

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

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

Кафедра біотехнології та біоінженерії

**МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ВИРОБНИЦТВО КОРМІВ ТА КОРМОВИХ
ДОБАВОК**

Методичні рекомендації

**для виконання лабораторно-практичних та самостійних робіт 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

M59

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від 15 жовтня 2025 р., протокол №2.

Укладачі:

О. І. КАРАТЄЄВА – кандидатка с.-г. наук, доцентка, в.о. завідувачки кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету.

І. М. ЛЮТА – асистентка кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету.

Рецензентка:

О. І. ЮЛЕВИЧ – кандидатка т. наук, доцентка кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету.

© Миколаївський національний аграрний університет, 2025

ЗМІСТ

ВСТУП	4
Основні правила техніки безпеки при виконанні лабораторних робіт	5
Тема 1. Культивування мікроорганізмів – продуцентів білка на гідролізатах торфу	6
Тема 2. Культивування мікроорганізмів – продуцентів білка на зерно-картопляній та мелясній барді	11
Тема 3. Одержання мікробного білка на відходах переробки нафти, метані, нижчих спиртах та гідролізатах рослинних відходів	15
Тема 4. Отримання високобілкових кормових препаратів із сировини, що постійно відновлюється	20
Тема 5. Виробництва кормових дріжджів на нафтових дистилятах, післядріжджевій бражці та мелясній барді	25
Тема 6. Отримання амінокислот мікробіологічним і хімічним шляхом	33
Тема 7. Відокремлення біомаси продуцента від рідкої фази, її концентрація і сушіння	37
Тема 8. Отримання амінокислот з білкових гідролізатів	41
Тема 9. Характеристика мікроорганізмів – продуцентів ліпідів і поліцукрів	45
Тема 10. Біосинтез ліпідів мікроорганізмами	49
Тема 11. Апаратуро-технологічна схема отримання мікробних ліпідів	54
Тема 12. Технологічні схеми та обладнання для виробництва ферментів	61
Тема 13. Промислове виробництво БАР	73
Тема 14. Технологічні схеми виробництва кормових антибіотиків	82
Тема 15. Технологічна схема виробництва жиро- та водорозчинних вітамінів	88
Тема 16. Виробництво пробіотиків та їх застосування у тваринництві	94
Тема 17. Технологічні схеми та обладнання для виробництва бактеріальних заквасок	100
Тема 18. Виробництво органічних кислот	107
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	116

ВСТУП

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

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

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

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

ОСНОВНІ ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ ПРИ ВИКОНАННІ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

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

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

- при змішуванні концентрованої кислоти з водою лити кислоту у воду, а не навпаки;

- у разі потрапляння на відкриті ділянки шкіри концентрованої кислоти або лугу слід негайно промити їх великою кількістю води. При опіку кислотами промити уражене місце 3-5%-м розчином соди, а при опіку лугами 2-3%-м розчином борної чи оцтової кислоти. Після цього уражену ділянку знову промити водою;

- роботи, пов'язані з виділенням шкідливих і отруйних речовин (хлору, сірчистого газу, оксидів азоту, аміаку тощо), треба виконувати тільки у витяжній шафі;

- кристалічний луг слід брати тільки пінцетом, щоб запобігти потраплянню навіть найдрібніших його частинок на шкіру, а особливо в очі;

- набираючи рідину в піпетку, треба стежити за тим, щоб кінчик її був занурений у рідину, інакше остання дуже швидко засмоктується в рот;

- при перенесенні посудини з гарячою рідиною треба відсторонити її від себе, тримати обома руками, притримуючи однією, прикритою рушником чи ганчіркою, під дно;

- слід пам'ятати, що лужні розчини киплять з поштовхами, тому склянки з ними на електроплиті можуть перекинутись;

- при перегонці не залишати прилад без нагляду, стежити, щоб через холодильник постійно протікала холодна вода;

- скляний посуд під час роботи з ним і миття легко б'ється. Для запобігання пораненню рук треба обережно з ним поводитись;

- слід бути обережними під час роботи з електроприладами. Не дозволяється виконувати самостійно будь-які ремонтні роботи;

- після закінчення роботи прилади треба вимкнути і перекрити водопровідні та газові крани;

- при неполадках у приладах, апаратах треба звертатися до викладача або лаборанта.

ТЕМА 1: КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ- ПРОДУЦЕНТІВ БІЛКА НА ГІДРОЛІЗАТАХ ТОРФУ

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).

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

Стаціонарний спосіб гідролізу. Здійснюється розбавленими кислотами при підвищеному тиску і високій температурі з відділенням гідролізату від лігніну ззовні гідроліз- апарата. Гідроліз проводиться при наступному режимі: гідромодуль (відношення маси екстрагуючої рідини до маси оброблюваного матеріалу) 10, концентрація кислоти 0,3%, тиск 0,7-0,9 МПа, час гідролізу (варіння) 20-30 хв. Після закінчення варіння вміст гідроліз- апарата видувається в 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%.

Таблиця 2

Встановлення природи речовин

Компоненти торфу	Вміст(у % від абсолютно сухої речовини) у торфі				
	медіум		фускум		сфагновому мочажинному
	З мірою розкладання, %				
	4-5	15-18	5-3	20-23	5-10
Зольні речовини	2,06	1,61	2,35	2,14	2,00
Речовини, що екстрагуються сумішшю спирт-бензол	4,53	7,00	3,05	8,23	3,10
Речовини, що переходять в розчин при геміцеллюлозному гідролізі	61,2	48,9	58,9	41,7	59,6
Легко гідролізовані полісахариди	25,9	26,3	28,0	18,5	32,1
Важко гідролізовані полісахариди	16,6	14,5	17,4	12,2	19,0
Полісахариди(загальний вміст)	42,5	40,8	45,4	30,7	51,1
Целюлоза(за глюкозою)	13,9 5	-	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

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 підігрівается парою, що утворюється при охолодженні гідролізованого торфу, і подається в апарат для гідролізу, де він нагрівається до температури реакції. Потім вводиться в апарат розбавлена кислота і здійснюється гідроліз торфу. При охолодженні

прогідролізованого торфу утворюється пара від самовипаровування, яка і використовується на першій стадії процесу. Вихід розчиненої речовини за цим методом складає 23,5%.

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

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

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

Гідроліз торфу проводиться в шнековому гідроліз-апараті, в якому суміш торфу з кислотою піддається інтенсивному стисканню і стиранню, що супроводжуються підвищенням температури до 70-110°C. В таких умовах значна частина полісахаридів торфу гідролізується. Торф'яна гідролізована маса, що містить продукти гідролізу і реверсії, змішується з водою в співвідношенні 1:3/4. Легко рухлива пульпа піддається інверсії при 120°C і поступає на барабанний вакуум-фільтр.

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

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.

Насосом 2 пульпа подається в змішувач інжекторного типу 3, де змішується з концентрованою сірчаною кислотою до створення в розчині 0,5-0,7%кислоти. Потім пульпа проходить підігрівач інжекторного типу 4,

нагріваючись до температури реакції (160-170°C), і поступає в трубчастий реактор 5 ідеального витіснення. У реакторі пульпа знаходиться впродовж часу, необхідного для отримання максимального виходу розчиненої речовини. Після цього через регулятор видачі 6 пульпа поступає у випарник, де відділяються пари самовипарення і температура знижується до 100-102°C. Далі пульпа йде на відділення осаду.

Таблиця 3

Результуюча концентрація кислоти і співвідношення твердої і рідкої фаз

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

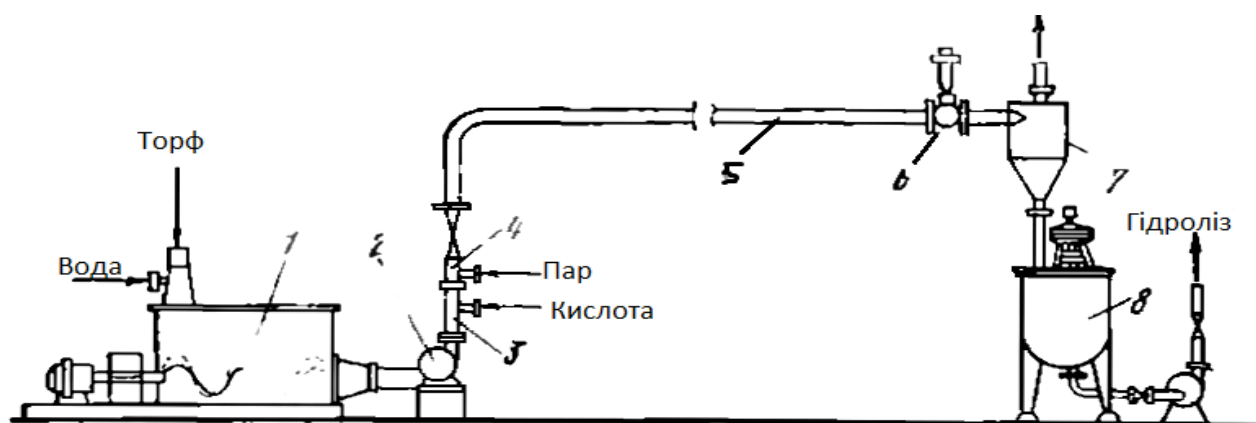


Рис. 1. Схема безперервного гідролізу торфу із застосуванням реактора ідеального витіснення

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

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

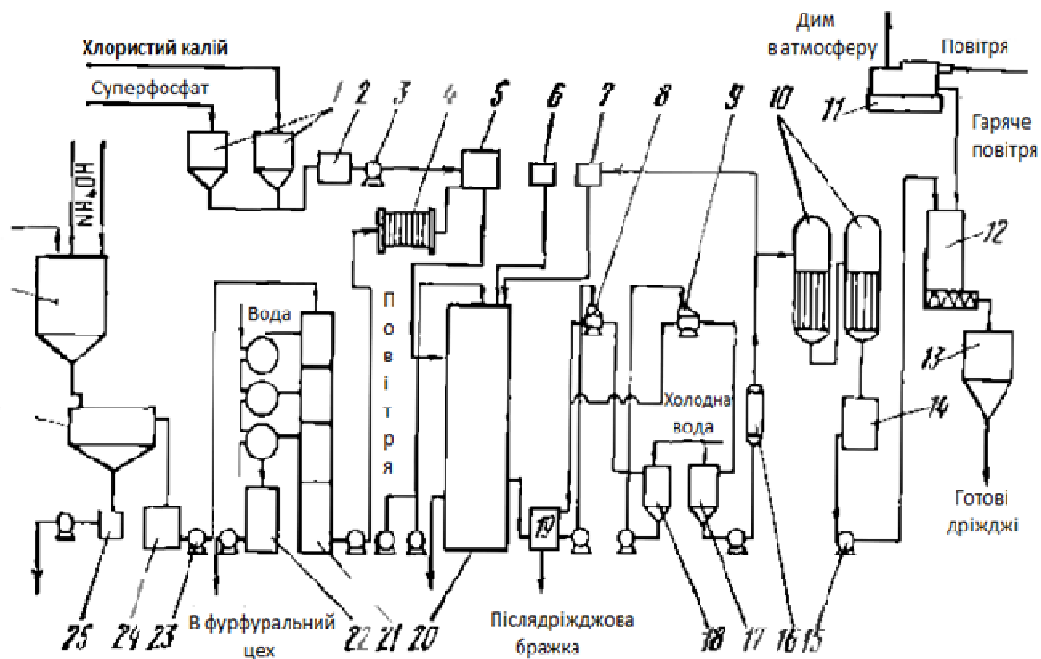


Рис. 2. Технологічна схема отримання білкових препаратів при культивуванні мікроорганізмів на торф'яному гідролізаті

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

Питання для самоконтролю:

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

ТЕМА 2: КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ- ПРОДУЦЕНТІВ БІЛКА НА ЗЕРНО-КАРТОПЛЯНИЙ ТА МЕЛЯСНИЙ 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 вітамінізацію і сушіння.

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

Характеристика сировини. Барда – відхід спиртового і ацетоно-бутилового виробництва; вміст сухих речовин в ній досягає 8-12%.

