цукру в перерахунку на лізин складає 25-35%.

Враховуючи, що синтез лізину починається після того, як сформується біомаса продуцента, доцільно проводити процес в трьохступеневої системи апаратів, коли кожен з них працює у своєму режимі й відбір культуральної рідини йде тільки з третього апарата. У цьому випадку можна досягти об'єм лізину до 27–30 г/л (табл. 7).

Таблиця 7

Вихід продукту в залежності від ступеневості системи апаратів

Показники	Ступені (ферментатори)		
	I	II	III
Вміст біомаси, т/л	9,0±0,70	15,4±0,70	13,7±1,10
Концентрація L-лізину у вигляді монохлоргідрату, г/л	5,4±0,50	15,1±1,10	24,7±2,30
Концентрація залишкових цукрів, %	5,6±0,50	3,0±0,30	1,1±0,30
Коефіцієнт розбавлення	0,15	0,10	0,08
Інтенсивність аерації, г O ₂ /(л×год)	4	2	2

Можна підвищити в культуральній рідині вміст лізину, якщо в міру вичерпання вуглеводів і азоту в середовищі додатково вводити в процес невеликі порції поживних речовин. Це призводить до активізації біосинтетичної діяльності мікроорганізмів. На мелясному середовищі при дробовому підживленні вміст лізину може досягати 60 г/л.

Готова культуральна рідина крім лізину містить біомасу продуцента, залишки невикористаних поживних речовин середовища, продукти обміну речовин.

Виділення цільового продукту (L-лізину). В залежності від подальшого призначення препарату можна на основі культуральної рідини отримати технічні препарати у вигляді рідкого концентрату лізину (РКЛ) і сухого кормового концентрату лізину (ККЛ), а також кристалічний лізин. Для кожного з цих продуктів існує своя технологія.

Для кормових цілей доцільніше отримувати технічні препарати РКЛ і ККЛ, так як вони містять окрім лізину значну кількість інших дуже важливих для тваринного організму сполук, зокрема вітаміни та ін.

Рідкий концентрат лізину (РКЛ) добре зберігається протягом 3-4 міс. Вважається, що він володіє більшою біологічною цінністю, ніж сухий ККЛ. Для отримання сухого концентрату (ККЛ) рідкий концентрат висушують на розпилювальних сушарках до вологості 5-6%. Такий концентрат (ККЛ) містить до 15-20% лізину у вигляді монохлоргідрату, близько 15-17% білка, до 14% інших амінокислот, 10-13% бетаїну і близько 20-25% зольних речовин. Але сухий концентрат (ККЛ), що одержаний висушуванням стабілізованої і сконцентрованої культуральної рідини, має недолік, він дуже гігроскопічний (його гігроскопічна точка при 20°C дорівнює 20-22% відносної вологості повітря). Є декілька способів ліквідації цього недоліку. Мабуть, велика гігроскопічність сухого препарату пов'язана з високим вмістом цукрів та органічних кислот. Їх процентний вміст можна знизити, якщо ввести в культуральну рідину наповнювачі, наприклад кісткове борошно, окис кальцію, пшеничні висівки, і разом з ними висушити, тоді виходить сипучий менш гігроскопічний продукт.

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.

7. Апаратно-технологічна схема отримання препаратів лізину різного ступеня очищення

Принципова технологічна схема отримання лізину представлена на рис. 4. Приготування поживного середовища для культивування продуцентів лізину здійснюється у дві стадії. Бурякова меляса готується окремо від інших компонентів середовища. Її розігрівують і транспортують в змішувач 1, де при перемішуванні і розігріванні вона розчиняється в гарячій воді. Поживні солі і всі інші компоненти середовища розчиняються в змішувачі 2, але з таким розрахунком, щоб при подальшому змішуванні цих розчинів отримати необхідні регламентом концентрації компонентів в середовищі.

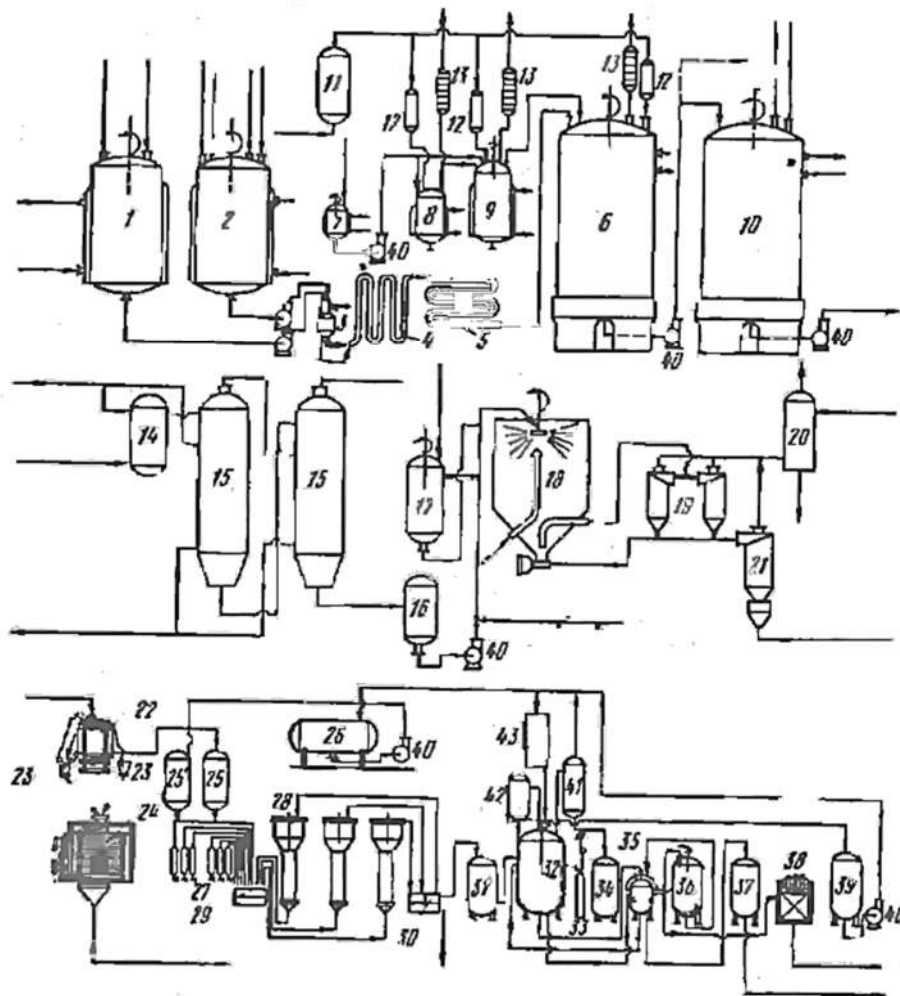


Рис. 4. Апаратно-технологічна схема отримання препаратів лізину різного ступеня очищення

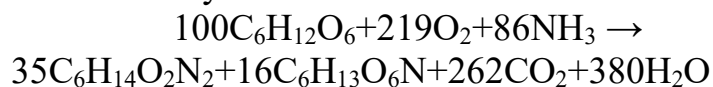
1, 2 – змішувач; 3 – нагрівальна колона; 4 – витримувач; 5 – теплообмінник;
6 – ферментатор; 7 – посівний змішувач; 8, 9 – ступені інокуляторів; 10 – спеціальна ємність; 11 – головний фільтр; 12 – апарат; 13 – повітряний фільтр; 14 – теплообмінник;
15 – випарна установка; 16 – збірник; 17 – змішувач; 18 – розпилювальна сушарка; 19 – циклон; 20 – скрубер; 21 – циклон відвантажувач; 22 – фільтраційна установка; 23 – збірник вологого осаду; 24 – сушарка; 25 – напірний збірник; 26 – цистерни; 27 – ротометр; 28 – іонообмінні колони; 29, 30 – комутатори; 31 – збірник; 32 – випарний апарат; 33 – балон; 34 – збірник; 35 – нутч-фільтр; 36 – кристалізатор; 37 – збірник; 38 – сушильна установка; 39 – збірник; 40 – насос; 41 – холодильник; 42 – збірник; 43 – поглинальна колона;

Потім приготовані суміші надходять в нагрівальну колонку 3, в витримувач 4 і на охолодження в теплообмінник 5. Режими стерилізації для

першої порції і другої різні.. Стерильне охолоджене живильне середовище далі поступає в ферментатор 6, заповнюючи його на 70-75%. Для початку ферментації необхідно ввести в середовище посівний матеріал. Вихідна культура готується в мікробіологічній лабораторії заводу. І якщо приготування посівного матеріалу йде періодично, то після вирощування в качалочних колбах культура передається на першу 8 і потім на другу 9 ступені інокуляторів, де отримують необхідні обсяги посівної культури. Стерилізація живильного середовища здійснюється в самих посівних апаратах, попередня ж гомогенізація середовища здійснюється в спеціальному посівному змішувачі 7, так як в інокуляторах першого ступеня, а часто і в другого немає перемішувачів.

Для здійснення культивування продуцента в посівних апаратах 8 і 9 та в ферментаторі 6 необхідне стерильне повітря. Для цього використовується ціла система фільтрів и кондиціонерів. Повітря забирається з атмосфери, очищується від грубої суспензії в висційному фільтрі поступає в турбокомпресор, де відбувається його стиснення, температура повітря піднімається до 150–160°C; потім повітря охолоджується, відокремлюється конденсат и далі повітря подається в ресивер, що забезпечує рівномірність подачі повітря в ферментатор. Підготоване таким чином повітря надходить в заповнений активованим вугіллем і скловатою головний фільтр 11 і потім – на систему індивідуальних фільтрів. Повітря що відходить від ферментатора перед викидом в атмосферу знову очищується від клітин самого продуцента на повітряних фільтрах 13 з тим, щоб не забруднювати навколишнє середовище. У процесі культивування для піногасіння використовують стерильні піногасники. Подача їх у ферментатори здійснюється автоматично залежно від висоти утвореної піни в апараті 12. У процесі культивування йде накопичення лізину.

Узагальнення виробничих даних по біосинтезу лізину *Brevibacterium sp.* 22 дозволило скласти приблизне сумарне рівняння процесу, яке в загальному вигляді можна записати наступним чином:



З цього виразу випливає, що з кожного моля глюкози можна отримати 0,35 моля лізину, тобто 28% від спожитої в процесі біосинтезу глюкози. Практично з урахуванням того, що отримують нечистий лізин, а монохлоргідрат лізіна, вихід продукту становить біля 35%.

Тривалість культивування залежить від продуцента і умов введення в процес поживних речовин. Якщо процес періодичний, то тривалість трохи перевищує 70-72 год.

Готова культуральна рідина, що містить біомасу продуцента, тверду суспензію середовища і всю суму речовин, може бути використана для отримання трьох продуктів: рідкого концентрату лізину (РКЛ), сухого концентрату кормового лізину (ККЛ) і кристалічного лізину. При отриманні препаратів РКЛ і ККЛ біомаса і тверда суспензія з культуральної рідини не видаляються.

При безпосередньому висушуванні або концентруванні культуральної рідини спостерігаються значні втрати лізину. Тому культуральна рідина піддається стабілізації. Цей процес відбувається в спеціальній ємності 10, куди при перемішуванні подається спочатку 25%-вий розчин бісульфіта натрію в кількості 0,4% до обсягу культуральної рідини, а потім соляна кислота до рН 4,5–5,0. У результаті утворюється монохлоргідрат лізину, більш стійкий до термічного впливу.

Перед випарюванням культуральна рідина підігрівається в теплообміннику 14 до температури 95-100°C і далі надходить в двокорпусну випарну установку 15. Упарена культуральна рідина з вмістом сухих речовин близько 40% надходить у збірник 16 – це і є РКЛ. Рідкий концентрат лізину далі насосом 40 перекачується в спеціальні складські ємності, а краще відразу в авто- і залізо дорожні цистерни і поставляється в тваринницькі комплекси або на комбікормові заводи для збагачення кормів.

Концентрат культуральної рідини може бути висушений безпосередньо в розпилювальній сушарці 18, тоді отримують препарат ККЛ без наповнювача. Культивує рідина потрапляє на розпилювальний диск сушильної башні і розпилюється, найдрібніші краплі зустрічаються з гарячим повітрям, волога миттєво випарюється, а порошок з вологістю 4-8% надходить в циклон-відвантажувач 21. З теплоносієм з сушильної вежі виноситься частина препарату, тому повітря проходить через циклони 19, де відділяється основна маса препарату, який також надходить в циклон-відвантажувач 21. Повітря для додаткового очищення проходить ще через скруббер 20 і тільки після цього викидається в атмосферу. Якщо води, які омивають насадку скруббера, містять помітні кількості лізину, їх можна приєднати до культуральної рідини перед теплообмінником 14.

Щоб зменшити втрати при сушінні розпиленням, а також для зниження гігроскопічності препарату ККЛ в концентрат можна внести наповнювач. Це відбувається в змішувачі 17, а потім отримана маса подається на розпорошення, так само як і в першому випадку, або ж у сушарку будь-якої іншої конструкції. В якості сушильного агента використовується нагріте до 250°C повітря. Отриманий сухий кормовий концентрат лізину фасується в мішок з подвійного крафт-паперу з поліетиленовою прокладкою, герметизується, етикетуються і відправляється на склад готової продукції.

Кристалічний препарат лізину отримують безпосередньо з фільтрату культуральної рідини без її стабілізації. Культуральна рідина з ферментатора 6 надходить на фільтраційну установку 22, де відокремлюються біомаса продуцента і знаходяться в середовищі тверді частинки (крейда), які надходять в збірник вологого осаду 23 і потім висушуються в сушарці 24. Сухий біошрот може бути використаний як КВК збагачуюча добавка в корми сільськогосподарських тварин. Ретельно очищений фільтрат, що має рН приблизно 7, перекачується в напірний збірник 25, а звідти через ротаметри 27, реєструючи швидкість надходження всіх розчинів – в іонообмінні колони 28, заповнені катіонітом КБ-4П-2 в амонійній формі. Лізин збирається на іонітах. Співвідношення висоти шару іоніта до діаметру колонки коливається від 8:1 до 10:1, кожні 100 г іоніту сорбують до 6-8 г лізину. Для сорбції

встановлюється декілька іонообмінних колон. Подача фільтрату культуральної рідини здійснюється з низу колони. Всі входи і виходи в систему іонообмінних колон заблоковані у вигляді комутаторів 29 і 30, що дозволяє раціонально вести управління процесом сорбції. Через колони пропускають фільтрат культуральної рідини до тих пір, поки не з'являються сліди лізину, тоді припиняють подачу фільтрату і промивають колону. Ця вода частково в залежності від вмісту в ній лізину повертається в процес для вилучення з неї лізину. Фільтрат культуральної рідини після сорбції лізину видаляється. Елюація лізину з іонообмінної смоли виробляється розчином аміака, який насосом 40 з цистерни 26 подається у напірну ємність 25. З цього збірника розчин аміака надходить у іонообмінні колонки з лізином і десорбує його. Перші порції елюата, що містять сліди лізину, відкидаються, основна ж кількість елюата надходить у збірник 31. У процесі елюації відбувається перезарядка іонообмінної смоли в амонійну форму, що дозволяє знову використовувати її для сорбції лізину. Елюат з збірника 31 потрапляє в випарний апарат 32, де спочатку звільнюється від аміаку. Випарювання аміаку ведеться при температурі до 80°C. Пари аміаку надходять в холодильник 41, поглинальну колону 43 і збірник 39. У випарний апарат до водного розчину лізину додають з збірника 42 розчин соляної кислоти при постійному помішуванні до рН 4,9. Підкислений елюат випарюють в тому ж апараті під вакуумом, пари конденсують в холодильнику 41 і конденсат збирають у збірнику 34. Потім концентрат в вакуум-випарній апаратурі охолоджують, в результаті чого випадають кристали монохлоргідраталізину. Кашоподібна маса кристалів під тиском стисненого азоту, що надходить з балона 33 передавлюється на нутч-фільтр 35. Відділений на фільтрі фільтрат містить велику кількість лізину і тому поступає знову в апарат 32, де змішується з новою порцією елюата. Якщо лізін призначений для кормових цілей, то він відразу ж з нутч-фільтра 35 надходить на циркуляційну або будь-яку іншу сушильну установку 38 і далі йде на фасування і пакування. Якщо ж отримують кристалічний препарат лізіна для використання в харчовій промисловості, то кристали лізину з нутч-фільтра подають в кристалізатор 36, де їх розчиняють в 3-4 об'ємах води при температурі близько 70°C. Для зняття пігментів розчин лізину в цьому ж апараті обробляється активованим вугіллем і знову передається на нутч-фільтр 35. Фільтрат, звільнений від пігменту, повертається в випарний апарат і випарюється під вакуумом. До очищеного концентрату лізину додається 3-4 кратна кількість етилового спирту, випадають кристали лізину, які у вигляді кашоподібної маси передаються стисненим азотом на нутч-фільтр, де звільняються від спирту, який надходить у збірник 37, а кристали лізину – на сушильну установку 38. Високо очищений кристалічний лізін фасується в поліетиленові пакети, упаковується в картонні коробки і зберігається в сухому приміщенні.

Для продуцента *Corynebacterium glutamicum* пропонується більш простий спосіб отримання кристалічного лізину. Цей спосіб не передбачає відділення з культуральної рідини біомаси, але ставить обов'язковою умовою роботу на світлих середовищах. Культуральна рідина підкислюється сірчаною кислотою, потім проводиться сорбція лізину на сульфокатіоніті КУ-2-8,

сорбат промивають водою і лізин елюїрують аміаком, аміак відділяють випарюванням, концентрат нейтралізують соляною кислотою. Після цього нейтролізат доупарюють і проводять кристалізацію лізіна у вигляді монохлоргідрата, який висушується і розфасовується. Міжкристалева рідина, що містить деяку кількість лізину, повертається на стадію підкислення культуральної рідини сірчаною кислотою.

Тема 4

Виробництво кормових ліпідів

План

- 1. Характеристика ліпідів та їх властивостей.**
- 2. Практичне використання ліпідів.**
- 3. Склад і вміст ліпідів у мікроорганізмах.**
- 4. Продуценти ліпідів.**
- 5. Біосинтез ліпідів.**
- 6. Вплив умов культивування на склад ліпідів.**
- 7. Можливість промислового отримання ліпідів.**
- 8. Технологічний процес отримання ліпідів.**

1. Характеристика ліпідів та їх властивостей

Ліпіди – велика група природних речовин, різноманітних за хімічною структурою і фізико-хімічними властивостями. Загальна властивість ліпідів – здатність розчинятися в ефірі, хлороформі і інших органічних розчинниках (але не у воді).

Ліпіди за будовою можна підрозділити на дві великі групи. 1. Прості ліпіди або нейтральні жири представлені у більшості організмів ацилгліцеридами, тобто гліцериновими ефірами жирних кислот. 2. Складні ліпіди, до яких відносяться ліпіди, що вміщують фосфорну кислоту в моно або диефірному зв'язку, – це фосфоліпіди, до числа яких входять гліцерофосфоліпіди і сфінголіпіди.

До 20-х років нашого століття ліпіди, особливо нейтральні, розглядалися лише як запасний матеріал, який можна без особливого збитку для життєдіяльності організму замінити іншими, рівними по калорійності речовинами. Перший доказ того, що ліпіди містять фізіологічно необхідні для вищих тварин сполуки, отримано в 1926 р. голландськими дослідниками Івансом і Буром. Пізніше було встановлено, що цими сполуками являються поліненасичені жирні кислоти (лінолева, ліноленова, арахідонова) – фізіологічно необхідні для більшості живих організмів (вітамін F).

В клітинах мікроорганізмів ліпіди виконують різноманітні функції. Вони входять у склад таких структур, як клітинна мембрана, мітохондрії, хлоропласти і інші органели. Ліпопротеїнові комплекси відіграють важливу роль в процесах метаболізму. З ними в значній мірі пов'язано активне перенесення різних речовин через мембрану і розповсюдження цих речовин в середині клітини. З вмістом ліпідів багато в чому пов'язані такі властивості організмів, як термотолерантність і термофільність, психрофільність, кислотостійкість, вірулентність, стійкість до іонізуючої радіації та інші ознаки.

Крім того ліпіди можуть виконувати функцію запасних продуктів. До таких відносяться полі- β -гідроксимасляна кислота, отримана багатьма бактеріями, і, зокрема триацилгліцерин, що накопичуються у великих кількостях деякими дріжджами і іншими представниками грибів.