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

Таблиця 4

Хімічний склад барди, отриманої при переробці різних культур

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

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

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

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

Склад поживного середовища. Основою поживного середовища для вирощування мікроорганізмів є післяспиртова барда, але вона часто не містить потрібного для нормальної життєдіяльності дріжджів комплексу сполук.

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

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

Мінеральні кислоти потрібні для підтримки рН культуральної рідини на рівні 4,5-5,0, оскільки вони заміщають органічні карбонові кислоти, споживані в процесі культивування. При використанні моногідрата сірчаної кислоти витрата складає 8-10 кг на 1 м³ барди, або 550-650 кг на 1 тонну сухих дріжджів, при використанні соляної кислоти – 7-8 кг/м³, або 450 кг/т з розрахунку на 100%-ну кислоту.

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

**Дослідження складу барди до і після процесу вирощування
кормових дріжджів**

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

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

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

Питання для самоконтролю:

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

ТЕМА 3: ОДЕРЖАННЯ МІКРОБНОГО БІЛКА НА ВІДХОДАХ ПЕРЕРОБКИ НАФТИ, МЕТАНІ, НИЖЧИХ СПИРТАХ ТА ГІДРОЛІЗАТАХ РОСЛИННИХ ВІДХОДІВ

Ще донедавна *вуглеводні нафти* (очищені н-парафіни і нафтові дистилляти) були одним із перспективних джерел сировини для одержання кормового білка. Їх засвоює особлива група мікроорганізмів, до складу яких входить не менше тисячі видів. Вченими було встановлено, що здатність використовувати нафту і нафтопродукти мають багато бактерій і мікроскопічних грибів, які розповсюджені на ґрунті нафтових родовищ та промислів.

У 60-ті роки ХХ ст. західні нафтові компанії розробили технологію вирощування біомаси дріжджів *Candidia lipolitica* на очищених н-парафінах (налканах), виділених із нафти. А уже в 1973 р. у Радянському Союзі почав функціонувати перший у світі завод з виробництва кормових дріжджів на н-алканах нафти потужністю 70 тис. т на рік. Станом на 1988 рік у країні працювало 86 установок, які виробляли мікробний білок.

Як продуценти можна використовувати дріжджові або бактеріальні культури, однак розповсюдження одержали майже всі дріжджі роду *Candidia*: *C. guilliermondii*, *C. maltoza*, *C. sake*. Ці мікроорганізми за оптимальних умов культивування здатні забезпечити високий коефіцієнт засвоєння субстрату (налканів) – до 40% і накопичувати велику кількість білка (вище 60%). Продукт (білок), одержаний на рідких парафінах або на алканах (паприн), містить близько 60% сирого протеїну, жирів – до 5%, легко перетравних вуглеводів – 10-20%, мінеральних речовин – 5-8%, вітаміни групи В, ергостерин.

Однак у зв'язку з обмеженістю сировинних ресурсів і підвищенням їх вартості ця технологія тепер не використовується для крупнотоннажного промислового виробництва білка. Альтернативними субстратами для одержання мікробіального білка є гази, які містять метан, нижчі спирти (метанол, етанол), вуглеводи рослинного походження і в перспективі водень.

Одержання мікробного білка на природному газі (метані)

Природний газ як сировина для одержання мікробного білка теж втратив перспективу через обмеженість ресурсів і високу вартість на світовому ринку.

Дослідження, проведені в 60-70-х роках ХХ ст., дали можливість виділити чисті культури мікроорганізмів, здатних ефективно перетворювати метан природного газу на білок. Це метаноокислюючі бактерії, і основним з них є *Metylococcus capsulatus*, який належить до облігатних метилотрофних

мікроорганізмів.

Специфічність процесу культивування метаноокислюючих бактерій на природному газі полягає в тому, що основні поживні речовини – це гази (метан і кисень), які необхідно підвести у достатній кількості до стінок клітин, а оптимальна концентрація метану залежить від співвідношення метан: повітря або метан: кисень. Встановлено, що потреба бактерій у кисні у 2-3 рази перевищує їх потребу у метані.

Культивування мікроорганізмів на метані порівняно з вирощуванням на інших субстратах має як переваги, так і недоліки. До переваг належить чистота природного газу, який на відміну від парафінів нафти не містить речовин, котрі потрібно було б видаляти з біомаси.

Крім того, природний газ легко транспортується по трубах. До недоліків природного газу як субстрату слід віднести погану його розчинність у культуральному середовищі, повільний ріст метаноокислюючих бактерій, підвищене споживання кисню (у 5 разів вище, ніж на вуглеводах, і у 2-2,5 рази вище, ніж на н-парафінах) та вибухонебезпечність.

Дослідження щодо використання метану як сировини для одержання білка, розпочаті компанією «Шелл» (Велика Британія) в 1975 р., досить швидко припинилися через недостатню ефективність створеного з цією метою обладнання. Виявилось, що вигідніше попередньо окислювати метан у метиловий спирт хімічним шляхом, а потім використовувати його як субстрат для вирощування мікроорганізмів.

Одержана на метані кормова бактеріальна біомаса (гаприн) містить до 75% протеїну, ліпідів – до 5% і золи – до 10%. Білок за амінокислотним складом і поживною цінністю прирівнюється до рибної муки або соєвого шроту.

Одержання мікробного білка на нижчих спиртах – метанолі і етанолі

Метанол, який є продуктом окислення метану, вважається *найперспективнішим субстратом для одержання мікробного білка*. Джерелом крупнотоннажного виробництва метанолу є не тільки метан природного газу, запаси якого обмежені, а й метан біогазу, який одержують із поновлюваної рослинної біомаси.

Основними перевагами цього субстрату є висока чистота метанолу, добра його розчинність у воді, висока леткість, яка дозволяє легко видаляти його залишки із готового продукту. Крім того, мікробна біомаса, одержана на метанолі, не містить небажаних домішок, що дає змогу уникнути в технологічному процесі стадії очищення.

Недоліком метанолу як субстрату є його горючість і можливість

утворення з повітрям вибухонебезпечних сумішей у діапазоні концентрації 6-35 % (за об'ємом), а також високу токсичність метанолу, що вимагає при роботі з ним дотримання правил техніки безпеки.

Мікроорганізмами-продуцентами є як дріжджові, так і бактеріальні штами. Із дріжджів використовуються *Candidia boidinii*, *Hansenula polymorpha* і *Piehia pastoris*, а з бактеріальних культур – *Methylomonas clara*, *Pseudomonas rosea* та інші.

Дуже важливим моментом при використанні метанолу є вибір ефективного штамму-продуценту. Установлено, що бактерії утилізують метанол з більшим виходом мікробної біомаси порівняно з дріжджами, проте дріжджі мають низку технологічних переваг над бактеріями.

Первинне окислення метанолу в дріжджів каталізується оксидазною реакцією, а в бактерій – дегідрогеназою. Перспективним є 38 об'єднання переваг обох мікроорганізмів у одній клітині методами генетичної інженерії.

Для цього за допомогою біотехнології рекомбінантних ДНК ген, що кодує синтез бактеріального ферменту метанол-дегідрогенази, яка каталізує первинне окислення метанолу, переносять з бактеріальної у дріжджову клітину і створюють умови для його експресії. Перспективним також є використання сумішей культур, одні з яких споживають тільки метиловий спирт, а інші – решту субстратів і продуктів власного метаболізму.

Одержані на метанолі кормові дріжджі (меприн) містять 56-62% сирого протеїну, а бактеріальна біомаса – 70-74%. Етанол як субстрат для одержання мікробного білка має такі переваги: мала токсичність, добра розчинність у воді, досить висока летючість, невелика кількість домішок і можливість легкої його утилізації практично всіма мікроорганізмами.

Крім того, за рахунок наявності в молекулі спирту кисню, потреба в кисні або повітрі нижча, а звідси менші тепловиділення й інтенсивність аерації. Але разом з тим етанол – це легкозаймиста рідина, яка утворює з повітрям вибухонебезпечні суміші в інтервалі концентрацій 3-20% (за об'ємом).

Вартість очищеного етанолу на світовому ринку удвічі більша, ніж метанолу, але етанол відрізняється високою ефективністю біоконверсії. З 1 кг етанолу можна одержати до 880 г дріжджової маси, а з 1 кг метанолу – до 440 г.

На етанолі одержують високоякісний білок, який може використовуватись у харчуванні людей. Як мікроорганізми-продуценти білка на етиловому спирті (єдиному джерелі вуглецю) можуть використовуватись дріжджі (*Candidia utilis*, *Saccharomyces lambica*, *Hansenula anomala*) і бактерії (*Acinetobacter calcoaceticus*), однак останні мають менше практичне

значення.

Дріжджовий кормовий білок, одержаний на етанолі (еприн), містить 60-62% сирого протеїну і дуже багатий на лізин – до 7%.

Недоліком білка є невелика кількість сірковмісних амінокислот і перш за все метіоніну, що знижує його біологічну повноцінність.

Одержання мікробного білка на гідролізатах рослинних відходів

Історично одним з перших субстратів, які використовувались для одержання кормової мікробної біомаси, були гідролізати рослинних відходів, предгідролізати і сульфітний луг – відходи целюлозо_паперової промисловості.

В середині 30-х років ХХ ст. у колишньому Радянському Союзі було розпочато виробництво кормових дріжджів на гідролізатах рослинної сировини. Ця технологія не знайшла розповсюдження на Заході.

Суть цієї технології одержання білка – це кислотний гідроліз рослинних поліцукрів до пентоз і гексоз (при одностадійному гідролізі), або тільки до пентоз і тільки до гексоз (при двостадійному гідролізі), які можуть використовуватись або безпосередньо як джерело вуглецю і енергії для вирощування дріжджів, або з названих моноцукрів одержують етанол з подальшою його трансформацією у дріжджову біомасу.

Основними промисловими штаммами-продуцентами є різні види дріжджів – *Candidia utilis*, *C. scottii* і *C. tropicalis*, здатні засвоювати пентози і гексози і навіть переносити наявність фурфуролу у середовищі.

Основна перевага технології – це одержання продукту без залишків вихідної сировини, а отже, більш стабільного і контрольованого складу та поновлення сировинних джерел (рослинної біомаси).

Недоліком є необхідність використання агресивних середовищ і високих тисків на стадії гідролізу, значні витрати на його проведення та транспортування рослинної сировини. Гідролізні підприємства мають невеликі потужності і свого часу внесли великий вклад у вирішення проблеми кормового білка.

Кормові дріжджі, одержані на гідролізатах рослинної сировини, містять до 43-58% білка. Крім рослинних, використовуються і гідролізати відходів тваринництва (гнойових стоків від свиней) для вирощування кормових дріжджів. Ця технологія використовувалась у Чехословаччині.

Питання для самоконтролю:

1. Які вуглеводні нафти раніше використовувалися як джерело сировини для одержання кормового білка, і які мікроорганізми їх засвоюють?
2. Який вид дріжджів у 60-ті роки ХХ ст. вирощували на н-парафінах для отримання кормового білка?

3. Які показники білка (сирий протеїн, жири, вуглеводи, мінерали, вітаміни) має продукт, отриманий на n-парафінах?
4. Чому технологія отримання білка на нафтових субстратах сьогодні не використовується у промислових масштабах?
5. Які гази та спирти використовують як альтернативні субстрати для одержання мікробного білка?
6. Які особливості культивування метаноокислюючих бактерій на природному газі, і який вид є основним продуцентом?
7. Які переваги і недоліки використання метанолу як субстрату для вирощування мікробного білка?
8. Які мікроорганізми (дріжджі та бактерії) використовуються для одержання білка на метанолі?
9. Які переваги та недоліки одержання мікробного білка на гідролізатах рослинних відходів?
10. Як впливає субстрат (метан, метанол, етанол, гідролізати) на якість білка та вміст амінокислот у мікробній біомасі?