2. Практичне використання ліпідів

Багаточисленними експериментами показано, що дріжджові ліпіди і продукти їх переробки можуть використовуватись в найрізноманітніших галузях народного господарства: в текстильній, керамічній, шкіряній, металооброблювальній (прокат сталевих листів) промисловості. Дріжджові ліпіди можуть бути використані також при виробництві каучуку, гуми, фармацевтичних препаратів, косметики, мила, олив, в процесах флотації руд та інше. Також дріжджові ліпіди можуть знайти велике використання в годівлі сільськогосподарських тварин і птиці. В цьому випадку із схеми виробництва ліпідів виключається процес їх екстракції із клітин – для кормових цілей використовується багата на жир біомаса мікроорганізмів.

Після другої світової війни значне число робіт було направлено на вишукування можливостей отримання мікробних ліпідів для кормових цілей. Шведський дослідник Лундін показав, що багатий фізіологічно необхідними жирними кислотами дріжджовий жир (*Rhodotocula gracilis*) може з успіхом використовуватись крім технічних, але і на харчові потреби. Рацион із 25 г жирних дріжджів може забезпечити організм людини 20 г ліпідів, 6 г білка і багатьма іншими необхідними речовинами, що на 20% задовольняє денну потребу в цих сполуках.

Виробництво мікробного жиру для харчових цілей вже мало місце в Німеччині під час першої світової війни. В якості поживного середовища використовували мелясу і інші цукровмісні субстрати, продуцентом слугував дріжджеподібний гриб *Endomycopsis vernalis*. В їжу використовували багату жиром біомасу, із якої готували пасту, відому під назвою «Свернал» або «Міцета».

Комбінуючи поживні середовища, а також підбираючи продуцент в умовах його культивування, можна отримати ліпіди, за складом що відповідають вимогам різних галузей промисловості і сільського господарства. Наприклад, при годуванні птиці перевага відається ліпідам, що містять до 65-70% ненасичених жирних кислот. Мікробні ліпіди які містять значну кількість жирних кислот з двома подвійними зв'язками, можна використовувати для приготування лаків і фарб, а також для приготування медичних препаратів, які сприяють запобіганню атеросклерозу і тромбозу. Ліпіди з переважанням насичених жирних кислот можна використовувати на виробництво технічних мастил. В перших випадках таким вимогам відповідають ліпіди міцеліальних грибів і дріжджів *Lipomyces lipoferus*, а в іншому – ліпіди *Candida humicola*, вирощених на гідролізатах деревини.

Підсумовуючи сказане, треба відмітити що склад ліпідів в більшій мірі обумовлений систематичним положенням організму – продуцента. В той же час відношення окремих компонентів у складі ліпідів визначається

специфікою сировини що використовується і фізико-хімічними умовами культивування. Ці закономірності ліпідогенеза істотні при організації промислового виробництва мікробного жиру, так як в конкретних умовах дозволяє отримувати продукт строго визначеного складу і властивостей. Такий мікробний синтез може задовольнити потребам, які висуюються до ліпідів різноманітних галузей народного господарства.

3. Склад і вміст ліпідів у мікроорганізмах

Більшість експериментів по впливу джерел вуглецю на синтез ліпідів у дріжджів і мицеліальних 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).

Таблиця 8

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

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.

В той же час концентрація джерела азоту відіграє важливу роль в процесах ліпідоутворення. Пов'язано це зі співвідношенням азоту і вуглецю в середовищі.

Чим це співвідношення вище в сторону вуглецю, тим більше сприятливі умови для біосинтезу ліпідів, і навпаки.

В більшій мірі утворення ліпідів у дріжджовій і інших грибів пов'язано з дихальною активністю клітини. Інгібування процесу дихання призводить до гальмування біосинтезу ліпідів. При недостатній кількості кисню різко сповільнюються процеси утворення триацилгліцеринів, але накопичується значна кількість вільних жирних кислот і фосфоліпідів. При аерації середовища зростає ступінь ненасиченості ліпідів шляхом часткової трансформації олеїнової кислоти в кислоти з двома і трьома подвійними зв'язками.

На процеси біосинтезу ліпідів у мікроорганізмів здійснюють вплив також рН середовища і температура культивування. Так, підвищення рН середовища збільшує вміст в складі дріжджових ліпідів вільних жирних кислот, фосфоліпідів і зменшує вміст триацилгліцеринів. При зниженні рН збільшується загальна ненасиченість ліпідів.

Зниження температури культивування веде до підвищення ступені ненасиченості клітинних 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 ергостерина. Певний вплив на процес ліпідоутворення у дріжджів і інших організмів можуть здійснювати також пара-амінобензойна кислота, інозит піридоксин і інші сполучення.

Із без азотистих мінеральних солей на ліпідоутворення найбільший вплив здійснюють фосфати. Недолік фосфору веде до неповного використання джерел вуглецю, надлишок змінює напрямок обмінних процесів в бік синтезу в клітинних з'єднаннях не ліпідної природи.

В 1922р Г. А. Надсон спостерігав ожиріння дріжджових клітин, що наступило після іонізуючого опромінення з продовженням росту в живильному середовищі. Це явище пояснювалося ним як результат різних порушень обміну речовин, головним чином у вуглецевого, що призводять до більш інтенсивного накопичення ліпідів, в першу чергу триацилгліцеринів і стеринів. Дія, подібна до іонізуючої радіації, здійснюють на дріжджові організми різні радіометричні речовини (ембіхін та ін). Викликаючи порушення координації між окремими ділянками ланцюга загального обміну клітини, такі речовини різко пригнічують функції розмноження організму, і призводять його до ожиріння

4. 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).

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).

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* ліпоутворення 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. 9).

Таблиця 9

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- диацилгліцерини ⁱ	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

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 ліпіди міцеліальних грибів і водоростей.

Фракційний склад ліпідів дріжджів різних таксономічних груп ідентичні, відмінності полягають лише в кількісному співвідношенні фракцій. Аналогічний фракційний склад має ліпіди міцеліальних грибів і водоростей.

З інших ліпидоутворюючих 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. Мікроскопічні гриби поки не набули великого поширення в отриманні ліпідів, хоча жир грибів по своєму складу близький до рослинного.

Наявність в дріжджових ліпідах значної кількості ненасичених жирних кислот надає їм схожість з рослинними маслами (табл. 10).

Таблиця 10

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}
Соєва 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

Вихід жирів у *Asp. terreus*, наприклад, на вуглеводному середовищі досягає 51% від абсолютно сухої ваги (АСВ). Ліпідний склад грибів представлений в основному нейтральними жирами і фосфоліпідами.

Крім дріжджів як продуценти ліпідів в перспективі можуть розглядатися міцеліальні гриби і мікроформи водоростей. Відомий інтерес (як джерело специфічних жирних кислот, полі-β-гідроксибутірата, фосфоліпідів і восків) представляють бактеріальні продуценти.

Ліпіди, що синтезуються бактеріями, своєрідні по своєму складу, оскільки включають в основному складні ліпіди, тоді як нейтральні жири складають незначну частку біомаси. При цьому бактерії проводять різноманітні жирні кислоти (що містять від 10 до 20 атомів вуглецю), що важливе для промислового отримання специфічних жирних кислот.

Водорості перспективні для культивування як ліпідоутворювачі, оскільки не потребують органічного джерела вуглецю. Хімічний склад (співвідношення білків і жирів) водоростей також сильно варіює залежно від вмісту в середовищі азоту. Недоліки – мала швидкість росту і накопичення токсичних сполук в клітинах, – обмежують промислове вживання.

По співвідношенню основних жирних кислот ліпіди *S. Roseus* достатньо близькі такому «екзотичному жиру», як пальмове масло, і можуть бути його замінником.

Близькі дріжджові ліпіди рослинним маслам і по багатьом фізико-хімічним показникам. Так, йодне число, що характеризує степінь не насиченості жиру ліпідів *Lipomyces lipoferus*, близько до 60, показник переломлення 1,467, температура застигання близь 18°C.

Ліпіди різних організмів підрозділяються на дві групи:

- 1) ліпіди присутні постійно;
- 2) ліпіди кількість яких постійна. Постійно присутні в клітині ліпіди розглядаються як її необхідна складова частина; кількість їх не може зменшуватись нижче певного рівня, що визначається фізіологічними особливостями організму. Ліпіди, вміст яких не постійний, складають мабуть резерв поживних речовин і кількість їх може бути різною.

Тема 5

Технологічні особливості культивування мікроорганізмів продуцентів ліпідів

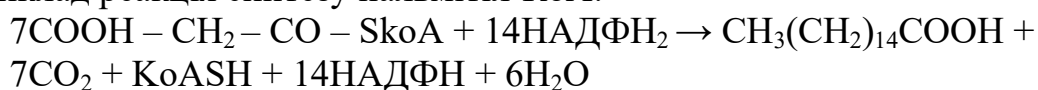
План

1. Біосинтез ліпідів.
2. Вплив умов культивування на склад ліпідів.
3. Можливість промислового отримання ліпідів.
4. Технологічний процес отримання ліпідів.

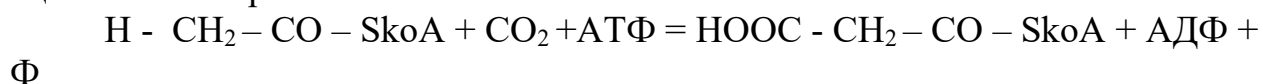
1. Біосинтез ліпідів

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 C_2 . 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-аденозілметіоніна. Це приєднання має місце тільки при включенні у фосфоліпід попередника з одним подвійним зв'язком.

2. 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 триагліцеринів, 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.

3. 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 висувуються 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 ліпідоутворюючих дріжджів й отримання ліпідів можуть бути використані інші гідролізні середовища, наприклад, гідролізати деревини або змішані субстрати деревини і торфу.

4. Технологічний процес отримання ліпідів

Найбільш економічною є технологія комплексної мікробіологічної переробки нафтових дистилятів (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 бензиною 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 в пелюстку 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 сформованої пелюстки зменшується до 4 год (рис. 5).

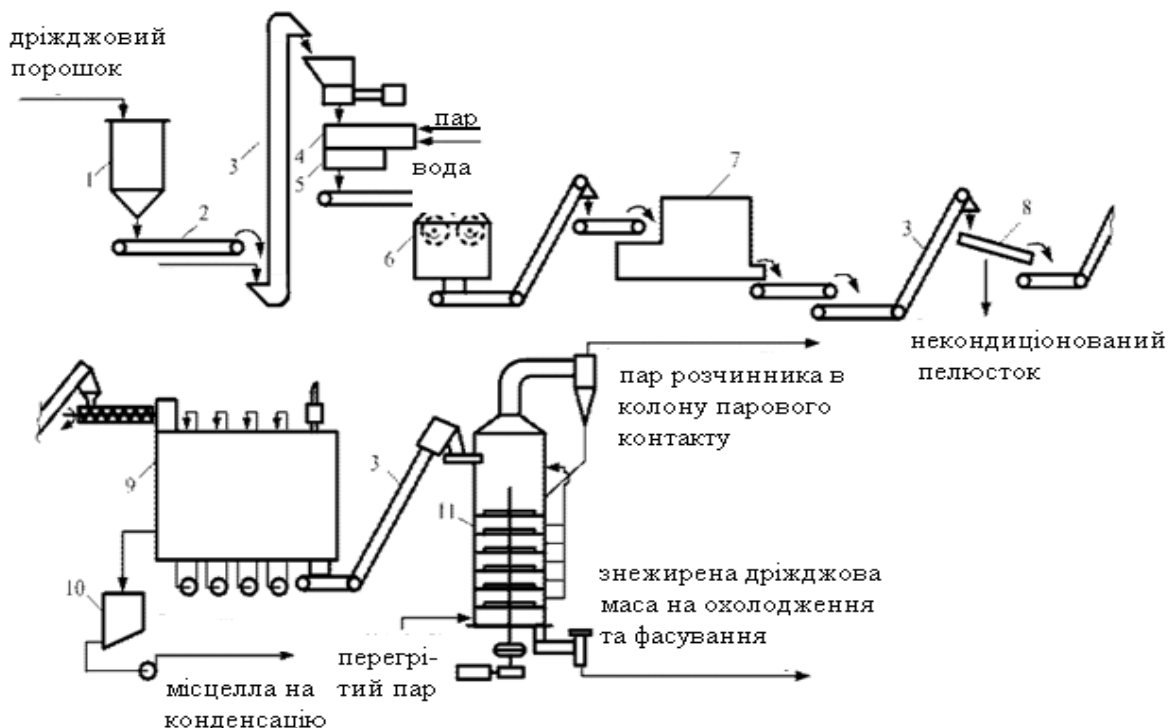


Рис. 8. Технологічна схема екстракційного вилучення ліпідів із дріжджового порошку

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

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 з комірки. 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. 5).

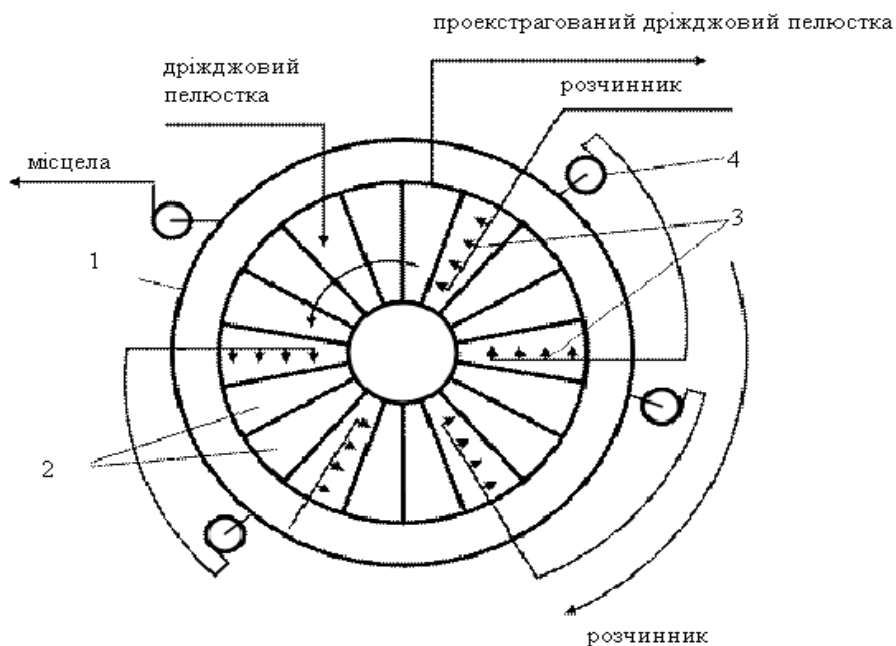


Рис.5. Схема процесу протитечійної екстракції ліпідів з дріжджового пелюстка в роторному екстракторі.

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

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

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.

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 підігрівается 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 витрата 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.

Тема 6

Виробництво пробіотиків

План

- 1. Загальні відомості про пробіотики**
- 2. Класифікація та напрями застосування пробіотиків**
- 3. Пробіотики у ветеринарії та годівлі тварин**
- 4. Технологія виробництва пробіотиків**

1. Загальні відомості про пробіотики

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.

2. Класифікація та напрями застосування пробіотиків

Нині існує декілька класифікацій пробіотиків. Так, за однією з них, яка заснована на природі складових компонентів препарату, розрізняють такі групи пробіотиків:

- препарати, що містять живі мікроорганізми та структурні компоненти;
- препарати, які містять комплекс живих мікроорганізмів, їхніх структурних компонентів та метаболітів у різноманітних сполученнях;
- препарати на основі живих генноінженерних штамів мікроорганізмів;
- продукти функціонального харчування, які здатні відновлювати мікробну екологію організму-хазяїна.

Згідно з класифікацією, прийнятою в 1996 році, препарати, що нормалізують кишечку мікрофлору, розподіляють на 4 покоління. На фармацевтичному ринку України є кілька поколінь препаратів, які нормалізують мікрофлору кишківника:

Перше покоління – це монокомпонентні препарати, які містять лише один штам бактерій. До них належать “Лактовіт форте”, “Колібактерин”, “Біфідумбактерин”, “Лактобактерин”, “Трилакт”.

Друге покоління – засоби на основі бактерій, які в нормі не мешкають в кишківнику, можуть пригнічувати розвиток патогенних мікроорганізмів. До самоелімінірувальних антагоністів зараховують “Біоспорин”, “Ентерол”, “Споробактерин”, “Сімбітер”.

Третє покоління – полікомпонентні препарати, які містять комбінацію декількох штамів бактерій і добавок: “Лінекс”, аналоги “Аципол”, “Біфіліз”, “Ацилакт”, “Біфіформ” тощо.

Четверте покоління – сорбовані біфідовмісні пробіотики, це живі бактерії нормофлори, іммобілізовані на сорбенті – “Пробіфор”, “Біфідумбактерин Форте”, “Флорін Форте”.

Пробіотичні препарати для корекції мікробіоценозу можна розподілити на 6 груп.

1. Препарати, що містять монокультури живих мікроорганізмів представників нормальної мікрофлори кишечника.

2. Препарати, що містять комплекс живих мікроорганізмів.

3. Препарати, що містять субстанції, які за орального введення стимулюють ріст і розмноження індигенної флори, насамперед біфідобактерій і лактобактерій.

4. Препарати, що містять монокультури або комплекс мікроорганізмів і субстанцій, що стимулюють їхнє приживлення, ріст і розмноження.

5. Препарати, що містять генноінженерні штами мікроорганізмів з заданими характеристиками.

6. Препарати, які крім мікроорганізмів та продуктів, що стимулюють їхній ріст та розмноження, містять інші сполуки, що впливають на функції клітин органів і тканин людини.

Класифікація пробіотичних препаратів для корекції мікробіоценозу:

Монопробіотики – одержані на основі одного штаму пробіотичного мікроорганізму.

Асоційовані пробіотики – містять кілька штамів (2-30).

Гетеропробіотики – пробіотики можуть призначатися широкому колу живих організмів (людині, тваринам, птахам, риbam тощо) незалежно від видової приналежності хазяїна, від якого були виділені штами пробіотичних бактерій.

Гомопробіотики – пробіотики призначають представникам того виду хазяїна, з біоматеріалу якого були виділені відповідні штами.

Аутопробіотики – до складу яких входять штами (аутоштами, аутоасоціації штамів) нормальної мікрофлори, ізольовані від конкретної особи та призначені для корекції її мікроекології (кріобанки).

За механізмом дії препарати пробіотиків є багатofакторними лікувальними засобами. Вони мають антагоністичну активність щодо широкого спектра патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, здійснюють коригуючий вплив на біоценоз та стимулюють репаративні процеси.

3. Пробіотики у ветеринарії та годівлі тварин

Отримання високих економічних показників і використання в повній мірі генетичного потенціалу сільськогосподарських тварин можливі тільки при повноцінній і збалансованій годівлі, чіткому дотриманні ветеринарно-санітарних заходів і науково обґрунтованих програм щодо застосування профілактичних засобів. Невиконання обов'язкової зооветеринарної технології годівлі та утримання тварин неминуче веде до ослаблення імунітету, зниження загальної резистентності організму.

Хвороби шлунково-кишкового тракту (ШКТ) займають друге місце після вірусних захворювань і є основною причиною загибелі молодняка. Хвороби шлунково-кишкового тракту пов'язані в першу чергу з порушеннями кишкового біоценозу і зниженням резистентності організму, зумовленим ослабленням імунної системи в умовах високої концентрації поголів'я на обмежених територіях, технологічними і кормовими стресами, погіршенням екології, значним хімічним пресингом при застосуванні антибактеріальних препаратів і антибіотикотерапії.

У нормі умовно-патогенні мікроорганізми знаходяться в організмі господаря в невеликій кількості, не викликаючи захворювання, і тільки за певних умов вони стають істинно патогенними. В цьому випадку з хвороботворними мікроорганізмами борються головним чином за допомогою антибіотиків. Однак при тривалому їх використанні у значних дозах, особливо препаратів широкого спектра дії, відбувається селекція резистентної до антибіотиків патогенної і умовно-патогенної мікрофлори. Швидкість пристосування бактерій до антибіотиків набагато перевищує швидкість створення нових препаратів, тому часто антибіотикотерапія неефективна при лікуванні захворювань. Антибіотики пригнічують розвиток нормальної мікрофлори кишечника, що призводить до значного порушення мікробіоценозу в травному тракті, виникнення дисбактеріозів, інших небажаних ефектів.

Стійкість багатьох мікроорганізмів до антибіотиків – добре відома проблема в тваринництві. Вона унеможлиблює лікування цілого ряду інфекційних захворювань. У зв'язку з цим необхідність боротьби з ентеропатогенами без антибіотиків є важливим завданням.

Останніми роками з'явилися нові підходи до лікування дисбактеріозів, що засновані на відновленні природної мікрофлори організму за допомогою біологічно активних продуктів – пробіотиків. Це мікробні препарати, що представляють собою стабілізовані культури мікроорганізмів, які мають антагоністичну активність по відношенню до патогенної мікрофлори. За ефективністю дії пробіотики не поступаються деяким антибіотикам і хіміотерапевтичним засобам. Крім того, вони не оказують згубної дії на мікрофлору травного тракту, не забруднюють продукти тваринництва, а значить, безпечні для людей, які її споживають, не забруднюють навколишнє середовище. Пробіотики не тільки нормалізують якісний і кількісний склад кишкової мікрофлори після застосування антибактеріальних засобів, але в

багатьох випадках можуть служити єдиним ефективним методом лікування, профілактики і стимулювання продуктивності тварин.

Як показує практичний досвід, у нинішній час пробіотики набирають все ширшого застосування і можуть бути використанні для:

- для стимуляції неспецифічного імунітету тварин;
- профілактики і лікування змішаних шлунково-кишкових інфекцій, а також при розладах травлення (дисбактеріози, гострі ацидоза та ін.), що виникають внаслідок різкої зміни складу раціону, порушення режимів годівлі;
- переустановлення мікрофлори травного тракту після лікування антибіотиками або антибактеріальними засобами хіміотерапії;
- заміни антибіотиків у кормах для молодняку тварин і птиці;
- прискорення адаптації тварин до високоенергетичних раціонів;
- підвищення ефективності використання кормів та продуктивності тварин і птиці;
- подолання наслідків технологічних стресів, зумовлених вакцинацією, транспортуванням та іншими діями, що передбачені технологією виробництва.

4. Технологія виробництва пробіотиків

Виготовлення пробіотиків – багатостадійний процес, що потребує точності у розрахунках на кожному етапі процесу. Наприклад, високої точності потребує розрахунок концентрацій селективного агента при відборі необхідних культур. Також важливим є вибір на основі розрахунку способів культивування, відбору, сушки, а також товарної форми готового препарату.

За загальною технологією промислового виробництва пробіотиків, чисту культуру, або препарат на її основі інокують на субстрат, де відбувається ріст культури. Додатково можливо вносити селективні агенти, що будуть додатково пригнічувати ріст контамінантних організмів. По закінченню лаг-фази, про що свідчить зміна біохімічних властивостей середовища (у випадку молочнокислих пробіотиків – рН 4,7-5,2), ферментацію завершують. Культуру концентрують та готують до заморозки. Після цього препарат фасують і реалізують. Варто зауважити, що процес виробництва пробіотиків включає заходи контролю, що передбачені міжнародними стандартами. Загальна технологічна схема виробництва харчових пробіотиків зображена на рисунку 7.

Найбільш оптимальна технологічна схема виробництва пробіотичного препарату включає: стадію культивування, відокремлення біомаси від культуральної рідини, стадію додавання захисного середовища до отриманої біомаси, стадію сушіння, подрібнення та просіювання висушеної біомаси, стадію фасування, пакування та маркування цільового продукту.

Слід відмітити, що обладнання, яке використовується при проведенні виробничих процесів, та умови, в яких проводяться ці процеси, повинні обов'язково відповідати вимогам GMP, адже в сучасних умовах виробництво конкурентоспроможних препаратів з найвищою якістю без дотримання вимог неможливе.

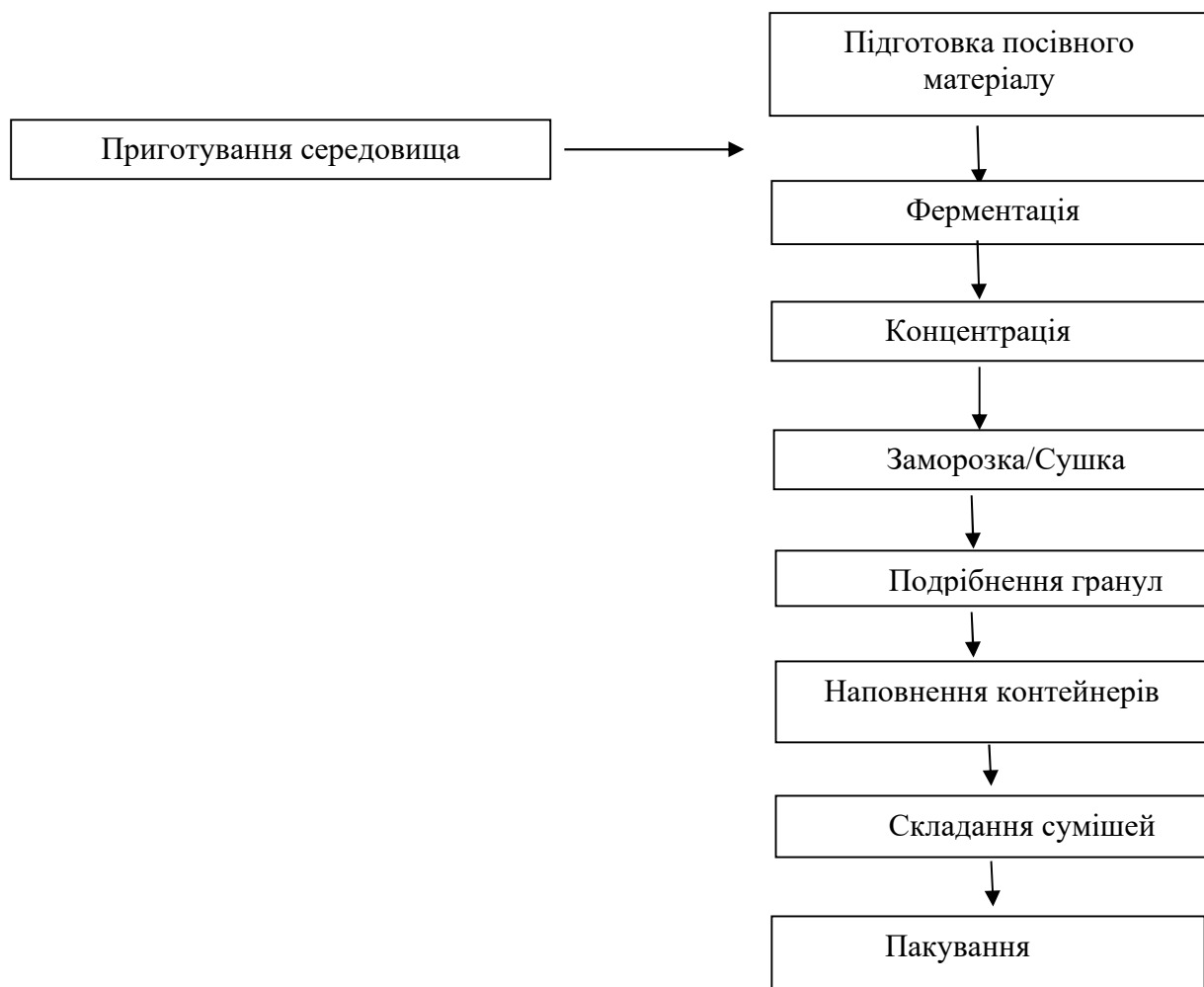


Рис. 7. Технологічна схема виробництва пробіотиків

На кожному з цих етапів можливо застосовувати різні технологічні прийоми, залежно від особливостей культури, її чутливості до певних елементів середовища, чутливості до температур та інших показників, кількості штамів, вимог стандартів та необхідного контролю, необхідних характеристик кінцевого продукту, тощо.

Видовий склад мікроорганізмів, які використовуються для отримання пробіотиків, постійно розширюється. Досить багато даних свідчить про те, що пробіотичні властивості притаманні багатьом представникам як нормальної мікрофлори різних біологічних ніш людини та тварин, так і мікроорганізмам, що заселяють різноманітні абіотичні субстрати. До них відносяться *Escherichia coli*, представники родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium* та ін.

Найчастіше в якості пробіотичних штамів використовують біфідобактерії і молочнокислі бактерії, зокрема лактобацили. Ці пробіотики називають класичними, оскільки вони засновані на штаммах, що домінують у різних біотопах людини, починаючи з перших днів життя. Зазначеним мікроорганізмам властива висока здатність до колонізації епітелію, що

служить захисним бар'єром на шляху проникнення патогенної мікрофлори і, в свою чергу, забезпечує стабілізацію нормального складу мікробіоценозу за рахунок закислення середовища та синтезу антибіотичних речовин. Потрапляючи в сприятливі умови, лактобацили і біфідобактерії розмножуються й продукують багато біологічно активних речовин (органічні кислоти, ліпіди, провітаміни, антибіотики, імуномодулятори тощо), тим самим підвищуючи неспецифічну резистентність організму господаря.

У процесі їх життєдіяльності утворюються вітаміни В₁, В₂ і К, а також молочна й оцтова кислоти. Кисле середовище сприяє кращому засвоєнню еукаріотичними клітинами жирів, вітамінів, іонів заліза і кальцію, затримує розмноження патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів.

У останні десятиліття для виробництва пробіотичних препаратів активно застосовуються дріжджі, до складу яких входить *Saccharomyces boulardii*. Препарати мають антимікробну дію, обумовлену антагоністичним ефектом відносно патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів: *Clostridium difficile*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Candida pseudotropicalis* (in vitro також відносно *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*).

Удосконалення технологічних процесів дозволило впровадити у практику сорбовані пробіотики, в яких бактеріальні штами, що складають їх основу, розміщені на спеціальних субстанціях – сорбентах. Це сприяє транспортуванню активних компонентів до місця призначення і підсилює біологічну активність препаратів.

Альтернативним та більш перспективним напрямком стали наукові пошуки безпосередньої модифікації пробіотичних штамів за допомогою клонування генів противірусних білків – рекомбінантних штамів. На всесвітньому конгресі з гастроентерології в Монреалі були представлені пробіотики нового покоління – препарати, основою яких є рекомбінантні штами мікроорганізмів із заданими властивостями, спроможні стимулювати синтез або продукувати ендогенний інтерферон, і, таким чином, проявляти не лише антагоністичну активність щодо бактеріальних патогенів, але й противірусну активність. Проте суспільство відноситься до продуктів генної інженерії з обережністю. Тому на теперішній момент активно проводиться пошук природних штамів із вираженими імуногенними властивостями.

Тема 7

Отримання та використання бактеріальних заквасок

План

- 1. Загальні відомості про бактеріальні закваски**
- 2. Виробництво заквасок в спеціальних лабораторіях і цехах**
- 3. Загальні правила приготування заквасок**
- 4. Методи зберігання заквасок**

1. Загальні відомості про бактеріальні закваски

Бактеріальні закваски – це види і штами молочнокислих бактерій, які використовуються під час виробництва сирів, кисловершкового масла та кисломолочних продуктів. Назва «закваска» походить від слів «заквашувати» або «сквашувати», тобто підвищувати кислотність молока з метою отримання згустку. Під час виробництва сичугових сирів молочний згусток утворюється під дією молокозгортаючих ензимів, проте і в цьому випадку однією із головних функцій мікрофлори закваски є трансформація молочного цукру в органічні кислоти, яка відбувається головним чином після згортання молока під час обробки згустку.

Мікрофлора закваски складається зі спеціально підібраних видів штамів молочнокислих бактерій, які додають в молоко після його теплової обробки, яка знищує більшу частину (дикої) мікрофлори молока. До кінця XIX століття сири виготовляли на природній мікрофлорі, що потрапляє в молоко із зовнішнього середовища, для збереження якої молоко не піддавали тепловій обробці.

Розрізняють одноштаммові заквашувальні культури, що складаються з одного штаму певного виду мікроорганізму, багатоштаммові одновидові закваски – з декількох штамів мікроорганізмів одного виду і багатоштаммові закваски, до складу яких входять багато штамів декількох різних видів бактерій. Останні можуть бути сумішшю заквашувальних культур невизначеного складу і багатоштаммовою заквашувальною культурою.

По складу мікрофлори основні закваски, які використовують в молочній промисловості, підрозділяють на 3 групи: бактеріальні, грибові і змішані.

В залежності від фізичного штаму закваски поділяються на: рідкі, сухі (ліофільновисушені) та заморожені. Крім того, закваски поділяються на: закваски, що складаються з мезофільних молочнокислих бактерій, закваски, які в своєму складі містять термофільні молочнокислі бактерії та змішані закваски.

2. Виробництво заквасок в спеціальних лабораторіях і цехах

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 бактеріального 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 амінокислотно-мікроелементно-вітамінного комплексу), буферних солей та стимуляторів росту. В якості буферних солей використовують трьохзаміщений лимоннокислий натрій або оцтовокислий натрій. Стимуляторами росту молочнокислих бактерій є сірчаноокислий 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.

Для отримання бактеріальної маси стерилізація та охолодження середовища, нарощування клітин молочнокислих бактерій здійснюються в ферментері, що має мішалку, в якому автоматично регулюються температура і рН на заданому рівні. У підготовлене стерильне середовище, охолоджене до оптимальної температури розвитку того чи іншого виду молочнокислих бактерій, подають закваску в кількості 5–8% (на сироватковому середовищі) або 3–5% (на знежиреному молоці). Середовище із закваскою ретельно перемішують. Нарощування клітин молочнокислих бактерій проводять при оптимальній температурі в умовах періодичного культивування при постійній нейтралізації культуральної рідини, підтримуючи рН на оптимальному рівні 25% водним розчином аміаку, насиченим водним розчином 30%-вого Na_2CO_3 при постійному перемішуванні з частотою обертання мішалки 2,5–5,0.

Після закінчення процесу культуральну рідину охолоджують (до 3–8°C) і відразу направляють на бактофугування для отримання бактеріальної маси. У разі необхідності охолоджену культуральну рідину зберігають не більше 8–10 год.

Відділення клітин від середовища здійснюється в кінці логарифмічної фази зростання, коли в культуральній рідині (в 1 мл) містяться сотні мільйонів активних клітин.

Клітини з культуральної рідини виділяють на бактофуги. Можливо використовувати для цієї мети центрифугу і молокоочишувач.

Повноту відділення клітин з культуральної рідини контролюють візуально і мікроскопіюванням бактофугата. Бактеріальна маса містить сотні мільярдів клітин в 1 г; вихід бактеріальної маси з культуральної рідини становить 0,5–0,8%.

Отриману бактеріальну масу змішують із захисним середовищем у певному співвідношенні і отримують суспензію клітин молочнокислих бактерій.

Отриману суспензію клітин молочнокислих бактерій поміщають на лотки шаром 6–8 мм або фасують по 5 мл у флакони (місткістю 10 мл). Після цього суспензію клітин заморожують в морозильній шафі при температурі -40...-50°C. Висушування суспензії клітин проводять у камерній сублімаційній установці при залишковому тиску 0,13–1,30 Па. Видалення основної вологи проводиться при низькій негативній температурі (-35...-45°C), досушування при позитивній температурі (40–45°C); тривалість сушіння суспензії клітин на лотках 6–12 год, у флаконах 24–42 год.

Сухий бактеріальний концентрат, висушений на лотках, роздрібнюють і фасують у флакони порціями 1,0–1,5 м. Флакони закривають гумовими

прокладками, металевими ковпачками і наклеюють етикетки. Сухий бактеріальний концентрат, висушений у флаконах, закупорюють таким же чином.

Рідкий бактеріальний концентрат. Рідкий бактеріальний концентрат мезофільних молочнокислих стрептококів, так само як і сухий, застосовується при виробництві сиру та сметани. Він відрізняється від технологічного процесу приготування сухого бактеріального концентрату лише винятком двох операцій – заморожування і сушіння. Бактеріальну масу змішують із захисним середовищем, що містить водний розчин кухонної солі, суспензію желатинази, розчину фітину і водної суспензії амілаку в співвідношенні 1:1 або 1:2 (залежно від кількості клітин). Суспензію клітин в захисному середовищі розливають в стерильні флакони по $5 \pm 0,5$ мл – півпорція, і по $10 \pm 0,5$ мл – порція. Флакони з рідким бактеріальним концентратом закупорюють таким же чином, як і флакони з сухим бактеріальним концентратом. Фасований бактеріальний концентрат швидко охолоджують до температури -5°C , на кожен флакон наклеюють етикетку.

Рідкий бактеріальний концентрат зберігається не більше 2 міс з дня вироблення, в тому числі на підприємстві-виробнику не більше 10 діб. Характеристика рідкого бактеріального концентрату представлена нижче.

Рідкий бактеріальний концентрат містить не менше 150 млрд. клітин в 1мл. В рідкому бактеріальному концентраті допускається наявність сторонньої непатогенної мікрофлори (не більше 20 клітин в 1 г).

В даний час при виробництві бактеріального концентрату і заквасок, що готуються на основі бактеріальної маси, бактеріальні клітини нарощуються в періодичному режимі культивування при підтримці температури і рН на заданому рівні, в замкнутому об'ємі живильного середовища – в ферментері. При цьому діючі на клітини численні фактори змінюються в ході розвитку культури. Спочатку мікроорганізми розмножуються в умовах надлишку поживних речовин, які під час їх інтенсивного росту поступово використовуються. Одночасно з цим в середовищі накопичуються продукти обміну. Вони гальмують діяльність ферментів, що беруть участь у синтезі компонентів клітин. Відповідно, в середовищі відбувається ряд закономірних морфолого-біохімічних змін. Так, клітини, що утворилися на початку культивування, відрізняються від клітин, що вирости пізніше. Це веде до гетерогенності культури. Нарощування клітин в умовах безперервного (проточного) культивування передбачає постійний приплив живильного середовища і одночасне видалення продуктів життєдіяльності. В результаті цього мікроорганізми набувають здатність до продуктивного незатухаючого в часі росту.

Технологічний процес виробництва сухого бактеріального концентрату при безперервному способі культивування молочнокислих бактерій значною мірою аналогічний технологічному процесу виробництва сухого бактеріального концентрату при періодичному способі культивування. Відмінною особливістю технологічного процесу при безперервному способі культивування є стерилізація та охолодження живильного середовища в потоці і нарощування клітин в проточних умовах. Це дає можливість отримати

бактеріальний концентрат більш активний, ніж при його виробництві періодичним способом, а також збільшити вихід продукції з існуючого обладнання.

Процес культивування мікроорганізмів проходить у дві стадії. У першій стадії в ферментер з підготовленим живильним середовищем вносять закваску, перемішують і культивують при оптимальній температурі росту мікроорганізмів, підтримуючи рН на постійному рівні шляхом нейтралізації і при постійному перемішуванні. У другій стадії в резервуар вносять всі компоненти середовища (крім води) і розчиняють. Отриману суміш насосом безперервно відбирають із резервуара і в потоці змішують з водопровідною водою. Живильне середовище направляють в теплообмінник, де стерилізують, а потім охолоджують до оптимальної температури росту. Охолоджене живильне середовище безперервним потоком направляють в ферментер, у якому готувалась перша стадія культивування мікроорганізмів, підтримуючи рН на постійному рівні і постійно перемішуючи культуральну рідину. Одночасно з ферментера безперервно відбирають культуральну рідину в кількості, рівній притоку живильного середовища в ферментер.

3. Загальні правила приготування заквасок

Приготування лабораторної закваски та активізацію бактеріального концентрату здійснюють у відділеннях чистих культур при мікробіологічній лабораторії підприємства.

На заводах невеликої потужності (до 25 т переробки молока за зміну) приготування лабораторної закваски та активізацію бактеріального концентрату проводять в спеціальному боксі. У відділеннях чистих культур і боксах, в яких готують лабораторну закваску і активізують бактеріальний концентрат, необхідно підтримувати сувору чистоту, в цих приміщеннях не допускається проведення посівів по санітарно-гігієнічному контролю готової продукції.

Повітря у відділенні чистих культур або боксі дезінфікують за допомогою бактерицидних ламп у відповідності з паспортом на використовуваний тип лампи.

Відділення чистих культур оснащують термостатами (мінімум на дві температури), холодильником і всім іншим необхідним обладнанням. Термостати і холодильники, призначені для приготування та зберігання лабораторної закваски та активізації бактеріального концентрату, не повинні використовуватися для інших цілей.

Закваски, одержувані в рідкому або сухому вигляді, сухий і рідкий бактеріальний концентрат вживають по можливості незабаром після отримання зі спеціальних цехів або лабораторій. До вживання закваски та бактеріальні концентрати зберігають у холодильнику при температурі не вище 8°C.

Флакони з заквасками і бактеріальними концентратами відкривають тільки безпосередньо перед вживанням і використовують весь вміст флакона

відразу. Не можна використовувати суху і рідку закваски, а також бактеріальний концентрат з вичерпаним терміном зберігання.