ТЕМА 4: ОТРИМАННЯ ВИСОКОБІЛКОВИХ КОРМОВИХ ПРЕПАРАТІВ ІЗ СИРОВИНИ, ЩО ПОСТІЙНО ВІДНОВЛЮЄТЬСЯ

Вирощування дріжджів і бактерій на очищених рідких парафінах нафти, природному газі, а також на їх окислених похідних – спиртах і кислотах іще донедавна був основним способом крупномасштабного промислового виробництва кормових білкових концентратів. Однак зростаючий дефіцит цих видів сировини у світі, ріст цін на нафтопродукти і газ стимулювали пошуки нових джерел сировини для мікробіологічної промисловості. Такими перспективними видами сировини є **рослинна біомаса і відходи тваринництва**.

Рослинна біомаса належить до поновлюваних джерел сировини. Це різні плоди і соки, крохмалевмісні клубні, трав'яниста, кущова, дерев'яниста рослинність, а також численні і різноманітні відходи їх промислової переробки і сільськогосподарського виробництва.

Рослинна сировина є практично необмеженим ресурсом для виробництва білкових речовин. Ресурси біомаси у світі величезні і оцінюються в 100 млрд. т сухої речовини на рік. При її переробці утворюється велика кількість відходів. Так, при переробці деревини у целюлозо-паперовій промисловості ефективно використовується лише 50% її маси. Згідно з розрахунками французьких фахівців, світові ресурси вуглеводів, які містяться у рослинних відходах сільськогосподарського виробництва (соломі, висівках тощо) сягає 585 млн. т на рік.

Розроблена безвідходна технологія утилізації рисової соломи, яка не використовується ні в годівлі тварин, ні як підстилка через жорсткість. Із тонни рисової соломи можна одержати 100 кг кормових дріжджів і 200 м³ теплоізоляційних волокнистих плит.

За прогнозами українських спеціалістів, за умови створення у основних рисосіючих регіонах України (Одеській і Херсонській областях) відповідних виробничих потужностей, можна буде одержувати щорічно 20-25 тис. т кормових дріжджів і 40-45 тис.м² теплоізоляційних плит.

Таким чином, рослини утворюють величезну біомасу, яка на сьогодні використовується ще недостатньо. Ця маса багата вуглеводами, але бідна азотом і білком. Використовуючи біомасу як субстрат для мікроорганізмів, її можна перетворити на багаті білком, жирами, вітамінами кормові препарати.

Для цього використовуються такі принципово різні технологічні прийоми, як ферментація у зануреній культурі і твердофазова ферментація рослинної сировини. У колишньому Радянському Союзі у ВНДІ біотехніка була розроблена біотехнологія одержання кормових продуктів на основі

мікробіологічного синтезу з використанням як сировини різних целюлозовмісних відходів промислового і сільськогосподарського виробництва (жом, виноградні вижимки, пивна дробина, корзинки соняшника, костриця льону, коноплі тощо).

Методами глибинної і твердофазової ферментації одержали продукт, який, залежно від якості сировини, містить 25-50% протеїну, ферменти целюлолітичної дії, вітаміни, ліпіди. Отже, усі рослинні відходи можна перетворити на багаті білком, жирами, вітамінами кормові препарати мікробного походження. Для цього використовують декілька принципово різних технологічних рішень – культури мікроорганізмів вирощують глибинним або поверхневим методом.

Ферментація у зануреній культурі, або глибинне культивування мікроорганізмів. При цьому типові ферментації використовується як крохмалевмісна, так і целюлозовмісна рослинна сировина. Для ферментації крохмалевмісної сировини використовуються мікроорганізми-продуценти, які мають ферменти для гідролізу крохмалю (амілази). Це дріжджі роду *Candidia* та деякі плісняві гриби (роди *Fusarium*, *Chrysosporium*, *Aspergillus*, *Myrothecium* та ін.).

Мікроорганізми-продуценти вирощують у звичайних ферментерах на синтетичних середовищах, куди як джерела вуглецю і енергії додають крохмаль або крохмалевмісну сировину (картоплю і продукти її переробки, подрібнене зерно кукурудзи тощо). Продуктом такої ферментації є препарат, який містить залишки вихідної сировини, збагаченої на 17-20% білком за рахунок біомаси дріжджів і пліснявих грибів.

Для одержання збагачених мікробним білком кормових препаратів із важкодоступної для мікроорганізмів рослинної сировини, такої як солома, деревина, тирса й інші промислові і сільськогосподарські відходи (які складаються в основному із целюлози і лігніну) використовують мікроорганізми, які мають целюлозолітичні ферменти. Найчастіше – це міцеліальні гриби і рідше бактерії.

Складна надмолекулярна структура лігнінцелюлозного рослинного субстрату дуже стійка до ферментативної дії. Щоб полегшити доступ ферментів мікроорганізмів до поліцукрів рослинної сировини, проводиться попередня її обробка різними способами.

Найчастіше використовують хімічний спосіб у поєднанні з термічним – це обробка субстратів слабкими лугами при підвищеній температурі. Використовуються також інші методи руйнування лігнінцелюлозних надмолекулярних структур – механічний, фізичний (наприклад, плющення соломи).

Збагачення білком лігнінцелюлозної сировини шляхом ферментації у зануреній культурі досягає 10-12%. Канадські вчені розробили технологію «Проект Ватерлоо», яка базується на вирощуванні грибної культури *Chaetomium cellulolyticum* на оброблених лугом при підвищеній температурі субстратах (тирса, солома, тверда фракція гною жуйних тварин).

Одержаний продукт містить від 20 до 45% сирого протеїну (білка – 12-14%, 35% вуглеводів, 10% ліпідів). Білок містить 6,8% лізину, 2,6% метіоніну + цистеїну і 6,1% треоніну і належить до повноцінних. Використовується як білкова добавка до раціонів тварин.

Твердофазова ферментація рослинної сировини. Ферментація у зануреній культурі є на сьогодні основним способом мікробіологічного синтезу. Одним із можливих альтернативних варіантів мікробіологічної технології є твердофазова ферментація.

Твердофазовою ферментацією називаються мікробіологічні процеси, які відбуваються не у водній фазі, а в масі легкозвложеного субстрату.

Оптимальна вологість залежить від властивостей субстрату і мікроорганізму-продуцента, який використовується, і становить від 25 до 75%. Водна фаза у цих умовах представлена лише плівками на поверхні частин субстрату і водою, яка сорбована субстратом.

Таким чином, ріст мікроорганізмів при твердофазовій ферментації проходить на межі фаз «твердий субстрат: вода:повітря» і в деяких випадках – усередині частинок субстрату.

Як субстрат використовується крохмалевмісна або целюлозовмісна сировина. Із мікроорганізмів-продуцентів, які ростуть в умовах твердофазової ферментації, частіше використовуються міцеліальні гриби, макроміцети у міцеліальній формі, інколи – змішані культури грибів і дріжджів, а для ферментації крохмалевмісної сировини – чисті культури дріжджів.

Твердофазова ферментація використовувалася протягом багатьох століть у країнах Далекого Сходу та Індокитаю для приготування традиційних національних страв. Європейці ознайомились з цією технологією на початку XX століття і до 50-х років вона була широко розповсюджена, а потім почала витіснятись глибинною ферментацією. Зараз знову повертаються до твердофазової ферментації через низку об'єктивних причин.

По-перше, використання нерозчинного у воді субстрату (рослинної сировини) суттєво ускладнює ферментацію у зануреній культурі, вимагаючи додаткових операцій завантаження субстрату і вивантаження продукту, а безперервні процеси робить майже нездійсненними.

По-друге, це екстенсивний варіант технології, а отже, і дешевий.

По-третє, було встановлено, що деякі процеси відбуваються в умовах твердофазової ферментації у багато разів інтенсивніше. Найпростішими технологічними варіантами твердофазової ферментації є компостна купа і поверхневий ріст плісняви.

Похідними цих варіантів є такі типи твердофазової ферментації, які використовуються як в лабораторній практиці, так і в виробництві.

1. Поверхнева твердофазова ферментація (так званий «тонкий шар»), при якій культура мікроорганізмів росте у шарі субстрату товщиною 3-7 см в камері, де підтримується необхідна температура і вологість повітря. Роль біореакторів виконують великі, площею до декількох квадратних метрів, таці із алюмінію, або культивацийні камери.

2. Глибинна твердофазова ферментація у шарі, що перемішується (так званий «високий шар»). При ньому культура мікроорганізмів росте по всій масі субстрату, що досягається відповідними методами аерації (вентиляції) маси.

3. Твердофазова ферментація у масі субстрату, що перемішується і аерується. Субстрат може бути гомогенним (напіврідкий гній) або складатись із частинок твердого субстрату, що знаходиться у завислому стані (перехідний варіант між твердофазовим процесом і процесом у рідкій фазі).

Зазвичай використовують біореактори з низькошвидкісними змішувачами. Перемішування при великій кількості твердої фази травмує біооб'єкт, що особливо відчутно для міцеліальних грибів.

М'яке перемішування досягається при використанні шнекових (гвинтових) змішувачів або коли біореактор є обертальним барабаном.

Інтерес до твердофазових процесів пояснюється їх перевагами порівняно з процесами, які відбуваються у рідкому середовищі:

- 1) вони вимагають менших витрат на обладнання і експлуатацію;
- 2) характер субстрату полегшує відділення й очищення продукту;
- 3) низький вміст води у субстраті перешкоджає зараженню культури продуцента сторонньою мікрофлорою;
- 4) на відміну від процесів в рідкій фазі твердофазові процеси не пов'язані з викидом в оточуюче середовище великої кількості стічних вод – потенційного джерела його забруднення.

Твердофазове культивування має і певні недоліки. У більшості твердофазових процесів відсутнє перемішування, а ріст мікроорганізмів відбувається за принципом колонізації: роз множуючись вони розповсюджуються із точок внесення в субстрат по всьому об'єму. При цьому окремі зони у товщі субстрату надлишково населяються клітинами і

виникає локальна нестача поживних речовин, в той час коли значна частина субстрату залишається незайманою.

До кінця не вирішеною проблемою є також контроль за ефективністю аерації різних ділянок субстрату, температурою і рівнем вологості.

Одержаний після твердофазової ферментації продукт має залишки вихідної сировини, збагаченої на 6-22% білком залежно від складу субстрату. Наприклад, при твердофазовій ферментації у шарі, що перемішується і аерується, з використанням продуценту *Aspergillus niger* або дріжджів і гранульованих крохмалевмісних субстратів одержали продукт, який містить 17-20% білка. Оброблена лугом тирса після її ферментації в тонкому шарі містила до 12% протеїну, а необроблена – до 6-8%.

Твердофазова ферментація як метод покращення поживної цінності грубих рослинних кормів має широкі перспективи в Україні як основа для створення технології малотоннажного виробництва кормових препаратів – рівня невеликих ферм і тваринницьких підприємств. Ця технологія, орієнтуючись на дешеву місцеву сировину, таку як солома, різні відходи місцевої промисловості і сільського господарства, може стати одним із основних шляхів виробництва білка для тваринництва. Це дасть можливість прискорити процеси реформування аграрного сектора економіки у нашій державі.

Питання для самоконтролю:

1. Які види сировини відносяться до поновлюваних джерел для виробництва мікробного білка?
2. Чим відрізняється ферментація у зануреній культурі від твердофазової ферментації?
3. Які мікроорганізми використовуються для ферментації крохмалевмісної рослинної сировини?
4. Як збільшують доступ ферментів мікроорганізмів до лігнінцелюлозної сировини перед ферментацією?
5. Які технологічні прийоми використовують для одержання білкових кормових препаратів із важкодоступної рослинної сировини (солома, деревина, тирса)?
6. Які переваги твердофазової ферментації порівняно з процесами у рідкому середовищі?
7. Які недоліки твердофазових процесів та як вони впливають на ефективність виробництва білка?
8. Які продукти отримують при твердофазовій ферментації в тонкому шарі та з перемішуванням, і який у них вміст білка?
9. Які види мікроорганізмів використовуються для ферментації целюлозовмісної сировини?

ТЕМА 5: ВИРОБНИЦТВА КОРМОВИХ ДРІЖДЖІВ НА НАФТОВИХ ДИСТИЛЯТАХ, ПІСЛЯДРІЖДЖЕВІЙ БРАЖЦІ ТА МЕЛЯСНІЙ БАРДІ

Ресурсами для виробництва кормових дріжджів являється барда спиртового виробництва, відходи від виробництва крохмалю та крохмальної патоки, м'яса, щолоки від виробництва лимонної та молочної кислот, молочна сироватка, пивні та винні дріжджі, нафтопродукти.