Лабораторну закваску і активізований бактеріальний концентрат готують в молочних пляшках, колбах, які закривають ватними пробками, або в спеціальних цebraх або бідонах місткістю від 3 до 20 л, закритих кришками з прокладкою з пергаменту.

Стерилізацію молока для лабораторної закваски проводять в автоклавах, які встановлюють в окремому приміщенні. Після стерилізації молоко охолоджують до температури заквашування і в нього відразу ж вносять закваску або бактеріальний концентрат. Стерилізоване молоко, приготовлене в пляшках і колбах з ватними пробками, допускається зберігати при кімнатній температурі протягом 3-5 діб. При цьому проводять контроль молока на стерильність шляхом термостагірування при температурі $37 \pm 1^\circ\text{C}$ протягом 3 днів. Для контролю беруть 1-2 пляшки або колби від кожної партії молока. Відсутність клітин в препараті при мікроскопірованні молока після термостатування вказує на його стерильність. Стерилізоване молоко, приготовлене в цebraх або бідонах, зберігати не допускається. Допускається використання лабораторної закваски з вичерпаним терміном придатності.

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 цebraх або бідонах з кришками місткістю від 3 до 20 л.

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 виділених 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 (03-12, 03-40, ОЗУ-300, ОЗУ-600) або в пастеризаційних ваннах (ВДП-300 і Г6-ОПА-600). При необхідності грибкову закваску готують в вершководозріваючих резервуарах місткістю 1 т.

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 закатованих з нею трубопроводів і насосів час циркуляції миючого розчину збільшують до 45-50 хв, кислоти – до 45-60 хв [10].

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 грибами.

Для приготування закваски застосовують молоко коров'яче заготовлене по ГОСТ 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.

Стерилізацію молока проводять при температурі $121 \pm 2^\circ\text{C}$ і тиску 0,1 МПа. Тривалість витримки молока при вказаній температурі встановлюють залежно від ємності, в якій стерилізують молоко: для пляшок і колб по 0,5-1 л 5-10 хв; для бідонів і цебрів по 3-5 л 10-15 хв; для бідонів по 10 л – 15-20 хв; для бідонів і цебрів по 20 л – 20-30 хв. При приготуванні закваски в спеціальних заквасочник або пастеризаційних ваннах пастеризацію молока проводять при температурі $92-95^\circ\text{C}$ з витримкою 20-30 хв. Рекомендується набирати в ємність гаряче молоко безпосередньо з пастеризатора. Під час витримки молока при заданій температурі пастеризації необхідно перемішувати його для рівномірного прогріву у всіх шарах. При приготуванні закваски в резервуарах молоко нагрівають в пастеризаторі до температури $95-97^\circ\text{C}$ і витримують в резервуарі 40-60 хв.

Приготування і застосування заквасок на чистих культурах. З рідкої, або сухої заквасок за допомогою окремих штамів на підприємствах (в лабораторіях) готують лабораторну закваску, яку використовують для отримання виробничої закваски. Лабораторну закваску можна застосовувати також для заквашнювання молока або вершків при виробництві кисломолочних продуктів. При необхідності приготування великої кількості виробничої закваски її рекомендується готувати на пастеризованому молоці; допускається одна пересадка виробничої закваски за умови приготування первинної виробничої закваски на стерилізованому молоці. Виробничу закваску використовують для заквашнювання молока і вершків при виробництві кисломолочних продуктів.

Бактеріальний концентрат використовують у виробництві для приготування виробничої закваски або безпосередньо продукту. Бактеріальний концентрат мезофільних молочнокислих стрептококів використовують для приготування сиру і сметани. Бактеріальний концентрат термофільних молочнокислих стрептококів призначений для приготування ряжанки та інших кисломолочних продуктів подібного типу.

Бактеріальний концентрат ацидофільних молочнокислих паличок застосовують для приготування ацидофільного молока, ацидофільної пасти, напою «Московський» і дитячих кисломолочних продуктів.

Для приготування лабораторної закваски незалежно від способу вироблення використовують тільки стерилізоване молоко, для приготування виробничої закваски використовують стерилізоване і пастеризоване молоко. Активізацію бактеріального концентрату проводять на стерилізовану молоці, допускають використання пастеризованого молока, призначеного для приготування закваски.

Пастеризоване та стерилізоване молоко відразу охолоджують до температури, оптимальної для кожного виду закваски або бактеріального концентрату, негайно вносять закваску або бактеріальний концентрат.

Суху закваску і сухий бактеріальний концентрат у флаконі розчиняють, додаючи в нього 6-7 мл стерилізованого молока, води або фізіологічного розчину, отриману суміш переносять у підготовлене молоко. Рідкий бактеріальний концентрат перед розкриттям флакона витримують при кімнатній температурі протягом 20-25 хв. Вміст флакона переносять в

підготовлене молоко. Потім у флакон наливають 6-7 мл стерильного молока води або фізіологічного розчину, флакон закривають пробкою, кілька разів струшують і вміст переносять в підготовлене молоко.

Бактеріальний концентрат використовують для приготування виробничої закваски або безпосередньо продукту після його активізації. Послідовність активізації бактеріального концентрату зображена нижче (рис. 8).

Кількість закваски та бактеріального концентрату, що вноситься в молоко, залежить від виду закваски і конкретних умов виробництва.

Температура і тривалість сквашування молока, витримки (дозрівання) закваски залежать від виду та кількості закваски. Свіжоприготовлена закваска володіє найбільшою активністю, тому після сквашування (і дозрівання) закваску використовують у виробництві.

Приготування закваски безперервним способом здійснюють на автоматизованій лінії.

Технологічний процес приготування закваски для сиру безперервним способом складається з тих же операцій, що і при її приготуванні періодичним способом, але істотно відрізняється за апаратурним оформлення та параметрам процесу.

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.

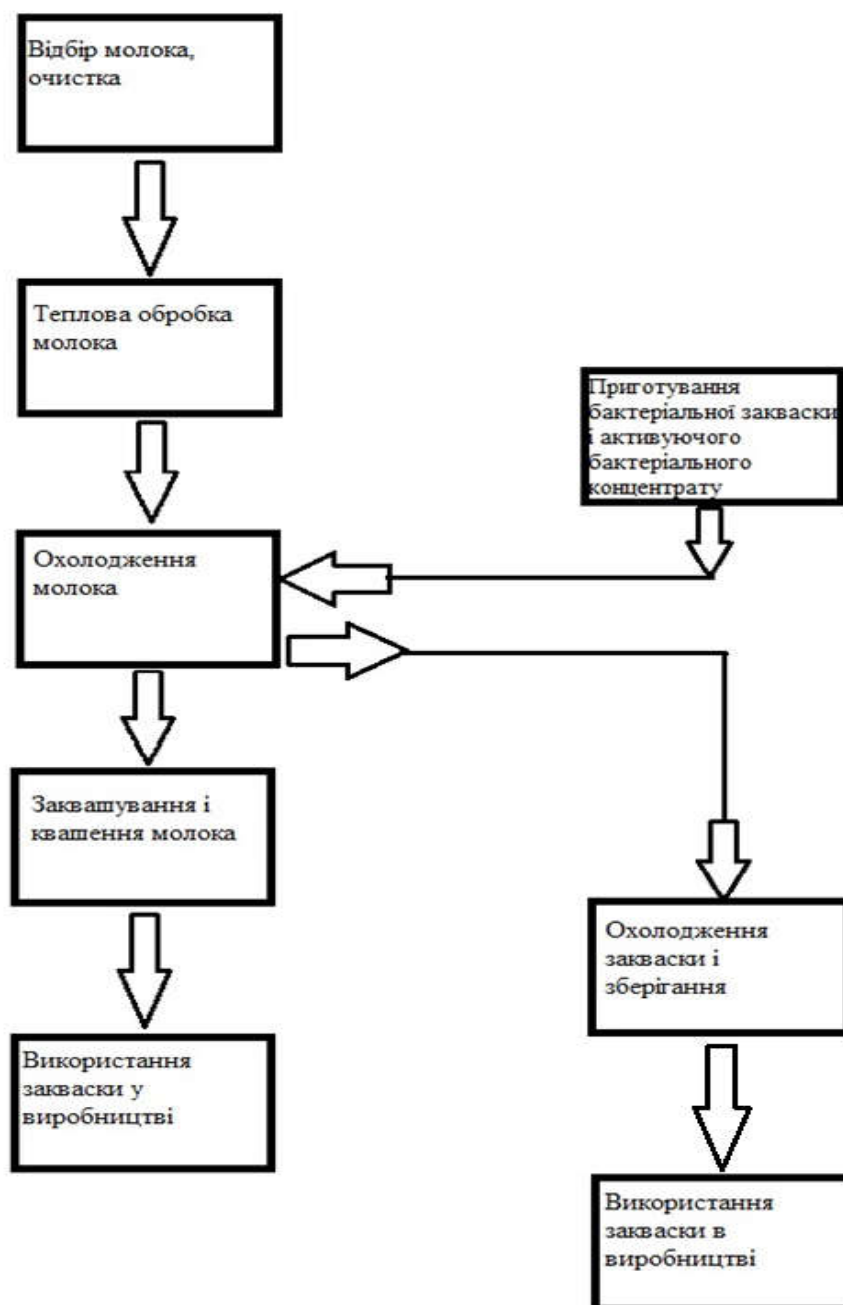


Рис. 8. Отримання виробничої закваски на чистих культурах

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 $70-72^\circ\text{C}$, чистий кисломолочний смак, ніжний,

слабко виражений запах. Консистенція закваски однорідна, без виділення сироватки.

4. Методи зберігання заквасок

Сублімаційне сушіння та зберігання у висушеному стані. При сублімаційному сушінні видалення вологи відбувається після заморожування, відбувається в той період, коли мікроорганізми знаходяться в стані анабіозу і є найбільш стійкими до різних несприятливих дій, у тому числі до сушіння.

Процес підготовки культур і комбінацій (заквасок) до сушіння складається з вирощування їх в стерильному знежиреному молоці, що містить 16% сухих речовин, 0,1% трьохзаміщеного лимоннокислого натрію, внесення їх в захисне середовище в співвідношенні 3:7, що представляє собою водний розчин, що містить 10% сахарози, 5% желатинази, 2,5% глутамату натрію і 5% трьохзаміщеного лимоннокислого натрію. Суміш перемішують і розливають по 1 мл в ампули, заморожують за температури -40°C і висушують сублімацією. Основний процес висушування проводять за мінусової температури (-35°C). За цей період відбувається видалення майже всієї вільної вологи. Досушування культур та їх комбінацій проводять при позитивній температурі, близькій до кімнатної. Весь процес сушіння триває протягом 48 год. Для отримання сухих культур та їх комбінацій, стійко зберігають свої фізіолого-біохімічні властивості, вони повинні мати вологість не більше 2%.

Ампули з сухими культурами і комбінаціями відразу після сушіння запаюють під глибоким вакуумом і зберігають при низькій позитивній ($3-5^{\circ}\text{C}$) або мінусовій (-18 або -25°C) температурі. Зберігання сухих культур і комбінацій при температурі $3-5^{\circ}\text{C}$ дає можливість зберегти їх життєздатність і виробничо-цінні властивості протягом багатьох років (до 10 і більше років). Збереження молочнокислих бактерій, висушених над глибоким вакуумом, є перспективним методом.

Заморожування та зберігання в замороженому стані. Підготовку штамів та їх комбінацій (заквасок) до заморожування рекомендується проводити двома способами.

При першому способі штами або комбінації в кількості 20-30% вносять у стерильне знежирене молоко, що містить 16% сухих речовин, 0,1% трьохзаміщеного лимоннокислого натрію. Суміш ретельно перемішують.

При другому способі штами або їх комбінації (закваски) перевіряючих петлею в пробірки зі стерилізованим знежиреним молоком і термостатують протягом 16-18 год при різній температурі: $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (для мезофільних молочнокислих стрептококів), $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (для термофільного стрептокока і болгарської палички), $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (для ацидофільної палички).

Підготовлені штами, їх комбінації (закваски) поміщають в морозильну камеру при температурі -18 або -25°C і зберігають при цій температурі до перевірання. Перевірання молочнокислих стрептококів проводять через 6 міс зберігання, а молочнокислих паличок – через 4 міс.

При дотриманні зазначених термінів перевірювання молочнокислі бактерії в замороженому стані зберігають життєздатність без зміни

біохімічних властивостей. Після першого перевіювання в стерилізованому знежиреному молоці активність кислотоутворення молочнокислих бактерій дещо підвищується.

Тема 8

Виробництво ферментних препаратів

План

1. Значення ферментних препаратів та їх продуценти.
2. Номенклатура ферментних препаратів.
3. Технологія виробництва ферментних препаратів.
4. Технологічна схема вирощування мікроорганізмів глибинним методом. Дифузійна батарея.
5. Отримання препаратів П2Х, Г2Х, П3Х, Г3Х.
6. Отримання препаратів П10Х, Г10Х.
7. Ферментні препарати в годівлі тварин.

1. Значення ферментних препаратів та їх продуценти.

Ферменти – це органічні каталізатори білкової природи, що володіють великою специфічністю до субстратів. Вони забезпечують послідовність і взаємопов'язаність багатьох складних біохімічних перетворень в клітинах рослин, тварин і мікроорганізмів. Успіхи в дослідженні структури ферментів відомо їх в даний час понад 1000 – дозволили встановити, що багато з них є двокомпонентними, тобто складаються з білкового компонента (апофермента) і пов'язаного з ним коферменту. Ферментами прийнято називати органічні сполуки небілкової природи, які каталізуються ферментами перетворення їх в якості обов'язкових кофакторів.

Каталітична дія ферментів відрізняється винятковою ефективністю, вони не мають собі рівних при не ферментативним каталізі. Хімічні реакції завдяки ферментам протікають у водневих розчинах при звичайній температурі і тиску протягом секунд і навіть частки секунд, не вимагаючи при цьому сильнодіючих кислот і лугів.

Основні джерела ферментів – тканини, органи тварин, різні рослини, мікроорганізми. Особливо велика кількість ферментів синтезуються дріжджами, мікроскопічними грибами, актиноміцетами, бактеріями. Перевага мікроорганізмів полягає в тому, що вони швидко ростуть на дешевих поживних субстратах. Для промислового виробництва ферментних препаратів використовують мікроорганізми, виділені з природних джерел, і мутантні штами, отримані в результаті дії мутагенів фізичної чи хімічної природи. В результаті селекційних досліджень отримані мікроорганізми, здатні синтезувати одночасно комплекс різних ферментів, але серед мутантних штамів зустрічаються і такі, які продукують у найбільших кількостях лише один промислово важливий фермент. Активними продуцентами амілолітичних ферментів є мікроскопічні гриби роду *Aspergillus* (*Asp. usamii*, *Asp. oryzae*, *Asp. awamori*, *Asp. batatae*) та *Rhizopus* (*Rh. niveus*, *Rh. delemar*, *Rh. japonicum*, *Rh. tonnensis*), а також окремі представники *Mucor*. Велику

кількість амілолітичних ферментів синтезують спороносні бактерії *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus macerans* та інші.

Серед мікроорганізмів-продуцентів протеолітичних ферментів практичну зацікавленість представляють мікроскопічні гриби роду *Aspergillus* (*Asp. terricola*, *Asp. awamori*, *Asp. oryzae*, *Asp. sojae*, *Asp. flavus*, *Asp. saitoi*), *Rhizopus* (*Rh. delemar*, *Rh. niveus*, *Rh. chinensis*), *Penicillium* (*Pen. notatum*, *Pen. chrysogenum*, *Pen. janthinellum*). Відомо багато спороносних бактерій роду *Bacillus*, здатних утворювати велику кількість протеолітичних ферментів: *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus*, *Bac. megaterium*, *Bac. brevis*, *Bac. fusiformis* та інші.

Протеолітичні ферменти утворюють також бактерії *Bac. felseneus*, *Bac. polymyxa* і дріжджі *Saccharomyces fragilis*.

Продуцентами пектолітичних ферментів є аеробні мікроорганізми – бактерії, мікроскопічні гриби, дріжджі. Найбільша продукуюча здатність виявлена у мікроскопічних грибів роду *Aspergillus* (*Asp. awamori*, *Asp. saitoi*, *Asp. terreus*, *Asp. niger*) і *Penicillium* (*Pen. citrinum*, *Pen. glaucum*, *Pen. expansum*). Продуцентами пектиназ можуть бути строги анаероби роду *Clostridium*. Штам *Cl. pectinofermentans* 15 був отриманий селекційним шляхом в результаті комбінованої дії мутагенних факторів фізичної та хімічної природи.

Активними продуцентами целюлолітичних ферментів є представники багатьох родів мікроорганізмів: *Aspergillus* (*Asp. flavus*, *Asp. terreus*, *Asp. fumigatus*, *Asp. oryzae*), *Trichoderma* (*Tr. lignorum*, *Tr. viride*, *Tr. roseum*), *Penicillium* (*Pen. notatum*, *Pen. variable*), *Fusarium* (*F. solani*, *F. culmorum*).

2. Номенклатура ферментних препаратів

Ферментні препарати, що виробляються промисловістю, крім основного активного білка – комплексу ферментів містять і різні баластні речовини. Найменування препарату складається із скороченої назви основного ферменту і видової назви мікроорганізма-продуцента. Наприклад, препарат, що містить у своїй основі протеолітичні ферменти (“прот”) і отриманий за допомогою культури *Asp. oryzae* буде мати назву проторізін. Найменування препарату відображає також спосіб культивування мікроорганізмів. Препарат отриманий в результаті поверхневого культивування має індекс «П» якщо препарат отриманий глибинним культивуванням то він уде мати індекс «Г». Наприклад поверхнева культура гриба *Asp. awamori* продуцента глюкоамілази називається глюкаваморін ПХ. Індекс Х позначає кількість ферменту в стандартній (культура продуценту з певною активністю на одиницю маси) глибинній або поверхневій культурою. Цифра перед індексом Х вказує на ступінь концентрування та на ступінь очистки ферментного препарату.

Ферментні препарати, отримані у вигляді концентрованих сиропів, звільнені від нерозчинних речовин, позначаються індексами П2Х і Г2Х. Для поверхневої культури це концентрат з вмістом 50% СР, для глибинної – концентрат з вмістом не більше 40% СР. Сухі ферментні препарати, які одержані висушуванням, шляхом розпилення екстракту поверхневої культури або концентрування фільтрату культуральної рідини, отриманої при

глибинному культивуванні у (ВВУ) з наступним сушінням концентратів на розпилювальних сушарках мають відповідно індекси ПЗХ і ГЗХ. Ферментні препарати з індексом 2Х і 3Х відносяться до технічних.

Препарати очищених ферментів, у технологічній схемі виробництва яких використані різні методи очищення і фракціонування, позначаються відповідно П10Х, Г10Х, П15Х і Г15Х.

Високоочищені, але не кристалічні ферментні препарати, що містять до 20–25% баластних речовин, отримані методом концентрування та очищення дифузорних екстрактів або культуральної рідини на ультрафільтраційних установках з наступним сушінням концентратів на розпилювальних сушарках, в залежності від ступеня очищення позначаються індексами П20Х, Г20Х, П30Х, Г30Х.

Будь-який ферментний препарат повинен бути охарактеризований за його ферментативною активністю, яка зазвичай виражається в стандартних одиницях. За стандартну одиницю активності будь-якого ферментного препарату приймається така його кількість, яка каталізує перетворення одного мікромоля (1мкМоль) субстрату за одну хвилину при заданих стандартних умовах. Вміст ферментів в препаратах умовно виражається в стандартних одиницях активності на 1 г сухого препарату або на 1 мл розчину. Для визначення активності ферментів застосовуються різні методи: хімічні, хроматографічні, газометричні, поляриметричні і спектроскопічні.

3. Технологія виробництва ферментних препаратів

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 %.

Поживне середовище, охолоджене до 35°C, засівають суспензією конідій (500 600 тис. конідій в 1 мл на 10-15 г висівок), а потім розкладають шаром 10-15 см по стерильним посівним кюветам. Закриті кювети з середовищем поміщають в ростові камери, де підтримують певну вологість і температуру. Для більшості мікроскопічних грибів в першу добу росту підтримується температура 28-32°C, вологість 70-95%; у другу 26-30°C, вологість 60-85%, у третій 24-26°C, вологість 55-64%. Максимальне утворення конідій зазвичай припадає на 72-85 годинні зростання. Після цього посівні кювети витримують ще 72-96 годин при температурі 8-10°C. Підсушена культура може зберігати здатність до проростання конідій протягом 15-20 діб.

Споровий посівний матеріал може бути отриманий з підсушеної культури. Для цього культура гриба подається в вібросепаратор, де відокремлюються спори (конідії). З допомогою вакууму вони надходять в приймач, попередньо проходячи через сітчастий фільтр. Такий споровий матеріал може зберігатися протягом 1,5 років при температурі 8-24°C. Культивування посівного матеріалу, наприклад *Asp. terricola*, глибинним способом проводиться у ферментаторах на 8-10 л, які заповнюють 3 літра поживного середовища, протягом 24-30 годин при температурі 30°C. Отриманий посівний матеріал – глибинну культуру гриба вносять в стерилізатор із стерильними, охолодженими до температури 33-34°C зволоженими висівками з розрахунку 1-2% вихідного глибинного посівного матеріалу до маси повітряно-сухих висівок. Вологість поживного середовища після внесення посівної культури повинна бути не нижче 58-60%.

Приготування поживного середовища. Основним компонентом поживного середовища для вирощування мікроскопічних грибів роду *Aspergillus* поверхневим способом служать пшеничні висівки, для *Tr. roseum* – продуцента цитолітичних ферментів, зернове лушпиння і солодові паростки. Для штаму *Asp. awamori* 16 при отриманні пектолітичних ферментів необхідний буряковий жом. Використовується суміш, що складається з 70% бурякового жому (джерело пектину) і 30% пшеничних висівок. Нерідко використовуються картопляна мезга і пивна дробина, відходи підприємств харчової промисловості. Для отримання пухкої структури до середовищ додають тирсу (5-10%), за винятком дубових, солодові паростки (15-20%), вівсяне лушпиння. Пшеничні висівки містять необхідні для росту і розвитку мікроорганізмів поживні речовини, в тому числі незамінні амінокислоти метіонін (19%), триптофан (0,3%) і лізин (0,6%), 16-20% крохмалю, 10-12% білка, до 4% жиру, різні фосфорні сполуки, мінеральні солі, мікроелементи і деякі інші речовини.

Підготовка твердих поживних середовищ для вирощування мікроорганізмів полягає в тому, що пшеничні висівки, солодові паростки, як правило, змішують в стерилізаторі (50-60% за об'ємом) і отриману суміш перед стерилізацією звожують до 20-40% вологості. Стерилізатори розраховані для роботи при температурі від 104 до 140°C при надмірному тиску до 0,03 МПа. Місткість стерилізатора коливається від 300 до 500 кг.

Для отримання високоактивних культур важливе значення має початкова вологість живильного середовища. Вона зазвичай коливається в межах 58-60 %. При підвищеній вологості середовища погіршується аерація зростаючої культури, а при зниженні сповільнюється ріст міцелію і знижується активність синтезованих ферментів. У виробничих умовах до кінця циклу вирощування вологість знижується до 35-40%, навіть незважаючи на підтримання відносної вологості повітря, близькій до 100%.

Вирощування культури-продуцента у виробничих умовах. У простерилізоване і охолоджене до температури 40°C поживне середовище при безперервному перемішуванні вносять посівний матеріал і стерильну воду з таким розрахунком, щоб кінцева вологість підготовленого середовища була 58-60%. Засіяну конідіями чистої культури грибів або глибинною посівною культурою поживне середовище розкладають шаром 2-3 см в кювети або вертикальні касети товщиною 4-5 см. Витримують зазвичай при температурі 28-32°C протягом 22-40 годин у спеціальних ростових камерах або на механізованих установках. Готова культура в кюветах подається до дробарки.

У ростових камерах на 1 м³ об'єму припадає (за сухою масою) від 8 до 18 кг висівок. Мікроорганізми культивують при строго визначеній температурі, аерації, вологості.

Загальна тривалість культивування становить, наприклад, для *Asp. oryzae* 30-36 годин, для *Asp. awamori* (продуцент амілази) 36-42 годин, для *Asp. awamori* (продуцент пектинази) 46-48 годин, для *Asp. terricola* 44-48 годин, для *Asp. foetidus* 48-52 годин.

Кондиціоноване повітря, що йде на аерацію, здійснюється в кондиціонерах. У головному кондиціонованому повітрі, що забирається з атмосфери, підігрівають або охолоджують в залежності від пори року до температури 22-24°C. Потім послідовно частково повітря знепліднюється на ватних фільтрах і надходить в індивідуальні кондиціонери. В них очищене повітря підігрівається в калориметрі до температури 30°C і зволожується паром до вологості, близькій до 100%.

Рециркулююче в системі повітря проходить наступну обробку: поглинуте повітрям тепло при проходженні через камеру (установку для вирощування) знімається на повітроохолоджувачі, потім повітря з головного кондиціонера змішується з 10% свіжим повітря, доводиться до необхідних параметрів і знову надходить у камеру або установку для вирощування. Відпрацьоване повітря виводиться в атмосферу, попередньо пройшовши масляні і бактеріальні фільтри. Для запобігання ростові камери від проникнення незабезпеченого повітря в ній створюється невеликий надлишковий тиск.

У процесі росту мікроскопічні гриби споживають 25-35% сухих речовин середовища і в результаті дисиміляції виділяють в навколишнє середовище велику кількість тепла і діоксиду вуглецю. Якщо надлишкове тепло не видаляти з ростових камер, культура підсихає, знижується її ферментативна активність і навіть припиняється розвиток. Максимальне тепловиділення зростаючої культурою триває 1-2 години і становить до маси вихідних висівок 335-377 кДж/кг.

Для виводу такої великої кількості тепла проводять інтенсивне вентилування ростових камер кондиціонованим повітрям. Кондиціювання повітря проходить кілька стадій: очищення від пилу і сторонньої мікрофлори, підтримання певної температури, насичення вологістю до вмісту, близького до 100%. Проходячи через ростові камери, повітря взаємодіє з ростовою культурою гриба, при цьому нагрівається на 2-3°C і стає менш насиченою вологою, тому він здатний поглинати воду із більш нагрітої маси зростаючої культури, викликаючи підсихання поживного середовища.

Сушка культури. Вивантажується з ростової камери або установки для вирощування готова культура мікроскопічних грибів являє собою брикет (корж) вологістю 35-58%, в якому частинки поживного середовища (висівки, лушпиння) пов'язані міцелієм. Це нестійкий продукт, в результаті виділення тепла фермента можуть повністю інактивуватися протягом 3 год. Для збереження культури в активному стані протягом тривалого часу її необхідно висушити до вологості 10-13%. Для інтенсифікації процесу сушіння культуру гриба подрібнюють на дробарках, дезінтеграторах до частинок розміром 2-3 мм. До цих машин пред'являються особливі вимоги. При дробленні культура гриба щоб уникнути інактивації ферментів не повинна підігріватися, розпорошення її має бути мінімальним, і отримані гранули повинні мати певну величину.

Для сушіння культури використовують стрічкові сушарки, шахтні, вібраційні, прямоочні безперервної дії та інші. Швидкість сушіння залежить від багатьох факторів: хімічного складу середовища, вологості, температури, швидкості руху сушильного агента (зазвичай повітря), різниці температури на вході і виході з сушарки та інші. Основною вимогою успішного сушіння є максимальне скорочення тривалості перебування культури гриба в сушарці до 5-8 хвилин при температурі продукту на виході не вище 40-42°C, що знижує втрати активності до мінімуму. Висушену культуру гриба фасують в крафт-мішки по 18-30 кг.

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 малопроодуктивний 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.

Одержання посівного матеріалу. Для отримання посівного матеріалу мікроорганізм-продуцент пересівають в пробірки на скошене агаризоване поживне середовище. Мікроскопічні гриби при температурі 28-32°C вирощують до рясного конідій утворення, для бактеріальних культур найбільш сприятливий вік посівного матеріалу встановлюють

експериментально. Водяну суспензію культури, вирощеної на твердому живильному середовищі, з розрахунку 1-5% пересівають на рідке поживне середовище (50-100 мл) у колби на 750 мл. Культивування мікроскопічних грибів проводиться при температурі 28-32°C, бактерій – при температурі 32-37°C протягом 30-40 годин на качалці при 180-200 об/хв. Щоб забезпечити посівним матеріалом великі обсяги засівають виробниче середовище, культуру, що виросла в колбах, стерильно переносять у малий, а потім у великий інокулят. Місткість великих інокуляторів становить 10% від обсягу виробничого ферментатора.

Вирощування проводять при зазначених температурах для мікроскопічних грибів і бактерій при безперервному перемішуванні і аерації стерильним повітрям. Витрата повітря на 1 м³ аеруючої рідини зазвичай становить 60 м³/год. Необхідна кількість посівного матеріалу залежить від фізіологічних показників мікроорганізму-продуцента. Наприклад, якщо продуцент рясно утворює спори, витрата посівного матеріалу зменшується і навпаки, збільшується, якщо мікроорганізм розмножується вегетативно. Для актиноміцетів витрата посівного матеріалу може бути 5-20%, для спорозоносних бактерій близько 1%.

Приготування поживних середовищ. При глибинному способі культивування склад поживних середовищ підбирають залежно від фізіолого-біохімічних особливостей мікроорганізму-продуцента і того ферменту або ферментного комплексу, який необхідно отримати в виробничих умовах. Для приготування поживних середовищ для глибинного культивування основною сировиною служать кукурудзяне борошно, крохмаль пшеничний і картопляний, кукурудзяний екстракт, буряковий жом. В якості джерела вуглецю вико-ристовують різні вуглеводи, найбільш легко засвоюються мікроорганізмами, крохмаль, глюкоза, декстрини, мальтоза та інші.

При біосинтезі целюлозолітичних ферментів джерелом вуглецю в середовищі може бути целюлоза у вигляді деревини, бавовна, солома; при біосинтезі ліполітичних ферментів джерелом вуглецю служать ліпіди. До складу поживного середовища повинні входити такі мінеральні речовини, як фосфор, сірка, залізо, цинк, калій, кальцій, магній та ін. Поживні середовища готують на водопровідній воді. Залежно від мікроорганізму-продуцента вміст сухих речовин у середовищах коливається від 1,5 до 10% і більше.

Приготування і стерилізація поживного середовища для глибинного культивування мікроорганізмів - продуцентів ферментів не відрізняються від загальноприйнятих прийомів, використаних у виробництві інших продуктів мікробного синтезу.

4. Технологічна схема вирощування мікроорганізмів глибинним методом. Дифузійна батарея

Технологічна схема отримання очищених ферментних препаратів при глибинному способі культивування вказана на рис. 9. 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.

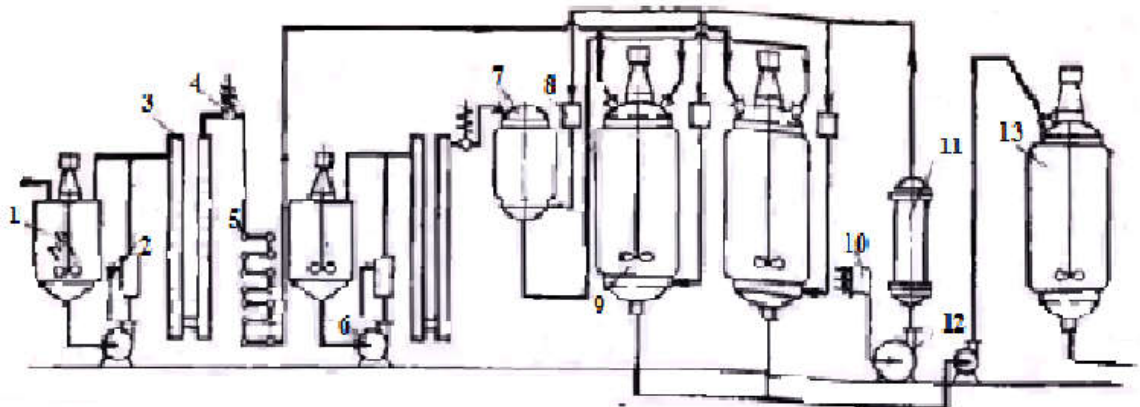


Рис. 9. Технологічна схема вирощування мікроорганізмів глибинним методом

1 – змішувач поживного середовища; 2 – стерилізатор; 3 – витримувач; 4 – редуційний 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. 10).

Всі дифузійні батареї уніфіковані і мають форму вертикального циліндру з відкритою кришкою, що герметично закривається. В процесі роботи всі дифузори заповнені культурою. Кожен із дифузів ємністю 300 л 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 дифузори. 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 завантаженої маси. Повнота вилучення амілолітичних ферментів з культури гриба *Asp. awamori* досягається при відборі екстракту 400% до завантаженої культури.

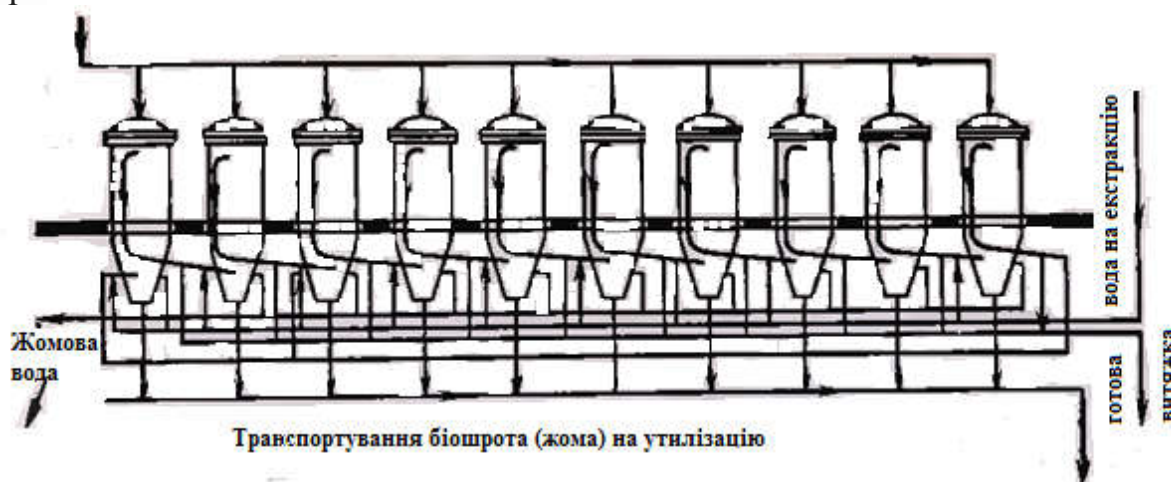


Рис. 10. Дифузійна батарея

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.

5. Отримання препаратів П2Х, Г2Х, ПЗХ, ГЗХ

Для отримання технічних ферментних препаратів культуру продуцента звільняють від нерозчинних баластних речовин (залишки твердого поживного середовища і міцелію). Оскільки ферменти відносяться до водорозчинних білків то кращім екстрагентом буде вода.

Для вилучення ендферментів із дріжджів та бактерій клітинні стінки мікроорганізмів піддають руйнуванню. Внутрішні оболонки грибного міцелію мають менший дифузійний опір, ніж оболонки дріжджових або бактеріальних клітин, і тим не менш вологу культуру мікроскопічних грибів перед екстракцією піддають попередньому подрібненню на частки 3-10мм. По причині великої молекулярної маси ферменти повільно розчиняються, і повільно дифундують із поверхневої культури мікроскопічних грибів в екстрагуючу рідину. Процес повинен відбуватися за температурою 27-30°C.

Культура мікроскопічних грибів вирощена в поверхневих умовах на твердому поживному субстраті містить близько 50-55% СР. Якщо загальна кількість сухої речовини прийняти за 100 то лише 25-30% припадають на водорозчинні фракції до складу яких входять: білки, ферменти, амінокислоти, вуглеводи, мінеральні солі. Нерозчинна частина 70-75% від СР в основному містить клітковину, геміцелюлозу та інші речовини. Таким чином

екстрактивна обробка культури гриба водою дозволяє позбутися на 70-75% від баластних речовин і підвищити концентрацію ферментів в 3,5-4,0 рази. Основною рушійною силою екстракції є різниця концентрацій речовин яка видаляється змочуючи культуру в рідині та в екстрагуючій рідині. Процес дифузії припиняється при вирівнюванні концентрацій.

Розчинні речовини, що перешли у екстракт на 50% складаються із азотистих сполук із яких 0,5% складають ферменти, 29,5% вуглеводи, а решту 20% мінеральні речовини.

Для отримання технічних засобів культуральну рідину звільняють від біомаси і концентрують у вакуум-випарних апаратах при температурі 25-30°C, що відповідає залишковому тиску в апараті 3-4 кПа. При концентруванні до 50% СР речовин утворюється нерозчинний неактивний осад. У кількісному відношенні він складає близько 10% від вмісту СР. Осад відокремлюють сепаруванням. Втрати ферментативної активності в процесі концентрування можуть досягати 10%. Для стандартизації препарату також використовують хлорид натрію. Отриманий стандартний сироп з індексом Г2Х розливають в ємності по 40-50 кг

При висушуванні в розпилюючій сушарці дифузійна витяжка і концентрат глибинної культури з вмістом 10-12% СР отримують препарати з індексом ПЗХ і ГЗХ. В процесі сушки велика кількість цукрів у дифузійній витяжці і в концентраті глибинної культури призводить до налипання препарату на внутрішню поверхню сушарки. Для запобігання цього до дифузійної витяжки додають хлорид натрію з розрахунку 50% вмісту СР, а до концентрату культуральної рідини – 200 кг/м³. Висушений препарат стандартизують по активності хлоридом натрію і фасують у крафт-мішки з поліетиленовими вкладками.

6. Отримання препаратів П10Х, Г10Х

Для отримання очищених ферментних препаратів із індексом Г10Х культуральну рідину відділяють від біомаси. Біомаса надходить на сушіння за температурою повітря 300-350°C. Вихід біомаси з 1 м³ культуральної рідини становить 100 кг за вмісту СР 15%. Втрати ферментів не перевищують 5%. Отриманий фільтрат культуральної рідини випарюють до 1/7 початкового об'єму, в результаті вміст СР в концентраті збільшується. При концентруванні в розчині ферментів спостерігається випадіння неактивного осаду. Втрати ферментів не перевищують 10%. Концентрат культуральної рідини звільняють від неактивного осаду на сепараторах. Ферментний осад отриманий після сепарації розчиняють в трьох об'ємах води, потім стандартизують бетонітом або желатином.

Отриманий полу продукт направляють у розпилюючу сушарку. Осад сушать при температурі 160°C до вологості 8%. Втрати ферменту на цій стадії становить 5-8%.

Висушений і стандартизований препарат фасують по 0,5 кг в поліетиленові мішки котрі упаковують в бляшані коробки. Відокремлений на сепараторі відпрацьований етанол направляють на ректифікацію, де його

фортецю доводять до 96,5% обертів. Втрати спирту при ректифікації становить 1%.

7. Ферментні препарати в годівлі тварин

Ферменти на відміну 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

Тема 9

Мікробіологічний синтез вітаміну В₁₂

План

1. Продуценти вітаміну В₁₂.
2. Біохімічні та мікробіологічні основи отримання вітаміну В₁₂ за допомогою метаноутворюючих бактерій.
3. Отримання і застосування вітаміну В₁₂.

1. Продуценти вітаміну В₁₂

У природі вітамін В₁₂ і споріднені кориноїдні сполуки знаходять у клітинах мікроорганізмів, в тканинах тварин і деяких вищих рослинах (горох, лотос, пагони бамбука, листя і стручки квасолі). Проте походження вітаміну В₁₂ у вищих рослинах остаточно не встановлено. Такі нижчі еукаріоти, як дріжджі і міцеліальні гриби, кориноїди не утворюють. Організм тварин не здатний до самостійного синтезу вітаміну. Серед прокаріотів здатність до біосинтезу кориноїдів широко розповсюджена. Активно продукують вітамін В₁₂ представники роду *Propionibacterium*. Природні штами пропіоновокислих бактерій утворюють 1,0 - 8,5 мг/л кориноїдів, але отриманий мутант *P. shermanii* М-82, за допомогою якого отримують до 58 мг/л вітаміну.

В сімействі *Propionibacteriaceae* є і інші представники, здатні до високого накопичення вітаміну В₁₂ в клітинах. Це перш за все *Eubacterium limosum*.

Як продуценти вітаміну практичну зацікавленість мають багато представників актиноміцетів і споріднених мікроорганізмів. Істинний вітамін В₁₂ в значних кількостях синтезує *Nocardia rugosa*. Активні продуценти вітаміну виявлені серед представників роду *Micromonospora*: *M. purpureae*, *M. echinospora*, *M. halofitica*, *M. fusca*, *M. halceae*. Високою кобаламінсинтезуючою активністю володіють метаногенні бактерії, наприклад, *Methanosarcina barkeri*, *M. vacuolata* і окремі штами галофільного виду *Methanococcus halophilus*. Останній організм синтезує більше 16 мг кориноїдів на грам біомаси. Настільки високого вмісту кориноїдів не визначено в жодного іншого з вивчених мікроорганізмів. Причина високого вмісту кориноїдів у метаногенних бактерій не встановлена. Кориноїди синтезують суворо анаеробні бактерії з роду клостридій.