На спиртових заводах, які переробляють м'ясо, кормові дріжджі отримують шляхом виділення сахароміцетів із м'ясної барди, на решті підприємств – шляхом вирощування дріжджеподібних грибів на тій же барді (близько 80% післяспиртової барди використовується для вирощування кормових дріжджів).

В технічній літературі **кормовими дріжджами** називають продукт, який складається із сухої клітинної маси дріжджеподібних грибів роду *Candida* а також дріжджів (сахароміцетів), які являються відходами виробництва спирту, пива та вина. Вирощування дріжджів – найбільш простий спосіб отримання протеїну.

Якщо для отримання яловичини необхідно 2-3 роки, свинини – 6 місяців, м'яса птиці – 10 тижнів, то для вирощування дріжджів – декілька годин.

Біологічна цінність та якість кормових дріжджів

Кормові дріжджі – це суха біомаса (з вологістю до 10%) інактивованих клітин дріжджеподібних грибів; вони містять 10-15% сухих речовин культуральної рідини, що залишились у дріжджевому концентраті в процесі відокремлення біомаси й висушених разом з нею.

Кормові дріжджі спиртових заводів відповідають ДСТУ 8723:2017 Дріжджі кормові. Методи випробування. Цей стандарт поширюється на кормові дріжджі, які отримують із технічно чистих культур дріжджів, вирощених на різних субстратах гідролізно-дріжджевих, спиртових, ацетоно-щолокових виробництв. Їх використовують як білково-вітамінну добавку для комбікормів та кормових сумішей для сільськогосподарських тварин, птиці, хут-рових звірів. Особливо вони ефективні в свинарстві – збагачують раціони білком, незамінними амінокислотами, вітамінами групи В, макро- й мікроелементами.

Кількість протеїну в кормових дріжджах з м'ясної барди й бурякової м'яси становить 48-57% та 34-45% відповідно. Сума амінокислот у дріжджах різних заводів – 32-43%, у тому числі незамінних – 14-19%.

Білок кормових дріжджів м'ясно-спиртових заводів – цінне джерело

незамінних амінокислот, які разом з бетаїном становлять 192,5 г/кг АСР. Якість кормових дріжджів м'ясно-спиртових заводів – на рівні кращих зразків кормових дріжджів з гідролізатів деревини.

Характерна особливість сухих кормових дріжджів м'ясно-спиртових заводів, на відміну від дріжджів, одержаних з інших видів сировини – наявність бетаїну (2,1-6,3% АСР), який міститься в культуральній рідині.

Бетаїн, нарівні з холіном та метіоніном, – джерело метильних груп у метаболічних процесах переметилування, і певною мірою поповнює нестачу метіоніну, однієї з найбільш дефіцитних амінокислот, у кормах. Наприклад, додавання бетаїну до раціону запобігає захворюванню курчат на перозис; підвищує біологічну цінність білку сухих кормових дріжджів м'ясно-спиртових заводів.

Кормові дріжджі, вироблені на гідролізно-дріжджевих, ацетоно-бутилових, сульфідно-щолокових та зерно-картопляних заводах повинні містити не більше 10,0% золи (в перерахунку на АСР); дріжджі, вироблені на м'ясно-спиртових заводах та заводах з замкнутим циклом водопостачання – не більше 14,0% золи. До складу золи дріжджів м'ясно-спиртових заводів входить 3,0-6,2% калію, 0,4-1,6% натрію, 0,7-1,4% кальцію в АСР.

Вміст важких металів в сухих кормових дріжджах м'ясно-спиртових заводів не перевищує максимально допустимі рівні для кормів, отриманих шляхом мікробіологічного синтезу, мг/кг: свинцю – 1,1-3,0; кадмію – 0,05-0,3; ртуті – 0,05; арсену – 1,0; фтору – 1-36.

Кормові дріжджі мають колір від світло-жовтого до брунатного і виробляються в гранульованому або порошкоподібному вигляді. Гранули повинні мати діаметр 5,0-9,0 мм, довжину, не більше 18,0 мм і проходити через сито з діаметром чарунок 3 мм не більше ніж на 5,0. Термін зберігання кормових дріжджів не повинен перевищувати шести місяців.

Введення 5-6 кормових одиниць дріжджів до складу раціонів з рослинних малобілкових кормів на кожні 100 кормових одиниць зменшує витрату кормів на 16 кормових одиниць.

Завдяки використанню тони кормових дріжджів, добавленої у комбікорми, можна одержати додатково: свинини до 0,7-0,8 т, м'яса птиці – 2-2,3 т, яєць – до 30-35 тисяч штук.

Технологія виробництва кормових дріжджів на нафтових дистилятах

Кормові дріжджі із нафтових дистилятів, зареєстровані за торговою назвою «Фермозин» та ін. Вони отримані на основі *Candida maltosa* (*Candida guilliermondii*), і дозволені для використання в складі комбікормів

для сільськогосподарських тварин та птиці (свиней на відкормі, курей, гусей, качок, поросят, телят) в кількості 7,5% від маси раціону, та для риб (карпу) в кількості 10% від маси раціону.

Це виробництво дозволяє суміщувати в одному технологічному процесі виробництво декількох цільових продуктів: кормових дріжджів, депарафінізованого дистиляту, біоліпідного екст-ракт, при переробці якого можна отримати ряд цінних біологічно-активних речовин (жирні кислоти, гліцериди, вітаміни, коферменти, фосфоліпіди).

Технологічний процес виробництва кормових дріжджів із нафтових дистилятів з одночасним отриманням компонентів дизельного палива з покращеними властивостями за температурою застигання здійснюється безперервним способом і складається із слідуєчих основних етапів:

- ферментація-декантація;
- виділення депарафінізованого нафтового дистиляту та згущення дріжджевої фази;
- висушування;
- екстракційне очищення дріжджевої біомаси;
- гранулювання дріжджів, очищення депарафінізованого нафтового дистиляту;
- очищення стічних вод виробництва.

Технологічна схема виробництва приведена на рисунку 3.

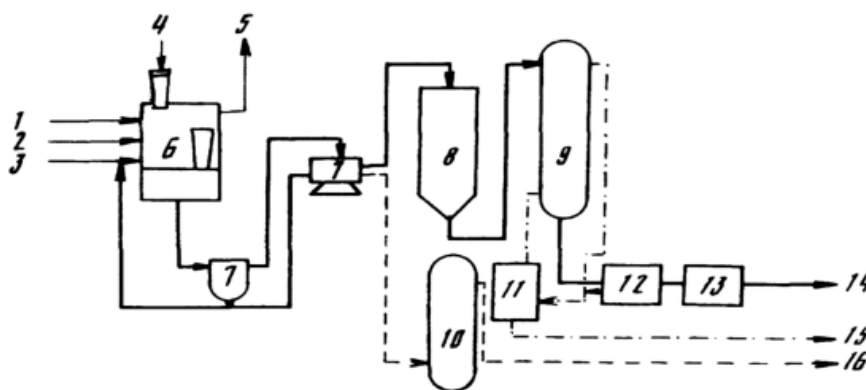


Рис. 3. Схема виробництва кормових дріжджів «Фермозин» із нафтових дистилятів:

- 1 – живильні солі; 2 – нафтовий дистилят; 3 – вода; 4 – повітря; 5 – відведення повітря; 6 – ферментація; 7 – декантація, сепарація; 8 – сушка; 9 – екстракція; 10 – очищення частково депарафінізованого нафтового дистиляту; 11 – очищення розчинника; 12 – відгін розчинника; 13 – грануляція; 14 – готовий продукт; 15 – вуглеводний екстракт; 16 – очищений нафтовий дистилят

Вузол ферментації являється домінуючим у схемі, тому що на нього

припадає 30-40% затрат процесу.

Ферментацію проводять в нестерильних умовах при високих швидкостях потоку $D = 0,2-0,25 \text{ год}^{-1}$.

В залежності від вибраних умов процесу ферментації можна регулювати ступінь утилізації н-алканів, які містяться в дистилаті, від 60 до 95%. При цьому досягається зниження температури застигання дистилату на 10-40°C.

Інтенсивність процесу і можливість отримання ефективних витратних показників залежить від інтенсивності масообміну в ферментері.

В якості основних компонентів поживного середовища в ферментер вводяться: дизельний дистилат нафти з певним вмістом та спектром н-алканів: аміачна вода в якості джерела азоту; фосфорна кислота та ряд компонентів поживних солей та мікроелементів, які включають іони K^+ , Mg^{+2} , Fe^{+3} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} .

та ін. у оптимальному співвідношенні для забезпечення максимальної швидкості росту дріжджів, технологічна вода.

Процес вирощування дріжджів на нафтових дистилатах пред'являє значно більш високі вимоги до ферментера, ніж, наприклад, процес вирощування дріжджів на сировині з вуглеводами, сульфідними щолоками або бардою.

Культуральна рідина в ферментері являється не трьохфазною, а чотирьохфазною сумішшю, яка складається з водної, газової, дріжджевої та олійстої фаз. При цьому дріжджева фаза в результаті присутності олійстої фази має структуру пластівців, з цієї причини виникають флотаційні ефекти, які погіршують рівномірність перемішування середовища у всьому об'ємі ферментера. Тому для цієї технології використовують спеціальний струменевий ферментер. Відведення тепла із ферментера здійснюється за допомогою зовнішнього контура охолодження. Ферментаційне середовище перекачується через контур охолодження спеціальними циркуляційними насосами.

Дріжджева суспензія, яка виходить з ферментера, частково згущується та розподіляється на складові компоненти на стадії первинного відокремлення (декантація, сепарація).

Відносно високий вміст олійстої фази (нафтового дистилату) в суспензії та сильна олефільність біомаси дріжджів приводить до утворення стабільних агломератів.

Це дозволяє відокремлювати основну масу технологічної води (близько 60 %) за допомогою декантації.

Подальше розділення концентрованої суспензії, яка містить біомасу, нафтового дистилату та водної фази, відбувається в безперервно працюючих

сепараторах, де відбувається відокремлення нафтового дистилляту та подальше згущення біомаси до 20-21% АСР. Остаточне виділення вологи з біомаси відбувається на розпилюючих сушарках.

Для отримання дріжджів високої якості з біомаси необхідно повністю видалити залишкові вуглеводні, які знаходяться в клітинах та на їх поверхні. Це досягається в результаті багатоступеневої екстракції висушеної біомаси складною сумішшю полярних та неполярних розчинників.

Перед екстракцією використовують спеціальну обробку біомаси розчинником, в результаті якої змінюється структура клітинної оболонки дріжджів та покращується проникнення розчинника в клітину.

Під час екстракції одночасно з вуглеводами відбувається також часткове вилучення основної маси ліпідної фракції дріжджів. Це призводить до значного збільшення частки білкових компонентів в біомасі. В продукті після екстракційного очищення міститься близько 68% від загальної кількості білка.

Сухі порошкоподібні дріжджі надходять на грануляцію і потім в силос на зберігання.

Отримана суміш розчинника з екстрактом розділяється шляхом дистиляції на чисту регеновану суміш та біоліпідний

екстракт. Екстракт являється цінним продуктом, при переробці якого можна отримати біологічно активні компоненти (фосфатиди, жирні кислоти, ергостерин, убіхінон), а також інші цінні технічні речовини.

Готові кормові дріжджі містять понад 65% сирого протеїну, менше 5% сирого жиру, менше 0,5% залишкових вуглеводів, понад 2,0% сірковмісних амінокислот та понад 6,5% лізину.

Вирощування кормових дріжджів на післядріжджевій бражці

Використання *післядріжджевої бражки* – забрудненого стоку дріжджевих заводів, дозволяє отримати білковий препарат та, одночасно, знизити показник ХСК.

Для культивування на стоках дріжджевих заводів використовують монокультури *Pichia jadinii*, *Trichosporon cutaneum*, *Pichia guilliermondii* та їх суміші. Ці мікроорганізми відібрані серед багатьох відомих продуцентів біомаси, як найбільш продуктивні.

Комбінація адаптованих до стоків культур *Pichia jadinii* та *Trichosporon cutaneum* у співвідношенні 1:1 дозволяє отримати максимальну концентрацію біомаси на рівні 10 г/дм³, в якій білка знаходиться 49-53%, що дозволяє використовувати цю біомасу як кормову добавку. В результаті такого культивування рівень ХСК стічної води знижується з 8000 до 3000 мг О₂/дм³.

Вирощування кормових дріжджів на м'яясній барді

Кінцевий відхід м'ясно-спиртових заводів – *м'яясна барда*. Хімічний склад барди коливається в широких межах, тому що він залежить від якості м'яси та способу її переробки спиртовим заводом. РН барди – 5,2-5,4. Питома теплоємність барди 0,92 ккал/(кг·град) ($3,851 \cdot 10^3$ Дж/(кг·К)).

За своїм хімічним та вітамінним складом м'яясна барда являється повноцінною сировиною для виробництва кормових дріжджів: в додаткових добавках ростових речовин немає потреби. Вміст сухих речовин в натуральній барді 67%, в упареній – 53,0-53,6%.

В основу апаратурно-технологічної схеми виробництва покладений двоступеневий спосіб вирощування дріжджів на нерозведеній барді, без попереднього виділення з неї мертвих дріжджів-сахароміцетів.

Для швидкого вирощування засівних дріжджів в якості дріжджегенератора використовують апарат з ерліфтним аератором ємністю 100 м³, який дозволяє при інтенсивній аерації (80 м³/м³·год) отримати 20-25% засівних дріжджів в стані максимальної фізіологічної активності.

Для вирощування дріжджів на I та II ступенях використовуються посівні апарати (дріжджевирощувачі) ємністю 320 та 600 м³ з ерліфтною системою аерації та витратою повітря 55-60 м³/м³·год.

За технологією хлористоводнева та ортофосфорна кислота із залізничних цистерн перекачується насосом в футеровані резервуари, обладнані пастками для газових конденсатів.

Із зовнішнього резервуару хлористоводнева кислота через насос та пастку надходить до дріжджеростильних апаратів, в дріжджегенератор та велику дріжджанку. При надходженні кислоти в кожний апарат окремим дозуючим насосом постійно підтримується рН середовища для I ступеню вирощування в межах 4,0-4,2, та для II ступеню 3,5-3,8. Ортофосфору кислоту насосом направляють в чан-декантатор, призначений для приготування розчинів солей.

Діамонійфосфат і карбамід вивантажують з вагонів на склад. З вагів за допомогою тонорельса з тельфером солі з 6-кратною кількістю лютерної води або конденсату з випарної установки вивантажують в чан-декантатор з мішалкою.

З чану-декантатору освітлений розчин солей насосом перекачують в мірник; з нього він самотечією надходить до чанів-змішувачів.

Піногасники із цистерни зливають або перекачують насосом в зовнішній резервуар, і тим же насосом – в підігрівач та емульсор. Готову емульсію із емульсора насосом подають в мірник-дозатор, а з нього – в механічні піногасники.

Гаряча барда (95-98°C), яка містить дріжджі-сахаро-міцети, при виході із бражної колони по U-подібній трубі зливається в збірник-стерилізатор, з якого насосом безперервно подається через фільтр на пластинчасті теплообмінники для охолодження до 20-25°C. Вода, яка входить в теплообмінник, проходить через водяний фільтр. Напрямок потоку через фільтри барди та води змінюється через кожні 2-3 доби. Охолоджена до 20-25°C барда з теплообмінників безперервно надходить до чану-змішувача (сусловий чан), в якому змішується з розчинами солей.

Поживне середовище (кондиціонована барда) із чана-змішувача насосом подається в колектор, періодично – у посівний апарат (велику дріжджанку) та в дріжджегенератор, і безперервно – в ферментер (дріжджевищувальний апарат).

Дріжджі чистої культури розмножуються на стерилізованому мелясному суслі. Меляса через ваги надходить з основного виробництва в **апарати чистої культури (АЧК)**. В АЧК, малій дріжджанці та у великій дріжджанці середовище аерується за допомогою повітродувки.

Засівні дріжджі з АЧК передаються в малу дріжджанку, з неї – в велику дріжджанку, з якої перекачується насосом в дріжджегенератор.

Поживним середовищем в дріжджанках та в дріжджегенераторі слугує кондиціонована барда. Для отримання оптимального рН середовища в дріжджегенератор подається з мірника або дозуючим насосом хлористоводнева або сірчана кислота.

Культуральна рідина в кожному дріжджегенераторі аерується з окремих повітрядувок відповідної потужності 60 м³/м³·год.

Звільнена від піни бражка із піновідокремлювача подається насосом через сітчастий фільтр на І групу сепараторів. Відтік від них та розчин солей направляється в чан-змішувач, а з нього – в дріжджевищувальний апарат для повторного вирощування дріжджів.

Дріжджева суспензія від І групи сепараторів зливається в збірник та насосом подається на ІІ групи сепараторів.

Суспензія від них з концентрацією біомаси 180-280 г/дм³ промивається в збірнику теплою водою, згущується на тих же самих сепараторах за коловим циклом до концентрації 400-500 г/дм³, та передається в термолізатор безперервної дії.

Дріжджі, вирощені на ІІ ступені, виділяють за тим же самим режимом, з використанням піновідокремлювача, механічного піногасника, двох гуртів сепараторів, з'єднаних із збірниками та з насосами. Отримані відтйоки направляють на випарку, а дріжджеву суспензію (400-500 г/дм³) – на термолізатор.

В термолізаторі дріжджі рівномірно з високою швидкістю дозування подаються насосом на розпилюючий диск сушильної камери.

Висушені дріжджі, пройшовши через магнітний сепаратор, у вигляді порошку відбираються з нижньої частини конусу через циклон-відокремлювач. Виділений з цього циклону дріжджевий пил вентилятором повертають в батарею циклонів.

Із бункеру сухі дріжджі переміщуються на автоматичні ваги, а з них – в крафт-мішки з клапанами або у відкриті мішки, які зашивають на мішкозашивочній машині. За допомогою транспортеру та електровивантажувача мішки із дріжджами розміщують на складі.

Питання для самоконтролю:

1. Охарактеризуйте основні етапи розвитку виробництва кормових дріжджів.
2. Які вимоги пред'являються до якості кормових дріжджів, одержаних на мелясно-спиртових заводах?
3. Які біологічно-активні речовини містяться в препаратах кормових дріжджів?
4. В чому особливості препаратів кормових дріжджів, вироблених на гідролізно-дріжджевих, ацетоно-бутилових, сульфітно-щолокових та зерно-картопляних заводів?
5. Яким вимогам повинні відповідати препарати кормових дріжджів за показниками безпеки?
6. Яка біологічна ефективність препаратів кормових дріжджів?
7. Охарактеризуйте особливості біотехнології кормових дріжджів на нафтових дистилятах.
8. Які мікроорганізми використовуються для культивування на стоках спиртових заводів?
9. За якою технологією здійснюється вирощування кормових дріжджів на мелясній барді?
10. Який принцип будови кларифікаторів, дріжджанок, дріжджегенераторів?

ТЕМА 6: ОТРИМАННЯ АМІНОКИСЛОТ МІКРОБІОЛОГІЧНИМ І ХІМІЧНИМ ШЛЯХОМ

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

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

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

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

виробництва як кормових препаратів, так і особливо чистих амінокислот, придатних до використання в харчовій і фармацевтичній промисловості.

Мікробіологічний синтез лізину, метіоніну, треоніна і ізолейцину

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

Напівальдегід аспарагінової кислоти є також одним з попередників в синтезі амінокислот – треоніну, метіоніну і ізолейцину (рис. 4).

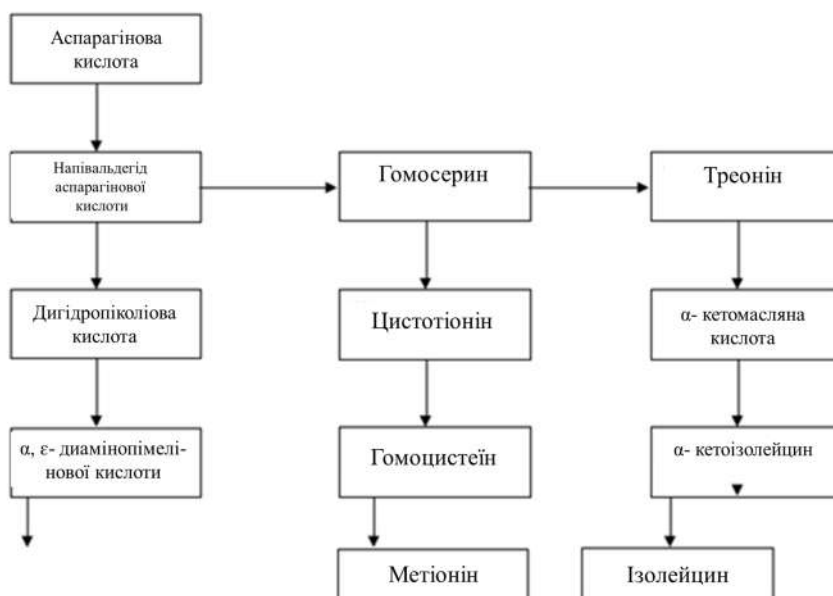


Рис. 4. Процес синтезу амінокислот з напівальдегіду аспарагінової кислоти

Процес синтезу амінокислот (лізину, треоніну, метіоніну і ізолейцину) починається фосфорилюванням аспарагінової кислоти за участю аллостеричного ферменту аспартаткінази, активність якого інгибується спільною дією двох амінокислот – лізину і треоніну, якщо вони

накопичуються в клітках бактерій в надлишковій концентрації. Якщо знизити концентрацію однієї з цих амінокислот, то синтез інший здійснюватиметься навіть за умови, коли вона накопичується в досить високій концентрації.

В процесі культивування мікроорганізмів забезпечується подача стерильного повітря за допомогою спеціальних турбінних мішалок, для запобігання спінуванню субстрата і клітинної суспензії в середу культивування додають піногасник. Посівний матеріал, призначений для виробничої ферментації, спочатку вирощують в посівних апаратах при 28-32°C, рН 7-7,2 протягом 18-24 год, а потім отримана таким дорогою суспензія кліток подається у виробничих ферментери ємкістю 50-100 м³, в яких підтримується постійний режим аерації, необхідний тиск, контроль за всіма компонентами і параметрами середовища. Час ферментації 55-72 год. Накопичення в культуральній рідині лізину починається після 25-30 год вирощування промислової культури і до кінця ферментації досягає 40-50 г/л. Культуральну рідину відділяють від культури кліток продуцента фільтруванням і використовують для здобуття препаратів лізину.

На основі промислової культури бактерій, що синтезують лізин, організовано виробництво декількох видів товарної продукції: рідкий концентрат лізину (ЖКЛ), сухий кормовий концентрат лізину (ККЛ), висококонцентровані кормові і високоочищені кристалічні препарати для харчової і медичної промисловості. Рідкий концентрат лізину отримують дорогою упарюванням культуральної рідини на вакуумній установці до концентрації сухої речовини 40%. Для запобігання деградації лізину в процесі нагрівання в культуральну рідину додають бісульфіт натрію і соляну кислоту до рН 4,5-5,0, внаслідок чого утворюється сіль – монохлоргідрат лізину. Для здобуття сухого концентрату лізину сушать гарячим повітрям на распильтельної сушарці при 90°C до вологості препарату 4-8%. В цілях зниження гігроскопічності препарату в нього додають наповнювачів: мясокостну муку, негашене вапно, бентонит, пшеничні висівки. Найчастіше як наповнювач використовують висівки, які додають в ЖКЛ після упарювання. Отриману в результаті ретельного перемішування пасту висушують на вальцово-ленточної сушарці і гранулюють.

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

Окрім викладеної вище технології здобуття чистих препаратів лізину

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

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

Переважаю хімічним шляхом в промисловості виробляється гліцин, DLметіонін, L-фенілаланін, L-валін, L-треонін, L-триптофан. Перспективним методом отримання L-амінокислот є розділення рацематів амінокислот шляхом асиметричного гідролізу їх похідних з використанням мікроорганізмів, які мають специфічну L-ацилазну, L-амідазну, L-естеразну активність.