У *Clostridium tetanomorphum* та *Cl. Sticrlandii* аденозилкобаламін входить до складу ферментних систем, які каталізують специфічні реакції ізомеризації таких амінокислот, як глутамінова кислота, лізин, орнітин. В значних кількостях утворюють вітамін В₁₂ ацетогенні клостридії *Cl. thermoaceticum*, *Cl. Formicoaceticum* і *acetobacter woodi*, які синтезують ацетат із СО₂. Зацікавленість представляють термофільні бацили, а саме *Bacillus circulans* і *Bac. Stearothermohpilus*, які ростуть відповідно при 60 та 75°C та за 18 годин культивування без дотримання стерильних умов дають високий (2,0-

6,0 мг/л.) вихід вітаміну. Кориноїди синтезують *Rhodopseudomonas palustris*, фототрофні пурпурні бактерії *Rhodobacter shpericus*, *Rh. Capsulatus* та ряд інших видів. На ряду з вітаміном B₁₂ вони створюють без кобальтові кориноїди, роль яких для продуцентів не встановлена. Значну кількість вітаміну B₁₂ утворює ціанобактерія *Anabaena cylindrica*, одноклітинні зелені водорості *Rhodospira rubra*.

Продуценти вітаміну B₁₂ культивують в середовищах, приготованих на основі харчової сировини: соєвого борошна, рибного борошна, м'ясного та кукурудзяного екстракту. В останні роки виявлені мікроорганізми, що утворюють кориноїди високої якості при утилізації нехарчової сировини.

2. Біохімічні та мікробіологічні основи отримання вітаміну B₁₂ за допомогою метаноутворюючих бактерій

Відсутність доступних методів хімічного синтезу вітаміну B₁₂ стало причиною інтенсивного пошуку його природних джерел. Ця робота проводилась в лабораторії вітамінів Інституту біохімії ім. А. Н. Баха, починаючи з 1950 р. В ході досліджень було виявлено накопичення вітаміну B₁₂ в ілових відкладеннях заростаючих озер, в яких відбувається анаеробний процес розкладу органічних речовин, що супроводжується виділенням ряду газів, в тому числі метану.

Одночасно в літературі з'явилися повідомлення про знаходження B₁₂ подібних сполук і в міських стічних водах, а також в стічних водах деяких промислових підприємств підданих анаеробній очистці в метантенках.

Всі ці дані є основою для вивчення можливості використання процесу анаеробного розкладу складних органічних субстратів, які називаються метановим бродінням, для направленої біосинтезу вітаміну B₁₂ на доступних поживних середовищах.

Для вирішення цього питання перш за все було необхідно підібрати сировину яка відповідала наступним вимогам:

- містити основні компоненти, необхідні для розвитку мікроорганізмів;
- не мати домішок, які перешкоджали б отриманню кормових препаратів;
- бути достатньо масовими, щоб забезпечити біосинтез вітаміну B₁₂ в кількостях необхідних для повного задоволення потреб народного господарства.

Зазначеним умовам найбільше відповідали відходи (барда) ацетонобутилових та спиртових заводів, які переробляють зерно і мелясу. Ці відходи є масовими (до 10 млн м³ за рік), містять достатню кількість вуглеводів, азотовмісних органічних сполук та мінеральних компонентів.

Важливим етапом був підбір культур, які викликають метанове бродіння цих субстратів. Вибір був зупинений на біоценозі бактерій, здійснюючих термофільне метанове бродіння стічних вод, оскільки при високих

температурах інтенсивність процесу збільшується в 2-3 рази. Цей біоценоз був попередньо адаптований до зброджування ацетоно-бутилової барди.

Вивчення розвитку даного біоценозу показало, що метанове бродіння вищезазначених субстратів можна розглядати як процес, який складається з двох фаз: в першій фазі відбувається зброджування вуглеводів, амінокислот, пептидів та білків; в другій фазі – зброджування жирних кислот та нижчих спиртів до метану та вуглекислоти.

Перша фаза бродіння протікає при рН від 5,0 до 6,5-7,0 і характеризується інтенсивним розвитком вуглезброджуючих бактерій, максимальна кількість яких досягає в цей час 1 млрд на 1 мл.

Останні фізіологічні групи бактерій досягають інтенсивного розвитку лише по мірі переходу бродіння в лужну фазу, яка характеризується зміною рН від нейтрального (7,0) до слаболужного (8,5).

Розвиток термофільних бактерій, які зброджують вуглеводи, супроводжується зменшенням складу вуглеводів в культуральній рідині, збільшенням титруючої кислотності та загальної кількості летких жирних кислот. Накопичення останніх обумовлено також діяльністю амоніфікуючих бактерій, які здійснюють протеоліз білків та пептидів, а також дезамінування амінокислот. Ці процеси протікають на стільки інтенсивно, що практично весь білковий азот субстрату перетворюється в аміачний.

В кислій фазі бродіння метаноутворюючих бактерій практично немає; кількість їх зменшується після інокуляції з сотень тисяч до сотень клітин на 1 мл і залишається незмінною протягом першої фази. Розвиток цих бактерій відновлюється по мірі нейтралізації середовища і досягає (1 млрд. клітин на 1 мл) в лужній фазі. Розмноження метаноутворюючих бактерій супроводжується зменшенням вмісту летких жирних кислот та виділенням газу. Якщо не вносити нових продуктів першої фази бродіння, то по мірі виснаження в середовищі летких жирних кислот кількість метаноутворюючих бактерій зменшується на 2-3 порядки – до мільйона клітин на 1 мл. Однак шляхом регулювання швидкості введення свіжого субстрату можна досягти такого співвідношення процесів, при якому метанове бродіння буде протікати безперервно.

Високий вміст біологічно активних форм вітаміну B_{12} , які синтезуються при термофільному метановому бродінні ацетоно-бутилової та спиртової барди, поставило задачу удосконалення процесу з метою отримання високого та стабільного виходу вітаміну. Виходячи з цієї мети, були проведені дослідження по встановленню основних компонентів вітаміну B_{12} серед складного біоценозу бактерій здійснюючих анаеробний розклад вказаних субстратів.

Виявилось, що в першій фазі процесу накопичення вітаміну B_{12} йде дуже слабо. Первинний вміст його (130 мг/л) визначається кількістю, яка вноситься з інокулятом, а також знаходиться в барді. По мірі розвитку амоніфікуючих бактерій відбувається деяке збільшення кількості вітаміну B_{12} (до 600 мг/л).

Тільки з розмноженням метаноутворюючих бактерій починається швидке накопичення. Максимум синтезу кобаламідів (2200 мкг/л) співпадає з найвищою кількістю метаноутворюючих бактерій.

Таким чином, можна вважати, що основними продуцентами вітаміну В₁₂ в складному біоценозі, що здійснює анаеробний розпад органічних речовин, є метаноутворюючі бактерії, які синтезують вітаміну в 4-5 разів більше, ніж інші мікроорганізми цієї спільноти. Високе накопичення вітаміну В₁₂ бактеріями даної групи пов'язане з функцією цього вітаміну в життєдіяльності цих клітин.

Виявлена кореляція між розвитком метаноутворюючих бактерій і накопиченням вітаміну В₁₂ дозволила значно підвищити вихід вітаміну шляхом створення переважних умов для розвитку даної групи мікроорганізмів.

Відомо, що метаноутворюючі бактерії для свого розвитку вимагають специфічних субстратів, до яких відносяться нижчі жирні кислоти і нижчі спирти. Додавання названих субстратів до барди мало б забезпечити переважний розвиток метаноутворюючих бактерій, а збільшення їх чисельності призвести до більшого накопичення вітаміну В₁₂.

3. Отримання і застосування вітаміну В₁₂

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 окискобаламіну.

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 P₂O₆. Для запобігання розкладання вітаміну B₁₂ 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 B₁₂ використовується його здатність утворювати продукти з фенолом і резорцином. При цьому способі відділення вітаміну B₁₂ від супутніх йому факторів спрощується. Промисловий концентрат ціанкобаламіну обробляють водним розчином резорцину (або фенолу), виділяють комплекс вітаміну B₁₂ 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 B₁₂ використовують пропіоновокислі бактерії як у чистому вигляді, так і у вигляді концентрату, приготованого на молочній сироватці.

Для потреб тваринництва вітамін B₁₂ 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 H₂ і CO₂. 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 B₁₂-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°C і практично стерильна. Перед вступом до ферментера барда охолоджується до 55-57°C. В якості вихідної культури використовують змішану культуру метаноутворюючих бактерій, здійснюючих термофільне «метанове бродіння» стічних вод.

Отримання концентрату вітаміну B₁₂ 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 В₁₂ нестійкий при тепловій обробці, особливо в лужному середовищі. Тому перед виправними до метанової бражки додають НСІ до оптимального значення рН 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. 11.

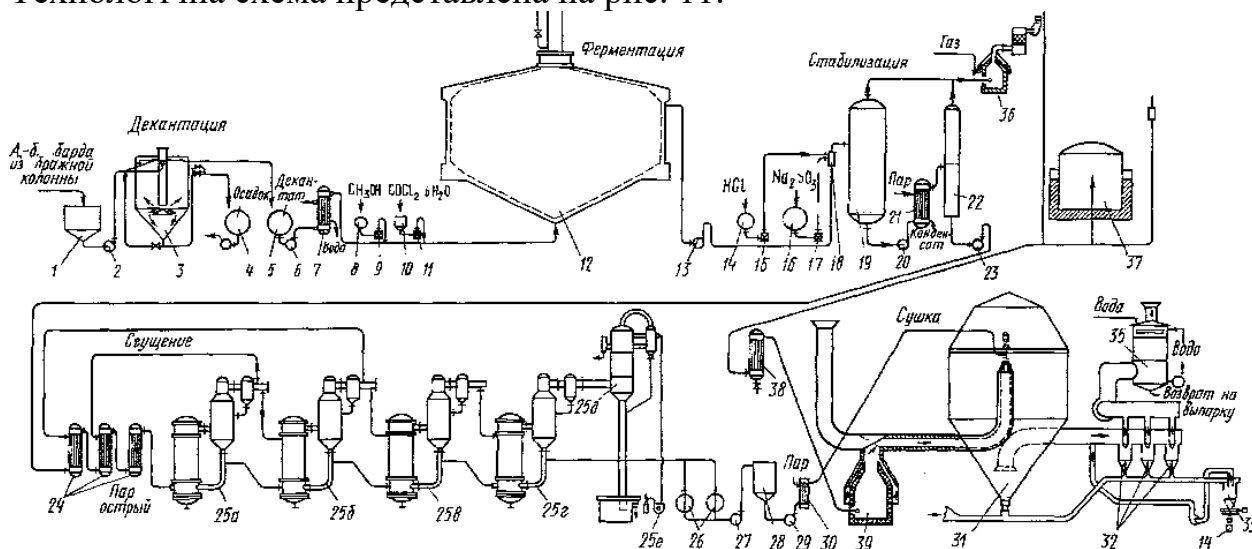


Рис. 11. Технологічна схема отримання концентрату вітаміну В₁₂ за допомогою змішаної культури метаноутворюючих бактерій.

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 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 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 – 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 підкисленні та нагріванні метанової бражки; 37 – газгольдер для газів бродіння; 38 – холодильник для відділення води з газів бродіння; 39 – газова піч розпилюючої сушарки.

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 гази бродіння, спалювані в печі 39. Сухий порошок надходить в бункер 33 і розфасовується в поліетиленові мішки, вкладені в крафт-пакети.

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.

Сухий концентрат КМБ-12, крім вітаміну В₁₂ (100 мг/кг препарату), містить ряд інших рістстимулюючих речовин. Особливо гарні результати в тваринництві отримують при поєднанні вітаміну В₁₂ з малими дозами антибіотиків, зокрема з біоміцином. Реалізація в нашій країні описаного способу та отримання концентрату вітаміну В₁₂ дозволили повністю забезпечити тваринництво цим вітаміном.

У США майже всі вироблювані комбікорми для свиней і птахів збагачують вітаміном В₁₂. Показано, що білок тваринного походження можна замінити рослинним білком при умові збагачення кормосумішей вітамінів В₁₂ в дозі 60 мкг/кг.

Українським науково-дослідним інститутом спиртової та лікеро-горілчаної промисловості розроблена технологія отримання кормового концентрату вітаміну В₁₂ шляхом зброджування м'ясно-спиртової барди змішаної культурою метаноутворюючих бактерій. Попередньо на м'ясно-спиртовій барді вирощують кормові дріжджі. Після сепарування дріжджів, отримують культуральну рідину, що містить 7-8% сухих речовин. На цій рідині вирощують метаноутворюючих бактерії і отримують з 1 м: 1 вихідної барди 1,5-2 г вітаміну В₁₂.

Культуральну рідину випарюють до змісту 60-70% сухих речовин, змішують з наповнювачем і висушують. У якості наповнювача використовують кукурудзяне борошно, висівки. Сухий концентрат розмелюють і розфасовують у мішки. В 1 кг кормового концентрату міститься: вітаміну В₁₂ 18-20 мг, В₂ 41 мг, РР 146 мг та інші вітаміни. Термін зберігання 12 міс. .

Випробування препарату багатьма науково-дослідними установами та господарствами показали ефективність його використання в свинарстві та птахівництві.

В останні роки в Японії продемонстрована можливість отримання вітаміну B_{12} з використанням іммобілізованих клітин пропіоновокислих бактерій, які в результаті мутацій виділяють вітамін в середу. Розробляються принципово нові методи біосинтезу вітаміну B_{12} шляхом трансформації хімічно близьких йому сполук, наприклад уропорфірину III клітинами пропіоновокислих бактерій і артробактера, а також отримання нових аналогів вітаміну B_{12} .

Тема 10**Виробництво органічних кислот****План****1. Характеристика лимонної кислоти та способів її отримання.****2. Біологічний синтез лимонної кислоти.****1. Характеристика лимонної кислоти та способів її отримання**

До початку двадцятих років минулого століття лимонну кислоту отримували з соку лимонів, таким чином задовольнялося близько трьох чвертей світової потреби в ній (вихід лимонної кислоти з однієї тонни лимонів становить 25 кг). Виробництво лимонної кислоти методом ферментації за участю грибів – давно відомий (з 1893 р.) біотехнологічний процес. Як продукт ферментації лимонна кислота займає друге місце за об'ємом виробництва у світі (400 тис. тонн на рік, що в грошовому еквіваленті становить близько 325 млн євро), поступаючись лише промислового спирту.

Незважаючи на значний прогрес у сфері органічного синтезу, на сьогодні лимонну кислоту отримують мікробіологічним синтезом, а саме шляхом лимонно-кислого бродіння солодких відходів цукрового виробництва – патоки (меляси), спричиненого пліснявими грибами роду *Aspergillus niger*, тому виробництво часто розташовують спільно з виробництвом цукру. Харчова промисловість традиційно є основним споживачем виробленої таким чином кислоти, оскільки продукти природного бродіння мають переваги порівняно з хімічно синтезованими та не містять токсичних для організму людини домішок. Лимонна кислота є широкоживаною нешкідливою харчовою добавкою (E330), крім того, її застосовують у медицині, кондитерській промисловості, друкарській справі тощо.

Одним з головних завдань у виробництві лимонної кислоти є досягнення її високого виходу.

Технологія виробництва кислоти застосовує різні джерела вуглецю та способи культивування мікроорганізмів (поверхневий та глибинний, періодичний та неперіодичний). Багато мікроорганізмів нагромаджує лимонну кислоту, зокрема види *Aspergillus awamori*, *A. fenicis*, *A. fonsecaeus*, *A. luchensis*, *A. fumaricus*, *A. wentii*, *A. saitoi*, *A. usami*, *A. phoenicus*, *A. lanosus*, *A. foetidus*, *A. flavus*. У промисловому виробництві лимонної кислоти широко застосовують гриби *A. niger*, оскільки цей вид дає високий вихід цільового продукту, з ним легко працювати, він відносно недорогий і цим самим робить виробничий процес економічно вигідним. Проте необхідно взяти до уваги, що до *A. niger* належить багато штамів, що відрізняються один від одного за своєю морфологією та біохімічними характеристиками: кольору спор та міцелію, розміру та кількістю спор, розміру міцелію, утилізації субстрату, ферментаційному часу, здатності продукувати лимонну кислоту на різних субстратах.

Промислове виробництво лимонної кислоти можна розглядати як процес, що складається з двох етапів – росту міцелію гриба та синтезу лимонної кислоти. На кожному з етапів культура чутлива до різних фізико-хімічних факторів, таких як склад та співвідношення компонентів середовища, аерація, рН середовища, температура тощо. Ефективний вплив тих або інших факторів, що стимулюють утворення лимонної кислоти грибом *A. niger*, значною мірою визначається фізіолого-біохімічними особливостями самої культури, а також технологічними параметрами процесу культивування.

Пригнічення синтезу в повноцінних поживних середовищах, що містять всі необхідні для росту і розвитку культури компоненти мінерального живлення, та активування синтезу в умовах лімітації середовища за певними компонентами свідчать про великі можливості культури до саморегуляції метаболізму залежно від умов культивування.

Біотехнологія отримання лимонної кислоти за участю мікроорганізмів охоплює такі основні етапи:

- 1) отримання посівного матеріалу;
- 2) підготовка сировини до ферментації;
- 3) підготовка та стерилізація повітря;
- 4) ферментація;
- 5) відокремлення біомаси продуцента від культуральної рідини;
- 6) екстракція лимонної кислоти з культуральної рідини та отримання її у вигляді кристалів.

Промислове виробництво лимонної кислоти можна здійснювати трьома різними способами: поверхневим культивуванням грибів, глибинним культивуванням і твердофазною ферментацією, що має назву «процес Коджі».

Поверхневий спосіб культивування є найпростішим. Він передбачає застосування стерильного рідкого середовища. Приготування середовища відбувається у спеціальних чанах. Після стерилізації та охолодження середовище подається насосами до кювет завтовшки 12-18 см. Кювети розташовуються на стійках в асептичних ферментаційних камерах, де контролюються такі параметри: температура, початкове та кінцеве значення рН, час проростання спор, час ферментації, вологість повітря. За допомогою спеціального обладнання шляхом розпилювання до середовища додають посівний матеріал – спори *A. niger*. Спори проростають і утворюють плівку міцелію. Через добу тонка плівка міцелію набуває сіро-білого кольору. За декілька днів вона стає товстішою. Початкова температура підтримується в діапазоні 28-30°C, відносна вологість становить 40-60 %. У період активного росту міцелію температура повинна бути в діапазоні 34-35°C за помірної аерації. У період активного утворення лимонної кислоти температура знижується до 32-34 °C, а подача кисню збільшується в 3-4 рази. Початкове значення рН середовища становить 5,0-6,0, а кінцеве – 1,0-2,0. Процес ферментації становить 8-12 днів, після чого культуральна рідина відділяється від біомаси гриба та використовується для екстракції лимонної кислоти.

За глибинного культивування процес ферментації відбувається у спеціальних біореакторах з мішалкою (ферментерах). Низьке значення рН під час ферментації та сама лимонна кислота спричиняють корозію, тому

внутрішня частина біореактора виготовляється з матеріалу, стійкого до корозії.

Важливою умовою у виборі біореактора для виробництва лимонної кислоти є забезпечення системою аерації, що здатна підтримувати високий рівень розчинного кисню.

Процес отримання лимонної кислоти з використанням *A. niger* проводиться в ферментерах об'ємом 100 м³. Як посівний матеріал використовують конідії гриба в об'ємі 10 м³. Попередньо до ферментера подають стерильне та охолоджене поживне середовище. Після проростання спор підсилюють аерацію. За оптимальних умов процес ферментації становить 5-10 днів за постійної аерації та температури 31-32°C. Необхідним є додавання піногасника, оскільки під час перемішування утворюється піна.

Твердофазну ферментацію, або процес Коджі, було розроблено в Японії і вона є найпростішим способом у виробництві лимонної кислоти порівняно з іншими методами. Як сировину використовують рисові та пшеничні висівки, фруктові та овочеві відходи. Зволожений субстрат стерилізується, розливається у кювети та інокулюється спорами гриба. На початку ферментації рН становить 5,5. Ферментація триває 4-5 днів.