Хімічний склад кормового препарату лізину складний і містить дуже велику кількість різних сполук. На основі готової культуральної рідини можна отримати кристалічні препарати лізину. Очищений лізин використовується для харчових, медичних та інших цілей. Він складається з 95-97% монохлоргідрату лізину і 2-4% золи. Втрати лізину в процесі виділення кристалічного препарату складають приблизно 30%.

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

Питання для самоконтролю:

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

ТЕМА 7: ВІДОКРЕМЛЕННЯ БІОМАСИ ПРОДУЦЕНТА ВІД РІДКОЇ ФАЗИ, ЇЇ КОНЦЕНТРАЦІЯ І СУШІННЯ

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. 5) і деяким іншим, але точне таксономічне становище більшості з них визначити важко, тому що в публікаціях інформація міститься явно недостатня для цього.

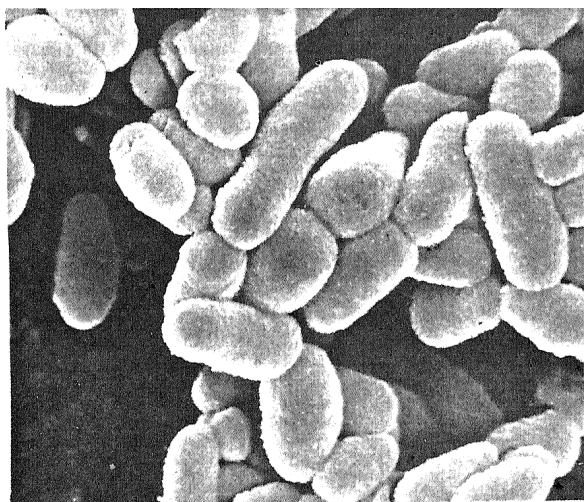


Рис. 5. Продуцент лізину *Brevibacterium* sp. 22 (x22000)

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

Ферментативні реакції синтезу амінокислот протікають всередині

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

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

Цей процес ускладнюється тим, що у біомасі знаходяться розбавлені розчини і складна суміш розчинних позаклітинних метаболітів, продуктів розкладу клітин, компонентів поживного середовища. При концентруванні цільового продукту в процесі виробництва відбувається інгібування росту продуцентів та їхня загибель.

У залежності від типу цільового продукту (біомаса або окремі метаболіти – ферменти, гормони, вітаміни) використовують різні типи концентрування та виділення. З огляду на те, що продукти мають біологічну природу (ферменти, гормони, вітаміни тощо), у чистому вигляді вони можуть втрачати свої властивості та активність. Тому для забезпечення їх збереження використовують різні способи стабілізації (сушіння, консервацію).

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

Отже завершальний етап біотехнологічного виробництва включає:

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

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

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

Використовують способи:

- упарювання і сушіння (якщо білково-вітамінний комплекс);
- седиментація – осадження часток у полі гравітаційних сил;
- декантація – зливання рідини (звіджування);
- фільтрація;

- флотація – прилипання часточок до бульбашок повітря (піна);
- центрифугування – розділення неоднорідних сумішей на компоненти за допомогою центробіжної сили;
- сепарація.

Методи виділення продукту:

- Екстракція – за допомогою органічних розчинників;
- Сорбція (адсорбція, абсорбція, хемосорбція, десорбція).
- Хроматографічний метод (газова і рідинна хроматографія; за формою колонкова, тонкошарова і паперова хроматографія; гельфільтрація, іонообмінна хроматографія.
- Афінна хроматографія – дуже дорога – («хроматография по средству» - заснована на використанні високої специфічності зв'язування природних сполук: антитіла-антиген, лектин-рецептор, фермент-субстрат).

Основні стадії концентрування і очистки цільового продукту:

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

Групи методів концентрування і очистки продукту:

1. безреагентні методи (сепарація, центрифугування, фільтрація, хроматографія);
2. методи з використанням реагентів (коагуляція, флотація, флокуляція).

Безреагентні методи дозволяють отримати чистий продукт, але досить трудомісткі, енерговитратні, не завжди високоефективні.

Реагентні методи більш ефективні, але не завжди дозволяють отримати високоякісні і безпечні продукти (можуть бути токсичними).

Очистка цільового продукту

Цільові продукти досить різноманітні: клітини, очищені молекули тощо.

Вони представлені двома різновидами:

- біомасою клітин;
- виділеними метаболітами (екзометаболітами).

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

Вибір способу очистки клітинної біомаси залежить від:

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

Питання для самоконтролю:

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

ТЕМА 8: ОТРИМАННЯ АМІНОКИСЛОТ З БІЛКОВИХ ГІДРОЛІЗАТІВ

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

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

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

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

Оптимальне співвідношення амінокислот в раціонах кормів

У виробництві комбікормів важливо дотримуватися балансу амінокислот. Він впливає на якість засвоювання білків і амінокислот, що дозволяє отримувати максимальний приріст м'яса і понизити витрату кормів. Оптимальне співвідношення основних амінокислот – лізину і тріоніна – складає 1 до 0,63. Це дозволяє забезпечити оптимальний відсоток засвоюваності білків, а також збільшити приріст м'язової тканини з мінімальною витратою комбікорму.

Амінокислоти можна отримувати з кислотних і лужних гідролізатів природних білків та з продуктів їх ферментативного розщеплення. Однак висока собівартість і дефіцитність вихідної сировини (відходи м'ясної промисловості, яечний білок, казеїн молока, клітковина пшениці), а також багатоступенева хімічна обробка, пов'язана з виділенням амінокислот та їх очищенням, не дозволяють широко використовувати цей спосіб в

промисловості. В процесі кислотного гідролізу білків спостерігається руйнування більшої частини триптофану, цистеїн при цьому окислюється в цистин, розпадаються треонин і серин. Певні недоліки має і метод ферментативного гідролізу. Зокрема, гідроліз може бути неповним, і сам фермент із звільненням амінокислот здатен розкладатися.

Біотехнологія отримання кормового лізину

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

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

Для біосинтезу лізину (рис. 5) використовують гомосериндефіцитні мутанти ауксотрофних бактерій родів *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* та ін.

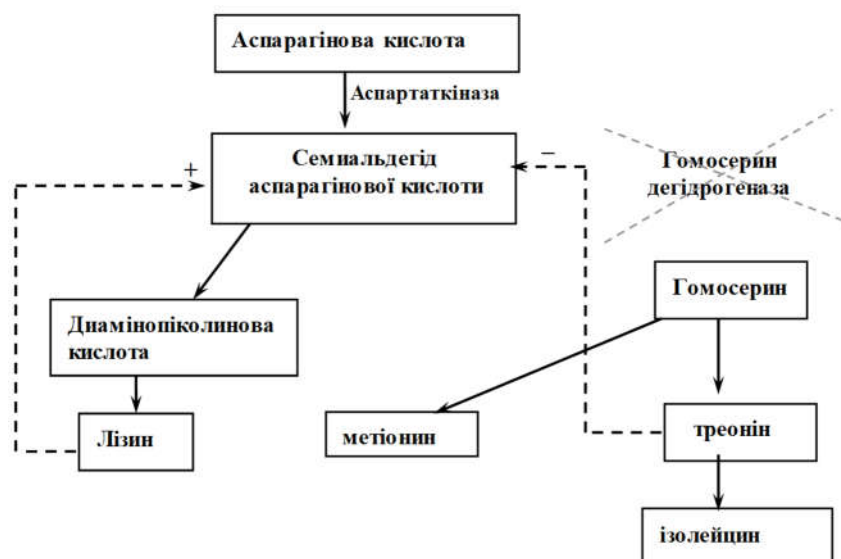


Рис. 5. Схема біосинтезу лізину у бактерій через діамінопіколінову кислоту

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

Створено штами *p. Brevibacterium*, що забезпечують на м'ясному

середовищі синтез лізину до 50-70 г/л, на сахарозних середовищах – до 100 г/л при продуктивності системи в напівбезперервному процесі 15-20 г/л на добу.

I. Середовище для одержання лізину готується із меляси, кукурудзяного екстракту, солей амонію, одно- і двозаміщеного фосфату калію. Кукурудзяний екстракт іноді замінюють дріжджовим гідралізатом, концентратом клітинного соку картоплі або витяжкою із пшеничних висівків. Після стерилізації таке середовище використовують для вирощування посівного матеріалу і для головної ферментації. Діамінпіколоїнова кислота лізин Гомосерин метіонін треонін ізолейцин Семиальдегід аспарагінової кислоти Аспарагінова кислота

II. Спочатку культуру розмножують у колбах на качалках, потім у ферментерах об'ємом 100 і 3000 л. кількість посівного матеріалу 5-10% оптимальна температура 30-35 °C і pH 7,4. Тривалість ферментації для кожної стадії близько 24 години. Головна ферментація триває 50-70 годин при аналогічних режимах. Концентрація лізину в розчині 20-60 г/л, концентрація клітинної біомаси 15-20 г/л у перерахунку на суху масу.

Високу концентрацію лізину 60-80 г/л можна одержати на м'ясному середовищі, якщо під час ферментації ввести дробну підкормку частиною живильного середовища при дотриманні точної регуляції культивування. М'ясу можна замінити сахарозою, соком цукрового буряка, глюкозою або гідролізатом крохмалю, а також оцтовою кислотою і підняти концентрацію лізину до 100 г/л (рис. 6).

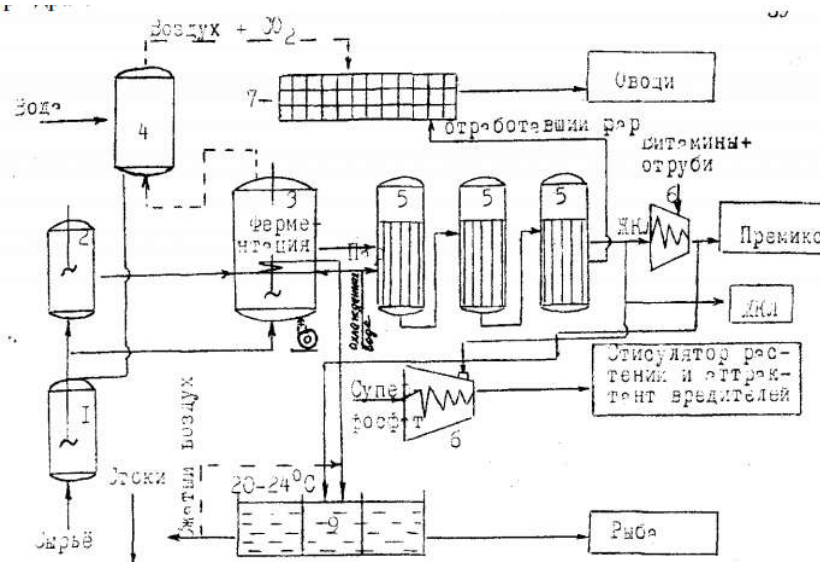


Рис. 6. Схема безвідходної технології одержання концентрату лізину

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

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

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

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

Для одержання чистого лізину кристали технічного лізину піддають нагріванню в невеликій кількості води 70°C, додають активоване вугілля, перемішують і фільтрують. За допомогою НСІ встановлюють рН 4,9, розчин упарюють і кристалізують. Кристали сушать при 60°C. Одержаний лізин містить 99,9% лізину монохлоргідрату, і 0,1% золи і не більше 0,001% солей важких металів.

Для кормових потреб одержують концентрат лізину.

Питання для самоконтролю:

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

ТЕМА 9: ХАРАКТЕРИСТИКА МІКРООРГАНІЗМІВ – ПРОДУЦЕНТІВ ЛІПІДІВ І ПОЛІЦУКРІВ

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

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

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

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

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

Умови отримання ліпідів. Основну роль в процесі біосинтезу ліпідів грають різні штами дріжджів. Вони використовують ті ж джерела сировини, що і для отримання кормового білка, причому від цінності вуглецевого живлення залежать вихід біомаси, кількість і склад ліпідів, що синтезуються. Для забезпечення направленого біосинтезу ліпідів в живильному середовищі уживаються джерела азоту, що легко асимілюються.

Умови культивування ліпідів. На фракційний склад ліпідів, що синтезуються, надають інші умови культивування: аерація, рН і температура. Від інтенсивності аерації залежить синтез фосфогліцеридів, жирних кислот і триацилгліцеридів. При недостатній аерації ліпіди містять в 4 рази менше триацилгліцеридів, в 2 рази більше фосфогліцеридів і в 8 разів більше жирних кислот, ніж при нормальній. При інтенсифікації аерації зростає ступінь ненасиченості ліпідів і збільшується відносна кількість всіх груп ненасичених кислот. Підвищення рН середовища веде до збільшення вмісту фосфогліцеридів і жирних кислот при одночасному зниженні кількості триацилгліцеридів. Оптимальні температури зростання і ліпідоутворення для

клітин збігаються, причому вміст ліпідів не залежить від температури культивування. Проте, регулюючи температуру, можна створювати різні співвідношення насичених і ненасичених жирних кислот у складі фосфоліпідних мембран.

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

Продуценти ліпідів

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

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

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

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

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

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

Таблиця 6

Склад дріжджових ліпідів (%)

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

Таблиця 7

Вміст основних жирних кислот (%)

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

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

Полісахариди – це вуглеводи, які складаються з моносахаридів або близьких до них речовин. Основна маса вуглеводів, що зустрічаються в природі, існує у вигляді полісахаридів. Функціонально полісахариди

поділяються на дві групи: перша виконує головним чином опорну, структурну функцію (целюлоза), друга є основним поживним матеріалом (глікоген, крохмаль). Деякі полісахариди виконують специфічні функції в організмі людини. Наприклад, полісахарид гепарин є природним антикоагулянтом, а полісахарид гіалуронова кислота має бар'єрну функцію. Клітковина (целюлоза) є найбільш поширеним структурним полісахаридом. Вона утворює оболонку рослинних клітин.

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

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

Питання для самоконтролю:

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

ТЕМА 10: БІОСИНТЕЗ ЛІПІДІВ МІКРООРГАНІЗМАМИ

Ліпіди – це група органічних речовин, що входять до складу живих організмів і характеризуються нерозчинністю у воді та розчинністю в неполярних розчинниках, таких як діетилетер, хлороформ та бензен. Це визначення об'єднує велику кількість сполук різних за хімічною природою, зокрема таких як жирні кислоти, воски, фосфоліпіди, стероїди та багато інших (рис. 7).

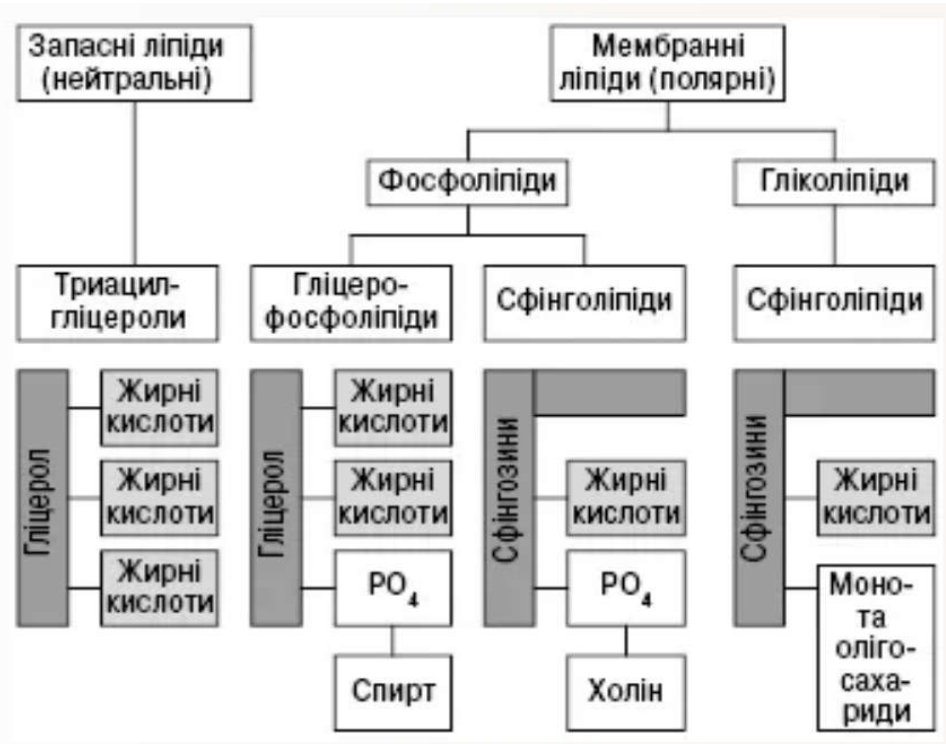


Рис.7. Класифікація ліпідів

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

Внутрішньоклітинний метаболізм ліпідів – сукупність біохімічних ферментативних реакцій катаболізму й анаболізму різних класів ліпідів, що надходять в організм людини як компоненти харчових продуктів та синтезуються в ньому, виконуючи важливі енергетичні функції, виступаючи структурними компонентами клітин і біологічно активними сполуками.

Основні шляхи внутрішньоклітинного метаболізму ліпідів:

- гідроліз нейтральних жирів до жирних кислот та гліцеролу (ліполіз);
- окислення та біосинтез жирних кислот;
- біосинтез триацилгліцеролів та складних ліпідів;

– біосинтез холестерину та його перетворення в біологічно активні стероїди.

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

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

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

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

Таблиця 8

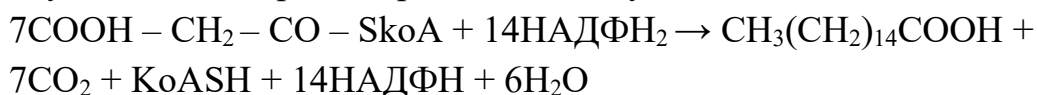
Склад жирних кислот у *Cryptococcus terricolus* , вирощеного на середовищах з різним зв'язуваннями вуглецю (% від загальної кількості)

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

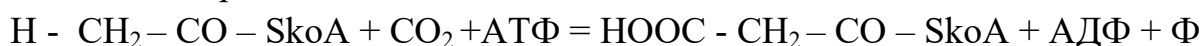
На відмінну від сполук вуглеводу сполуки азоту не здійснюють прямого впливу на біосинтез ліпідів. Їх вплив пов'язано із зсувом рівноваги поживного середовища в бік оптимуму значення рН, характерного для ліпідотворення.

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.

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 тривалому рості у поживному середовищі. Дане явище пояснювалось ним як результат різких змін обміну речовин, головним чином вуглеводневого, що призводило до більш інтенсивного накопичення ліпідів, в першу чергу триагліцеринів і стеринів.

Питання для самоконтролю:

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

ТЕМА 11: АПАРАТУРО-ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА ОТРИМАННЯ МІКРОБНИХ ЛІПІДІВ

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

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

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

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

фосфоліпиди, 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.

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 ПАВ, 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 впелюстку товщиною 0,1-0,2 мм. Дріжджовий пелюсток підсушують в конвеєрній сушарці до вологості 6-8% (волога заважає проникненню розчинника при екстракції ліпідів) і просівають на ситі з розміром отворів 2 мм. Некондиційну пелюстку повертають на стадію кондиціонування дріжджового порошку. В результаті потужного термомеханічного впливу на дріжджовий порошок поліпшується мікроструктура частинок, зростає поверхня масопередачі і тривалість екстракції сформованого пелюстки зменшується до 4 год (рис. 8).

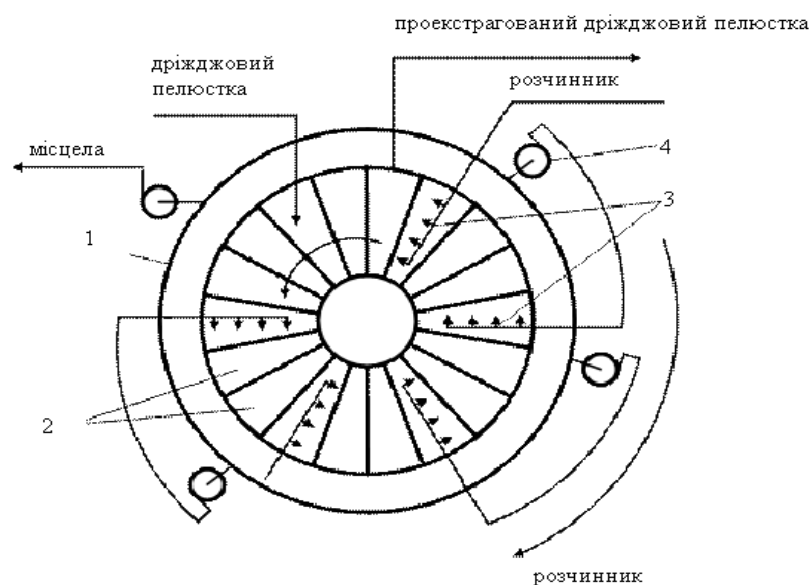


Рис. 8. Схема процесу протитечійної екстракції ліпідів з дріжджового пелюстка в роторному екстракторі

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

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 (міцели). На кінцевій стадії (ступені) екстракції дріжджі зрошуються чистим розчинником, який подається в екстрактор через п'яту гребінку (рис. 9).

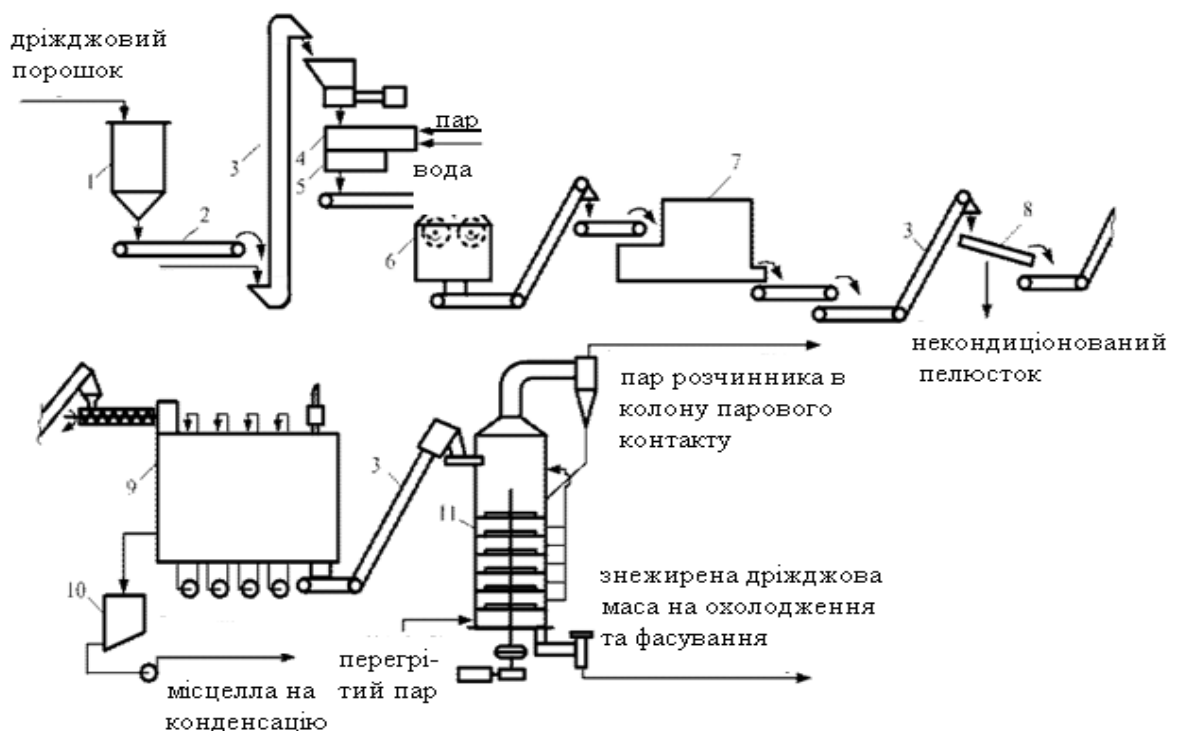


Рис. 9. Технологічна схема екстракційного вилучення ліпідів із дріжджового порошку

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 – десольвататор

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 місцелитретього ступеня. Місцела проходить через пелюстка в комірках, зміцнюється (підвищується концентрація ліпідів), стікає в камеру третього ступеня в днище екстрактора і насосом подається в гребінку над камерою місцели другого ступеня.