Поверхневий та глибинний методи продовжують співіснувати, але на сьогодні значну увагу надають глибинному методу. Глибинний метод дає змогу застосовувати широкий набір вуглецевмісної сировини. До того ж ферментація ведеться в стерильних умовах, що є важливою передумовою для переходу на безперервний, повністю механізований процес.

За глибинного методу швидкість ферментації є високою – в одному апараті (біореакторі) одразу утворюється велика кількість культуральної рідини, а за поверхневого – вона збирається по численних кюветах. Поверхневий спосіб має такі переваги: висока концентрація лимонної кислоти у культуральній рідині; значно менше утворюється побічних кислот, внаслідок чого зменшуються затрати меляси на ферментацію та легше виділити лимонну кислоту в чистому вигляді, і як наслідок – низька собівартість лимонної кислоти, низькі затрати енергії на виробничий процес.

Витрати на обслуговуючий персонал більші за поверхневого способу, оскільки підготовка камер і зняття міцелію з кювет потребує значних затрат ручної праці. Перевагами твердофазної ферментації є низькі затрати на утилізацію відходів та низькі енергозатрати, високий вихід продукту, низький рівень контамінації через високий рівень вологості в біореакторі, використання поживного середовища спрощеного складу.

Вадами такого методу ферментації є труднощі, які виникають під час контролю рН та складу поживного середовища, високі затрати на виділення кислоти в чистому вигляді через високий вміст домішок у продукті.

Поживне середовище для біосинтезу лимонної кислоти має містити джерела вуглецю, азоту, фосфору та мікроелементів, що є необхідними для росту продуцента-мікроорганізму та для самого процесу нагромадження лимонної кислоти.

Вид джерела вуглецю та його концентрація мають великий вплив на вихід лимонної кислоти. Зазвичай, лимонну кислоту виготовляють шляхом

ферментації з використанням дешевої та неочищеної природної сировини, такої як гідролізат крохмалю, бульйон цукрової тростини, меляси, рослинних відходів сільського господарства і механічного перероблення деревини. Переважно як джерело вуглецю для мікробного виробництва лимонної кислоти використовують мелясу завдяки її низькій вартості та високому вмісту цукру (40-55%), достатньої кількості мікроелементів, амінокислот та вітамінів, необхідних для нормальної життєдіяльності продуцента. Меляса – побічний продукт цукрового виробництва, що утворюється внаслідок відділення кристалів сахарози на центрифугах під час її кристалізації.

Меляса переважно (на 65-80%) складається з сухих речовин, а 20-25% становить вода. Якісний та кількісний склад меляси значно варіює, тому не всі види меляси придатні для виробництва лимонної кислоти. Склад меляси залежить від різновиду цукрових буряків, технології виробництва цукру, умов зберігання та транспортування (виду транспорту, температури).

У мелясі є мікроелементи, кількість яких сильно коливається, що може впливати як на ріст продуцента, так і на вихід лимонної кислоти. Вміст мікроелементів у мелясі залежить від різновиду цукрових буряків. Алюміній, залізо та стронцій можуть міститися як в макро-, так і мікрокількостях.

Вміст амінокислот у мелясі залежить від клімату, типу ґрунтів, умов культивування цукрового буряку.

Вітаміни важливі для стимуляції росту продуцента та біосинтезу лимонної кислоти.

У мелясі є також інші речовини, що містяться в малих кількостях, але достатніх для того, щоб мати негативний вплив на синтез кислоти. Це пестициди, фунгіциди та гербіциди, що використовуються у вирощуванні цукрових буряків, а також речовини, які застосовуються як піногасник у процесі виробництва цукру. Ці речовини є токсичними, тому перед використанням меляси як сировини її очищують хімічним шляхом.

Через високий вміст глюкози (40-45%) як субстрат можливе застосування гідролізу. Це побічний продукт, що утворюється під час виробництва кристалічної глюкози з крохмалю.

За концентрації метанолу 1,5% та етанолу 1% у середовищі продуцентом *A. niger M-101* отримується 49,33 г/л та 40,85 г/л лимонної кислоти відповідно. Метанол та етанол в оптимальних умовах збільшують проникність клітинної мембрани *A. niger M-101*, що призводить до нагромадження лимонної кислоти в середовищі.

Оскільки число біодизельних заводів у світі, зокрема в Україні, росте, гліцерин як відхід виробництва біопалива стає легко доступним у великому промисловому масштабі. Низька ціна неочищеного гліцерину робить його привабливою сировиною для виробництва лимонної кислоти. Виключно важлива роль у процесі мікробіологічного синтезу лимонної кислоти належить азоту, що є важливим не тільки для підтримки певного рівня метаболізму клітини, а й входить до складу клітинних білків. Його дефіцит є одним із основних чинників, що зумовлює нагромадження в середовищі лимонної кислоти, оскільки за цих умов затримується ріст міцелію і формування біомаси.

Використання відходів сільського господарства є економічно вигідним та дає змогу вирішувати екологічні проблеми. У таблиці 10 наведено вихід лимонної кислоти різними штамами *Aspergillus niger* з використанням відходів сільського господарства та харчової промисловості.

Таблиця 10

Біосинтез лимонної кислоти з використанням відходів сільського господарства та харчової промисловості

Субстрат	Продуцент	Вихід лимонної кислоти
Харчові відходи	<i>A. niger</i> (UV 60)	45,5 г/кг
Пшеничні висівки	<i>A. niger</i> CFTRI 30	85 г/кг
Меляса	<i>A. niger</i> ATCC 942	35 г/кг
Жом цукрової тростини	<i>A. niger</i> CFTRI 30	174 г/кг
Рисові висівки	<i>A. niger</i> CFTRI 30	127 г/кг

У разі використання меляси, потреба в додаванні азоту до середовища відпадає, оскільки меляса містить достатню кількість органічних і неорганічних сполук азоту. Азот меляси існує у вигляді бетаїну (близько 60-70% від загального азоту), амінокислот (20-30% азоту), білків (3-4% азоту), а також у вигляді нітрату амонію та амідів. Оптимальна концентрація азоту в середовищі, необхідного для синтезу лимонної кислоти, становить 0,1-0,4 г/л.

Доцільніше використовувати солі амонію у вигляді $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Його утилізація супроводжується зниженням рН середовища нижче 2,0, що є необхідним для продукування лимонної кислоти.

Високий вихід лимонної кислоти (89,64 г/л) можна отримати за концентрації NH_4NO_3 у середовищі 0,2%. У разі збільшення або зменшення цієї концентрації відбувалося пригнічення росту гриба і, як наслідок – низький вихід лимонної кислоти.

Фосфор, як і азот, – один із основних елементів харчування. Фосфор відіграє важливу роль у метаболізмі мікроорганізму. Він входить до складу нуклеїнових кислот, фосфопротеїнів, фосфоліпідів та ряду коферментів, що беруть участь у синтезі АДФ та АТФ, у розмноженні клітин і продукуванні первинних та вторинних метаболітів. Джерелом фосфору може бути ортофосфорна кислота, її солі та фосфоровмісні сполуки. Під час виробництва лимонної кислоти до поживних середовищ зазвичай додають гідрофосфат калію у концентрації 0,06-0,32 г/л, що, своєю чергою, слугує ще й джерелом калію. За нестачі фосфору в середовищі порушується засвоєння грибом азоту та сповільнюється синтез вітамінів (тіаміну, рибофлавіну та нікотинової кислоти). Надлишок фосфору зумовлює посилення газообміну та зниження активності кислотоутворення. Оптимальна концентрація фосфору в середовищі для гриба становить від 0,5 до 5,0 г/л.

2. Біологічний синтез лимонної кислоти

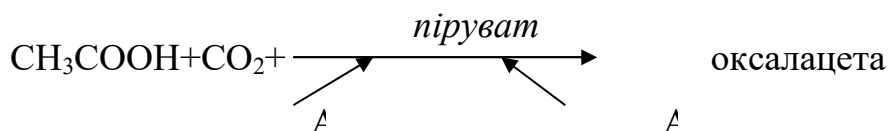
Продуцент лимонної кислоти повинен мати певні характеристики, а саме:

- високу швидкість кислотоутворення;
- високий ступінь трансформації джерела вуглецю у лимонну кислоту;
- генетичну однорідність та стабільність;
- толерантність до зміни температури та контамінантів середовища, зокрема до високих концентрацій вуглеводів.

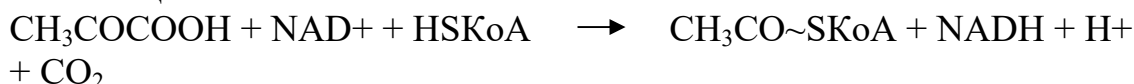
Під час культивування продуценту має бути низький вихід побічних продуктів (щавлевої, глюконової кислот, невикористаних вуглеводів). Перерахованим критеріям, крім *Aspergillus niger*, відповідають гриби *Trioderma viride*, *Penicillium janthinellum*, дріжджі *Candida tropicalis*, *C. olephila*, *C. citroformans*, *Yarrowia lipolytica*, бактерії *Corynebactreium*, *Arthrobacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus licheniformis*.

Біосинтез лимонної кислоти – це регульований процес, який значною мірою залежить від складу поживного середовища та його фізико-хімічних параметрів. Лимонна кислота є первинним метаболітом *A. niger*. Зазвичай, первинні метаболіти необхідні для росту та життєдіяльності продуценту.

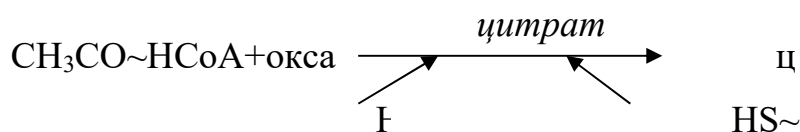
Метаболічним шляхом вироблення лимонної кислоти в аеробних організмів є цикл трикарбонових кислот (ЦТК). Внаслідок гліколізу з глюкози формується дві молекули піровиноградної кислоти (пірувату). Далі відбувається ферментативне зв'язування однієї молекули пірувату з діоксидом вуглецю з утворенням оксалацетату (щавлевооцтової кислоти):



Внаслідок окисного декарбоксилювання іншої молекули пірувату утворюється ацетил-КоА:



ЦТК починається з реакції конденсації оксалацетату з ацетил-КоА, внаслідок якої за участі ферменту цитратсинтази утворюється лимонна кислота:



Окрім фосфору необхідними елементами в мікрокількостях є сірка, калій, кальцій. Певний вплив на процес синтезу лимонної кислоти мають марганець, залізо та фосфор, магній та мідь. Марганець у концентрації 3 мг/л сильно зменшує вихід лимонної кислоти. Міцелій гриба, що росте на середовищі з цинком, продукує більше лимонної кислоти, ніж у середовищі без цинку. Вміст цинку має підтримуватися на рівні $1,5 \times 10^{-4}\%$ (у розрахунку на ZnSO_4).

Достатня для росту гриба та синтезу лимонної кислоти концентрація заліза становить $2 \times 10^{-6}\%$. За високого вмісту заліза в середовищі відбувається гальмування біосинтезу лимонної кислоти. Магній необхідний як для росту гриба, так і для нагромадження лимонної кислоти. Оптимальною концентрацією сульфату магнію є 0,020-0,025%.

Значний вплив на синтез лимонної кислоти та самого продуцента має рН. Початкове значення рН має бути чітко визначеним та оптимізованим залежно від мікроорганізму, середовища та технології виробництва. Процес ферментації розпочинається з проростання спор гриба, тому оптимальним рН середовища на початку ферментації має бути 5,0. Для продукування лимонної кислоти рН має бути низьким ($\text{pH} \leq 2$), що знижує ризик зараження продуцента та ферментаційного середовища патогенними мікроорганізмами, інгібує виробництво небажаних органічних кислот (глюконової, щавлевої) та значно полегшує процес виділення лимонної кислоти з маточного розчину. Оптимальне рН для синтезу лимонної кислоти становить 1,0-2,0. Збільшення рН до 4,5 на стадії синтезу лимонної кислоти знижує вихід кислоти на 80%. рН може змінюватися у відповідь на метаболічну активність продуцента. *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.* швидко знижують рН ($\text{pH} < 3$). Для інших родів грибів (*Trichoderma*, *Sporotrichum*, *Pleurotus*) рН є стабільним у межах 4,0-5,0.

Рівень аерації може мати згубний вплив на вихід продукту. Оскільки виробництво лимонної кислоти – це аеробний процес, тому постачання кисню має значний вплив на виробничий процес. Аерація має відбуватися протягом всього ферментаційного процесу з однаковою інтенсивністю. Високий рівень аерації призводить до утворення піни, особливо у період росту міцелію, тому необхідно застосовувати піногасники. CO_2 є субстратом для ферменту піруваткарбоксилази, який поповнює пул оксалацетату в ЦТК. Підвищений рівень CO_2 має негативний вплив на кінцеву концентрацію цитрату та біомаси.

Протягом всього процесу ферментації необхідно підтримувати оптимальну температуру. Вища за оптимальну температура призводить до денатурації ферментів, надмірної втрати вологи, пригнічує ріст продуцента, тоді як низька температура призводить до зниження метаболічної активності. Більшість гіфоміцетів, до яких належить *A. niger*, є мезофілами, і тому оптимальною температурою для них є 25-35°C.

Час ферментаційного процесу залежить від штаму, що використовується, хімічного складу середовища, ферментаційної системи і, зазвичай, від умов, за яких відбувається ферментація. За поверхневого способу виробництва процес ферментації завершується через 10-20 днів, тоді як за глибинного способу – через 5-10 днів. Збільшення періоду ферментації не підвищує виходу лимонної кислоти.

Отже, біосинтез лимонної кислоти охоплює реакції гліколізу та низку реакцій, замкнених в ЦТК, що у еукаріотів, зокрема й *A. niger*, відбувається в мітохондріях. Після синтезу цитрат може бути виділений з клітини, якщо перешкоджати наступному етапу ЦТК – утворенню ізолимонної кислоти.

Тема 11**Мікробіологічне виробництво кормових антибіотиків****План**

- 1. Загальна інформація про антибіотики.**
- 2. Утворення антибіотиків в промислових умовах.**
- 3. Технологічна схема виробництва кормового антибіотика.**
- 4. Промислове отримання антибіотиків.**
- 5. Застосування антибіотиків.**

1. Загальна інформація про антибіотики

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.

Специфічність зазначених продуктів обміну полягає в тому, що, по-перше, антибіотики на відміну від таких продуктів життєдіяльності, як, наприклад, спирти, органічні кислоти, перекисі і деякі інші, також пригнічують ріст окремих видів мікроорганізмів, мають високу біологічну активність. Так, для пригнічення росту грампозитивних бактерій (мікрококів, стрептококів, диплококів, та ін.) потрібна мінімальна концентрація антибіотика еритроміцину, рівна всього 0,01–0,25 мкг/мл. Звичайно, при таких мізерно малих концентраціях спирту або органічної кислоти ніякого інгібуючого бактерії ефекту бути не може. По-друге, антибіотичні речовини мають вибірковість біологічної дії. Це означає, що не всі організми, перебуваючи в контакті з антибіотиком, виявляються чутливими до його дії. У цьому зв'язку мікроорганізми діляться на дві групи: чутливі до певних антибіотиків та резистентні (стійкі) до них.

Одні антибіотики пригнічують ріст невеликого числа видів мікроорганізмів, інші ж пригнічують ріст багатьох видів мікроорганізмів. Виходячи з цієї особливості антибіотиків, їх розділяють на дві групи: антибіотики вузького спектру дії і антибіотики широкого спектру біологічної дії. До першої групи належать бензилпеніцилін (пеніцилін G), новобіоцин,

гризеофульфін та інші антибіотики, що пригнічують зростання обмеженого і невеликого числа видів або навіть штамів чутливих мікроорганізмів. До другої групи антибіотиків, володіють широким спектром дії, відносяться тетрациклін, хлорамфенікол, трихотецин та ін. Антибіотики другої групи подавляють розвиток багатьох видів бактерій і великих вірусів.

Утворені в процесі життєдіяльності організмів антибіотики можуть накопичуватися всередині клітин їх продуцентів і лише в невеликій кількості виділятися в навколишнє середовище (граміцидин С, ендоміцин та ін.), можуть міститися як у середині клітин, так і виділятися в навколишнє середовище (ристоміцин, кандіцидин) або переважно виділятися в середу і лише частково міститися в клітинах продуцента (стрептоміцин, тетрациклін, макроліди, новобіоцин і багато інших).

Отже, антибіотики – це дійсно специфічні речовини, що утворюються в процесі життєдіяльності організмів. Вони представляють собою кінцеві продукти метаболізму клітин. Особливість утворення антибіотичних речовин – спадково закріплений тип обміну речовин їх продуцентів. Іншими словами, кожний антибіотик може утворитися одним або декількома, але цілком визначеними штамми (видами) мікроорганізмів (в випадку утворення цих зв'язків мікроорганізмами). Відповідний вид (штамм) мікроорганізма може синтезувати в процесі життєдіяльності один чи декілька відповідних антибіотиків.

Антибіотичні речовини утворюються не тільки в лабораторних умовах розвитку продуцентів цих біологічно активних зв'язків. Вперше прямими дослідженнями Д. Г. Звягінцевим, К. А. Виноградовой і ін. Було показано, що антибіотики можуть утворитися безпосередньо в ґрунті. На прикладі *Streptomyces olivocinereus*, утворюючим люмінесцентний антибіотик геліоміцин, були отримані переконливі докази біосинтезу антибіотика безпосередньо при розвитку актиноміцета в ґрунті.

Утворюючись в природних умовах, антибіотики зберігаються певний час в ґрунті і проявляють помітний екологічний ефект, вони служать засобом адаптації для своїх продуцентів. Однією з функцій цих біологічно активних речовин, утворених кліткою, є їх захисна роль в процесі боротьби за існування. Антибіотики виступають в якості фактора антагонізму. Разом з тим необхідно мати на увазі, що антагонізм серед мікроорганізмів може проявлятися не тільки в результаті утворення антибіотиків, а й завдяки іншим факторам. Тому продукування антибіотичних речовин – це лише одна з форм прояву антагоністичних взаємин у світі мікроорганізмів.

До теперішнього часу описано близько 6000 антибіотичних речовин, утворених різними групами організмів та отриманих в результаті хімічної модифікації основних структур ряду антибіотиків. Найбільше число антибіотиків (більш 3000) утворюються актиноміцетами. Опис нових антибіотичних речовин, синтезованих актиноміцетами, продовжується.

Антибіотики – представники різних класів хімічних сполук – від досить простих ациклічних сполук до вельми складних структур типу поліпептидів і актиноміцинів.

2. Утворення антибіотиків в промислових умовах

Отримання антибіотичних речовин в промислових умовах здійснюється в основному в результаті біологічного синтезу або шляхом хімічної модифікації отриманих в процесі біосинтезу молекул цих фізіологічно активних сполук. І лише поодинокі антибіотики (наприклад, хлорамфенікол) одержують хімічним синтезом.

Продуцентами антибіотиків, що випускаються промисловістю є власне бактерії, актиноміцети, міцеліальні гриби.

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. polyrnuxa* і *Bac. circulans*; бацитрацини, синтезовані *Bacillis 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(С), D), які відрізняються амінокислотним складом; *поліміксини* (включають 22 форми, в тому числі А₁, А₂, В₁, В₂, С, D₁, D₂ Е₁ (колістин А), Е₂ (колістин В), М, Р₁, Р₂. До складу поліміксинів 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 *Streptomyces fradiae*, *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:

хлортетрациклин, 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*, *Stt. 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 – Ансаміцини. Антибіотики, що відносяться до ансаміцинам, утворюються актиноміцетами і деякими видами вищих рослин.

Антибіотики, утворювані міцеліальними грибами. Міцеліальні гриби утворюють відносно велике (близько 1200) число антибіотичних речовин. Найбільший інтерес представляють пеніциліни, цефалоспорини, гризеофульвін, трихотецин, фумагілін і деякі інші продукти життєдіяльності грибів, використовувані в медичній і сільськогосподарській практиці.

Пеніциліни утворюються певними видами *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. nigricans* та ін.) і деякими видами *Aspergillus* (*Asp. flavus*, *Asp. lavipes*, *Asp. Nidulans* та ін.). Основним організмом, застосовуваним для отримання антибіотика є *Pen. chrysogenum*. Гриб в процесі життєдіяльності утворює різні форми пеніцилінів, що відрізняються будовою бічного ланцюга молекули антибіотика, біологічною активністю і спектром протимікробної дії.

Фумагілін – один з небагатьох грибних антибіотиків, що відносяться до групи полієнових сполук, характерною особливістю яких є наявність системи пов'язаних подвійних зв'язків ($\text{CH} = \text{CHCH} = \text{CHCH} = \text{CHCH}-$). Фумагілін утворюється культурою *Aspergillus fumigatus*.

3. Технологічна схема виробництва кормового антибіотика

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 ССРСР 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. 12 показана класична схема виробництва лікувального пеніциліна.

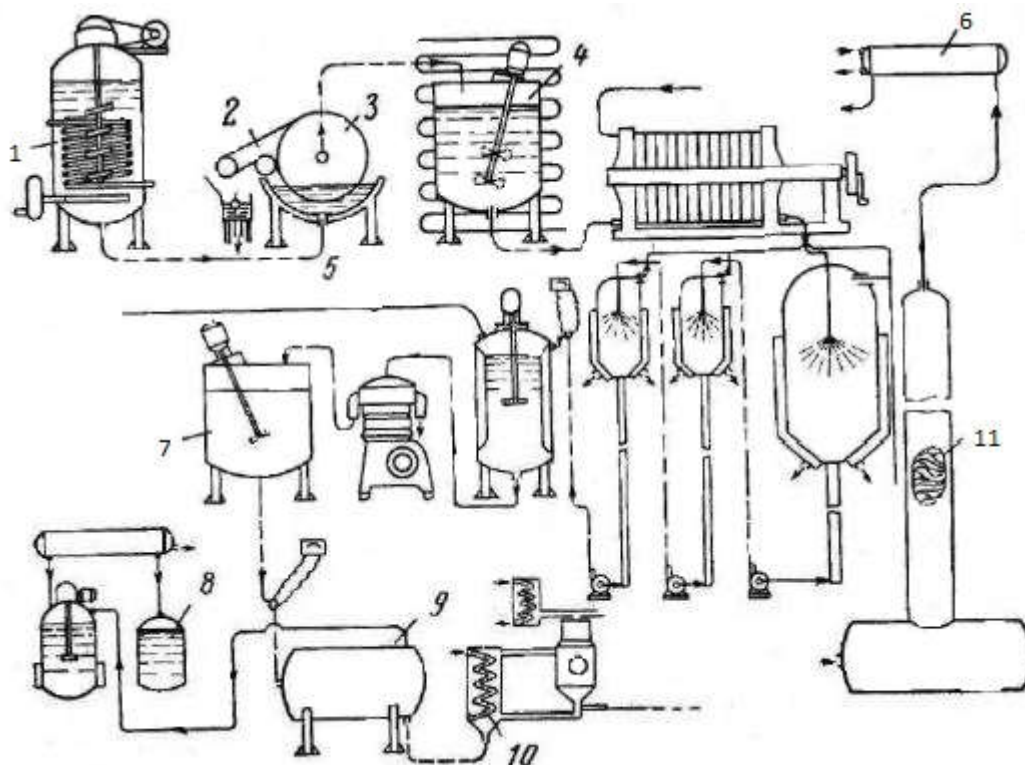


Рис. 12. Технологічна схема виробництва лікувального пеніциліну

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.

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 В₁₂.

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.

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

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°C. 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°C. Потім його розкладають на стелажах, охолоджують до 25°C 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.

4. Промислове отримання антибіотиків

Широке застосування антибіотиків у медицині, сільському господарстві та інших галузях народного господарства поставило завдання, отримання цих біологічно активних речовин у масових масштабах. Вирішення цього завдання стало можливим завдяки створенню потужної антибіотичною промисловості.

В основі промислового виробництва антибіотиків лежить ряд послідовних етапів: отримання високопродуктивних штамів-продуцентів, розробка найбільш сприятливих умов культивування продуцента антибіотика з максимальним біосинтезом цієї речовини, підбір і впровадження в практику відповідних методів виділення і очищення антибіотика, створення готових препаратів та контроль їх якості. Кожен з цих етапів має забезпечуватися відповідними фахівцями (генетиками, мікробіологами, технологами та ін.). Виробництво антибіотиків займає одне з провідних місць у виробництві лікарських препаратів. Особливо широко воно розвинене в США, Англії, Японії, Франції, Італії та інших країнах. Наприклад, в США щорічно випускається антибіотиків та їх похідних на сотні мільйонів доларів.

Підготовка середовища для культивування продуцента антибіотика і посівного матеріалу (1-а стадія). Для кожного продуцента антибіотика розробляється своє оптимальне середовище, яке повинне відповідати таким основним вимогам: а) забезпечувати гарне зростання продуцента і максимально можливе утворення антибіотика, б) містити доступні і дешеві компоненти, в) мати гарну фільтруючу здатність, г) забезпечувати використання найбільш економічних і ефективних прийомів виділення і очищення антибіотика. Стерилізація живильних середовищ в промислових умовах здійснюється двома основними методами: періодичним і безперервним.

Періодичний метод стерилізації застосовується при використанні невеликих обсягів середовища і полягає в тому, що середовище нагрівається до певної температури (120-130°C) безпосередньо в ферментерах або в спеціальних котлах-стерилізаторах, витримується при цій температурі протягом 30-60 хв. (залежно від обсягу середовища та її складу), після чого середовище охолоджується до 27-30°C.

Безперервний метод стерилізації доцільно застосовувати при використанні великих обсягів середовища. Приготовлене середовище за

допомогою насоса подається в стерилізаційну колонку, через яку пропускається гострий пар (тиск пари близько 5 атм). Пара подається зверху по внутрішній трубі, що має щілиноподібні прорізи, завдяки чому пар надходить в середу і швидко її нагріває. Середовище в колонку подається знизу й рухається по спіралі навколо внутрішньої труби.

Нагріта в колонці до необхідної для стерилізації температури (близько 130°C) середовище надходить у спеціальний прилад-видержувач, де вона при температурі 125–130°C витримується визначений час. Час витримки залежить від складу середовища і становить 5–10 хв. З витримувача стерильне середовище надходить в змієвиковий холодильник. Тут вона охолоджується до 30–35°C (на виході) і подається в ферментер.

Безперервний метод стерилізації має ряд переваг перед періодичним методом: можливість автоматичного регулювання процесу, швидкий і рівномірний нагрів середовища, забезпечення більш повної стерильності середовища та інші фактори.

Підготовка посівного матеріалу – одна з найвідповідальніших операцій у циклі біологічного методу отримання антибіотиків. Кількість і якість посівного матеріалу визначають розвиток культури в ферментері і біосинтез антибіотика. Продуцент антибіотика зазвичай вирощується на багатих за складом середовищах, здатних забезпечити найвищу фізіологічну активність мікроорганізмів.

Біосинтез антибіотика (2-а стадія). Біосинтез антибіотика – основна біологічна стадія в процесі отримання антибіотика. Завдання цієї стадії – забезпечення для продуцента антибіотика таких умов розвитку, які б сприяли максимальному рівню біосинтезу антибіотика.

Ефективність стадії біосинтезу залежить від рівня утворення антибіотика організмом: визначається генетичними особливостями організму, складом живильного середовища, режимом розвитку продуцента. Вона також залежить від часу максимального утворення антибіотичної речовини, вартості компонентів середовища, включаючи вартість попередника, піногасників, енергетичних витрат, пов'язаних з процесом розвитку організму-продуцента антибіотика. У енергетичні витрати включаються витрати енергії (і її вартість), пов'язані зі стерилізацією середовища, ферментера і комунікацій, з переміщенням культуральної рідини, продуванням повітря через неї, та інші процеси.

У сучасних умовах розвитку промислової мікробіології найбільш перспективним методом вирощування мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків або інших біологічно активних сполук є метод глибиного культивування. При виробництві антибіотиків використовують періодичне і безперервне культивування продуцентів цих біологічно активних речовин.

Для отримання антибіотиків у промислових масштабах застосовуються спеціальні герметично закриті ємності або ферментери, що забезпечують глибинне вирощування продуцентів.

Ферментер – це досить складний апарат, який забезпечує хороші умови для глибинного розвитку продуцента і біосинтезу їм антибіотика: забезпечений пристосуваннями для достатньої аерації і перемішування

культури, підтримки необхідної температури, а також контрольно-вимірювальними приладами (Рис. 13).

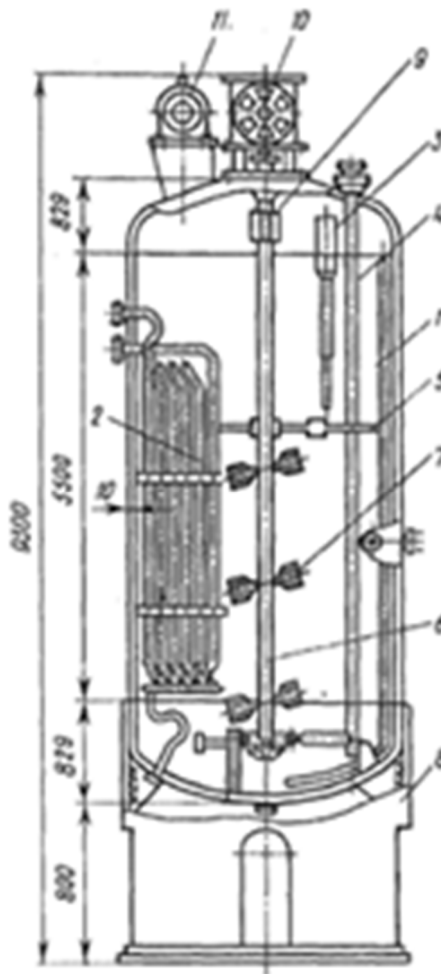


Рис. 13. Ферментер для глибинного вирощування продуцентів антибіотиків.

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

Останнім часом випускаються ферментері з автоматизованою системою контролю.

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 змієвиків. Змієвики

використовуються також для подачі пари в процесі стерилізації або води для охолодження.

Спостереження за основними процесами життєдіяльності організму здійснюється контрольно-вимірювальною 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 вугіллем.

Підготовка посівного матеріалу – процес багатоступінчастий. Мікроорганізм попередньо вирощують на агаризованному середовищі в пробірці, потім з пробірки висівають у колби з рідким живильним середовищем і проводять дві генерації при глибинному вирощуванні на гойдалках протягом 2-3 доби для кожної генерації. З другої генерації культури (в колбі) роблять посів у невеликий (10 л) інокулят, а потім добре розвунену культуру переносять в більший інокулят (100-500 л), звідки і проводять посів в основний ферментер. Для посіву в основний ферментер використовують від 5 до 10 об'ємних відсотків посівного матеріалу (інокулята).

Попередня обробка культуральної рідини (3-я стадія). У процесі розвитку мікроорганізмів-продуцентів антибіотиків ці речовини в більшості випадків майже повністю виділяються з клітин в навколишнє середовище. Проте в деяких випадках лише частина антибіотика виділяється в культуральну рідину, а інша частина зберігається всередині клітин. У деяких продуцентів антибіотик майже повністю міститься в клітинах організму.

Залежно від того, де антибіотична речовина зосереджена, застосовують відповідні методи його вилучення. Так, якщо антибіотик знаходиться в культуральній рідині, його виділяють методами екстракції розчинниками, що не змішуються з рідкою фазою, або осаджують у вигляді нерозчинного з'єднання, або сорбують іонообмінними смолами.

Виділення антибіотика з клітин мікроорганізмів здійснюють за допомогою екстракції органічними розчинниками. Якщо антибіотик міститься в культуральній рідині і в клітинах продуцента, первинною операцією його виділення є переклад антибіотика у фазу, з якої найбільш доцільно його ізолювати. Для цього антибіотик, який міститься в культуральній рідині, і клітини з антибіотичним речовиною переводять в осад, а потім антибіотик екстрагують.

Виділення нативного розчину від біомаси і зважених частинок проводять методами фільтрації або центрифугування. При цьому застосовують заходи для забезпечення кращої фільтрованості культуральної рідини (кислотну або теплову коагуляцію, обробку електролітами, внесення різних добавок та ін.). Для процесу фільтрації застосовують різні фільтруючі апарати: фільтр-прес, нутч-фільтр, друк-фільтр, центрифуги, сепаратори.

Фільтр-преси застосовуються для обробки великих обсягів культуральної рідини. Ці апарати складаються з ряду послідовних плит і рам і фільтруючих перегородок між ними. Процес фільтрації здійснюється під тиском.

Для фільтрації невеликих обсягів культуральної рідини зазвичай використовують нутч-фільтри або друк-фільтри. Перший апарат працює під вакуумом, другий - в умовах підвищеного тиску над фільтрується рідиною.

Для отримання рідини, звільненої від зважених часток, широке поширення знайшов спосіб центрифугування. Хороші результати досягаються при правильному виборі швидкості подачі рідини (кращий варіант – 15000 об/хв).

Виділення міцелію або інших зважених часток може також відбуватися в сепараторах. При швидкості обертання барабана сепаратора, рівної 7000-7500 об/хв, завдяки відцентрової сили тверді частинки спрямовуються до стінок барабана і осідають там, а відсепарована рідина йде до центру барабана і піднімається в спеціальну камеру.

Виділення та очищення антибіотика (4-а стадія). В процесі утворення антибіотика в культуральну рідину поряд з присутністю в ній різних невикористаних компонентів середовища виділяються і різні продукти обміну, вона збагачується продуктами автолізу клітин. Видалення домішок – перша і дуже важлива стадія хімічного очищення антибіотика.

Стадія виділення і хімічного очищення включає ряд процесів: від обробки нативного розчину до сушки готового очищеного препарату. На цій стадії в залежності від властивостей антибіотика, його хімічної будови і місця основного накопичення застосовують різні методи виділення і очищення. В якості основних методів використовують екстракцію, осадження, сорбцію на іонообмінних матеріалах, упарювання, сушку.

Однією з особливостей стадії виділення і хімічного очищення є те, що при виділенні антибіотиків доводиться працювати з вельми невисокими концентраціями виділеної речовини (що не перевищують одного відсотка). Наприкінці стадії хімічного очищення вже мають справу з більш високими концентраціями антибіотика, що досягають 20–30%. Мета хімічного очищення – витяг антибіотика з нативної рідини або з клітин продуцента.

Метод екстракції. Нерідко в цілях очищення антибіотика від різних домішок його багаторазово переводять з одного розчинника в інший з попереднім осадженням (кристалізацією). Такий прийом носить назву перекристалізація.

Монообміна сорбція. Метод полягає в тому, що при пропущенні водних розчинів антибіотиків, які є за хімічною природі кислотами, основами або амфотерними сполуками, через колонки з відповідними іонообмінними смолами вони сорбуються на них, а розчин з частиною домішок, мають протилежний антибіотика заряд, проходить через колонку. Смоли залежно від позитивного або негативного заряду іона в них називають катіонідами або аніонідами. Антибіотик у вигляді негативно зарядженого іона буде сорбуватися на катіоніді смоли, і навпаки. Адсорбований на смолі антибіотик елюють (десорбують), в результаті чого отримують значно очищений і сконцентрований препарат. Потім розчин препарату можна знову пропустити через іонообмінну смолу, але з протилежним зарядом. При цьому домішки осядуть на смолі, а розчин більш очищеного антибіотика пройде через колонку.

Метод осадження – заснований на тому, що антибіотик пов'язують з органічними або неорганічними речовинами з метою отримання з'єднання, що випадає в осад. Отриманий осад з допомогою фільтрів або центрифугування відокремлюють від нативного розчину, промивають і в ряді випадків висушують, після чого утворене з'єднання розкладають і антибіотик екстрагують або знову осаджують (кристалізують).

Отримання готової продукції, приготування лікарських форм, розфасовка (5-а стадія). Відомо, що до антибіотиків, використовуваним в медичній практиці, пред'являються дуже високі вимоги (висока ступінь очищення, стерильність препарату та ін.). Тому на зазначеній стадії роботи, а також при хімічному очищенні препарату необхідно дотримуватися високий ступінь чистоти на всіх операціях. Для цього підтримують у виключній чистоті не тільки використовуване обладнання, але й приміщення, де виробляють роботу.

Антибіотики, призначені для ін'єкцій, повинні бути стерильними. Тому отримання таких препаратів, приготування різних лікарських форм, фасування і упаковка здійснюються в асептичних умовах.

Після виділення і хімічного очищення антибіотика його необхідно висушити – видалити з отриманого препарату вільну і зв'язану воду. Оскільки більшість антибіотиків в тій чи іншій мірі термолабільні, для їх висушування необхідно застосовувати методи, що не приводять до втрати біологічної активності і не змінюють кольору препарату.

5. Застосування антибіотиків

Антибіотичні речовини знаходять застосування в різних галузях народного господарства, в наукових дослідженнях. Вони широко використовуються в медицині, в сільському господарстві, у харчовій та консервній промисловості, як специфічні інгібітори в біологічних дослідженнях.

Антибіотики в медицині. Відкриття антибіотиків викликало переворот в медицині. Багато антибіотичних речовин виявилися незамінними лікувальними препаратами. Вони знайшли широке використання при лікуванні багатьох інфекційних захворювань, які раніше вважалися невиліковними або супроводжувалися високим летальним результатом. До числа таких захворювань необхідно віднести деякі форми туберкульозу, чуми, холери, бруцельозу, пневмонії, різні септичні процеси та ін. Деякі антибіотики здатні пригнічувати розвиток злоякісних пухлин і проявляти активність відносно ряду вірусів.

До теперішнього часу в медичній практиці знайшло застосування близько ста антибіотиків. Пошуки нових антибіотичних речовин, отримання цінних напівсинтетичних препаратів антибіотиків розширюють можливість їх практичного застосування в медицині.

Антибіотики в сільському господарстві. Поряд з медичним використанням антибіотики знаходять широке застосування в сільському господарстві. Насамперед антибіотики використовуються в якості препаратів

у ветеринарії для лікування різних захворювань сільськогосподарських тварин. У цьому випадку вони, як і в медицині, виявилися вельми ефективними засобами.

Антибіотичні речовини знаходять все зростаюче використання в боротьбі з фітопатогенними організмами – збудниками захворювань рослин, що завдають відчутної шкоди сільськогосподарському виробництву. Одним з найголовніших вимог до антибіотиків, використовуваним в сільському господарстві, має бути те, щоб ці препарати не застосовувалися в медичній практиці.

Список використаної літератури

1. Бондар І. В., Гуляєв В. М. Промислова мікробіологія. Харчова агробіотехнологія. Дніпропетровськ : В-во ДДТУ. 2004. 280 с.
2. Головка А. М., Рубленко І. О. Ветеринарна санітарна мікробіологія : навчальний посібник. Київ : Аграрна освіта. 2010. 284 с.
3. Дяченко Г. М., Кравченко Н. О. Біотехнологія у кормовиробництві стан та перспективи розвитку. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2010. Т. 11.
4. Каленська В. С. Мистецтво перетворень у світі вірусів та бактерій : наук. допом. бібліогр. покажч. Київ : НУХТ. 2021. 126 с.
5. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : підручник. Київ : НУХТ. 2004. 471 с.
6. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія : підручник. Київ : НУХТ. 2009. 336 с.
7. Пирог Т. П., Пенчук Ю. М. Біохімічні основи мікробного синтезу : підручник. Київ : НУХТ. 2020. 258 с.
8. Поліщук Ю. В. Технологія продуктів мікробного синтезу : навчальний посібник. Київ : КПП ім. Ігоря Сікорського. 2022. 26 с.
9. Пробіотики і пребіотики. Глобальні практичні рекомендації Всесвітньої Гастроентерологічної Організації. Київ : Diagen. 2021. 43 с.
10. Старовойтова С. О., Скроцька О. І., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П. Технологія пробіотиків : підручник. Київ : НУХТ, 2012. 318 с.
11. Технічна мікробіологія : підруч. / Л. В. Капрельянц, Л. М. Пилипенко, А. В. Єгорова та ін. ; під ред. Л. В. Капрельянца. Херсон : Олді-плюс, 2020. 432 с.
12. Трохимчук І., Плюта Н., Логвиненко І., Сачук Р. Біотехнологія з основами екології : навчальний посібник. Київ : Кондор, 2019. 304 с.
13. Українець А. І., Богорош О. Т., Поводзинський В. М. Проектування типового і спеціального устаткування мікробіологічної,

фармацевтичної та харчової промисловості : навч. посібник. Київ :
НУХТ, 2007. 148 с.

Навчальне видання

**МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ВИРОБНИЦТВО
КОРМІВ
ТА КОРМОВИХ ДОБАВОК**
курс лекцій

Укладачі

Каратєєва Олена Іванівна

Люта Ірина Миколаївна

Технічний редактор: О. І. Каратєєва

І.М. Люта

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. **6,2**.

Тираж 20 прим.

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

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

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