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

Для підвищення швидкості масопередачі екстракцію проводять при температурі 50-55°C, яку підтримують подачею в екстрактор підігрітого розчинника (екстрагента). Розчинник (нефрас) має високу летючість, горючий, суміші його парів з повітрям вибухонебезпечні. Щоб виключити проникнення парів розчинника з екстрактора в виробниче приміщення в апараті створюють розрідження (0,05-0,2 кПа) витяжним вентилятором.

Екстракт (місцела) містить близько 4% мікробного жиру і залишкових вуглеводнів, які витягуються розчинником з клітинної маси одночасно з ліпідами. Технічний мікробний жир отримують відгоном розчинника з місцели дистиляцією в два (або три) ступені (рис. 10).

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

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

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

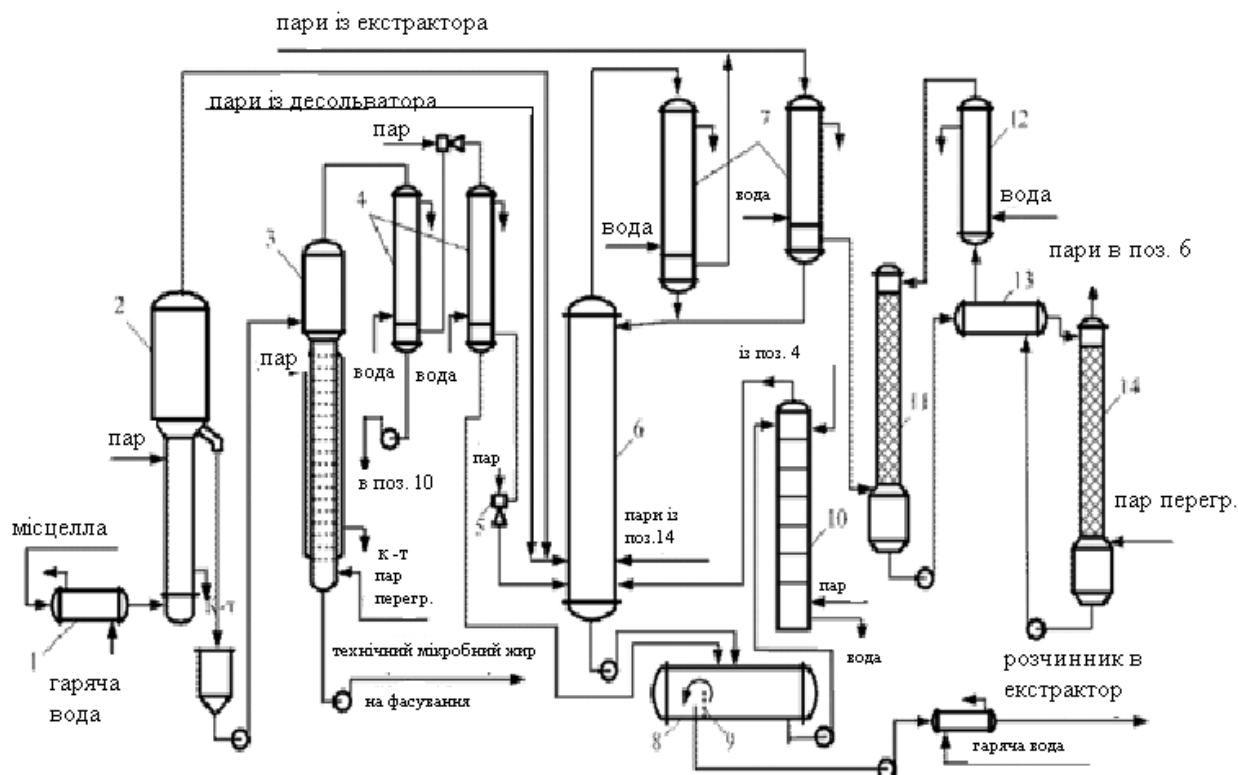


Рис. 10. Технологічна схема дистиляції місцели

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

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

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 колонни парового контакту. Установка включає дві колони з насадкою з кілець Рашига –

абсорбер і десорбер. У абсорбері розчинник вловлюється з пароповітряної суміші зрошенням в проти течійному режимі індустриальним маслом при низькій температурі (30°C). Насичене розчинником масло підігрівається і прямує в десорбер, в якому в проти течійному режимі контактує з перегрітою водяною парою, що видаляє легко летючий розчинник з масла при температурі 105-110°C. Пари з десорбера надходять в колону парового контакту. Гаряче регенероване масло охолоджують і повертають в абсорбер, забезпечуючи безперервну циркуляцію його в замкнутій системі.

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

Питання для самоконтролю:

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

ТЕМА 12: ТЕХНОЛОГІЧНІ СХЕМИ ТА ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ФЕРМЕНТІВ

У сучасній біотехнології одне з провідних місць належить ферментам. Усе живе містить ферменти, без них неможливий обмін речовин. Препаративне одержання ферментів і використання їх у різних галузях промисловості, сільського господарства, наукових дослідженнях дозволяє суттєво змінити технологічні процеси, методи аналізів, забезпечити більш високі показники і виходи у промисловості і сільському господарстві, впровадити принципово нові методи.

Ферменти (лат. *fermentum* – закваска або ензими) – це біологічні каталізатори, більшість з яких є розчинними глобулярними білками (актин і міозин належать до структурних білків і спільно беруть участь у гідролізі АТФ), що містяться в усіх живих клітинах. Здійснюючи перетворення речовин (субстратів), ферменти регулюють метаболізм в організмі.

Максимальну активність ферменти виявляють за оптимальних значень рН, температури, іонної сили розчину, наявності коферментів і кофакторів, відсутності інгібіторів, причому для кожного ферменту ці величини індивідуальні (свої).

При різкому відхиленні температури, рН середовища від оптимальних величин ферменти можуть інактивуватися в результаті незворотної денатурації (зміни конформації, розкручування). Ферменти в процесі каталізу не витрачаються, а ферментативним реакціям властивий майже 100%-й вихід продуктів. На відміну від багатьох технологічних процесів у хімічній технології, яка вимагає високих тисків і температур, реакції, що відбуваються за участю ферментів як біокатализаторів, здійснюються при температурах, які не перевищують 60-70°C, нормальному атмосферному тиску і рН середовища в інтервалі 4,5-9,0.

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

Найширшим спектром використання відзначаються **мікробні ферментні препарати**. Це, як правило, так звані промислові або технічні ферментні препарати. Залежно від складу ферментів їх прийнято класифікувати на

амілолітичні препарати; ферменти, що діють на пектинові речовини; целюлолітичні препарати; ферменти, що деградуєть лігнін; геміцелюлазні препарати; ліполітичні препарати; протеолітичні препарати; протеолітичні препарати, що здатні приводити до зсідання білка молока (ренніноподібні протеїнази); препарати, що містять глюкозооксидазу і каталазу; ферменти, що здійснюють перекисне окиснення поліненасичених жирних кислот (ліпоксигеназа, простагландинсинтетаза); препарати глюкозоізомерази; препарати β -галактозидази; препарати β -фруктофуранозидази.

Ферменти можуть бути *індукованими і конститутивними*.

Індуковані – це ферменти, які синтезуються мікроорганізмами лише в разі наявності у поживному середовищі певних речовин або індукторів. Наприклад, фермент лактаза може синтезуватися тільки за наявності в середовищі лактози. Більшість гідролітичних ферментів належать до індукованих. Біосинтез більшості з них інгібується глюкозою.

Джерелом отримання деяких ферментів є рослини (протеїнази) і тканини тварин (хімотрипсин, амілаза, колагеназа, ліпаза).

Однак основним джерелом для виділення ферментів і ферментних препаратів є мікроорганізми. Це обумовлено високою інтенсивністю їх метаболізму, швидким приростом біомаси на дешевих (нехарчових) субстратах, окремі з яких є токсичними для інших організмів.

Мікробіологічний метод одержання ферментів є більш перспективним, порівняно з хімічним синтезом. Його перевагами є:

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

У ферментній технології використовуються як дикі, так і мутантні штами мікроорганізмів, деякі з них представлені в таблиці 9.

Крім високо очищених окремих ферментів, промисловість випускає ферментні препарати, які містять суміш ферментів.

Ферментні препарати класифікують за основним компонентом (ферментом): амілолітичні містять амілази, протеолітичні – протеази, ліполітичні – ліпази тощо.

Ферменти, що утворюють мікроорганізми, бувають:

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

В Україні виробляють глюкозооксидазу, галактозооксидазу і каталазу.

Таблиця 9

Ферменти, що виробляють у промисловості та їх продуценти

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

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

1. Потрібно ретельне дотримання стерильності, бо продукт, що утворився – фермент – на відміну від кислот, спиртів і антибіотиків не подавляє сторонню мікрофлору.

2. Біосинтез ряду ферментів пригнічується катаболітною репресією.

3. Для продукту представляють небезпеку протеази. Ці особливості враховують при підборі поживних середовищ, селекції штамів і реалізації процесу.

Сировина для одержання ферментів є різною, залежно від продуцентів.

У виробництві пектинолітичних ферментів використовують пектинвмісну сировину (буряковий жом), целюлолітичних – солому, висівки тощо.

У якості джерела вуглецю використовують кукурудзяне або пшеничне борошно, крохмаль, глюкозу, лактозу.

Крохмаль є індуктором для α -амілази, а глюкоза репресором. Утворення глюкоізомерази інтенсивніше відбувається в середовищах із ксилозою або геміцелюлозою.

У якості джерела азоту в середовищах для одержання ферментів

застосовують соєве борошно або білкові ізоляти, рибне борошно, кукурудзяний екстракт, казеїн, солі амонію. Сухой речовини в таких середовищах повинно бути 10-20%.

Загальна схема отримання ферментів мікробіологічним шляхом представлена на рисунку 11.



Рис. 11. Загальна схема отримання ферментів мікробіологічним шляхом

Технологічні стадії одержання ферментних препаратів біотехнологічними методами:

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

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

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

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

6. Мікрофільтрування і стерильне фільтрування розчину.

Стадії 7, 8 і 9 для виділення внутрішньоклітинних ферментів.

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

8. Екстрагування білків із клітин.

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

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

11. Виготовлення лікарської форми.

12. Фасування та упакування.

Виробництво ферментних препаратів здійснюється двома способами – поверхневим і глибинним.

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

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

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

Глибинний спосіб. Даний спосіб вирощування мікроорганізмів має ряд

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

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

Назва параметру	Значення параметрів	
	Поверхнєве культивування	Глибинне культивування
Основні продуценти	Мікроскопічні гриби родів <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Fusarium</i>	Мікроскопічні гриби родів <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Fusarium</i> , бактерії родів <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i>
Компоненти поживного середовища	Пшеничні висівки, солодові ростки, буряковий жом, (вологість 58-60%)	Кукурудзяне борошно, крохмаль, патока, гідролізати рослинної сировини і казеїну (вміст сухих речовин від 1,5 до 15,5%, pH 3,5 - 8,5)
Температура культивування	30-32°C 28-30°C	26 - 32°C для грибів 32 - 37°C для бактерій
Режим аерації	Кондиціоноване повітря вологістю 99-92% і температурою 30-32°C, витрата 0,1-0,2 м³/кг*год	1-2 об'єми повітря на 1 об'єм культуральної рідини за хвилину
Тривалість культивування	Від 36 до 52 год в залежності від продуценту	Від 48 до 144 год в залежності від продуценту

Рис. 12. Основні параметри культивування продуцентів для одержання ферментів

Технологічна схема отримання очищених ферментних препаратів при глибинному способі культивування вказана на рисунку 13. 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.

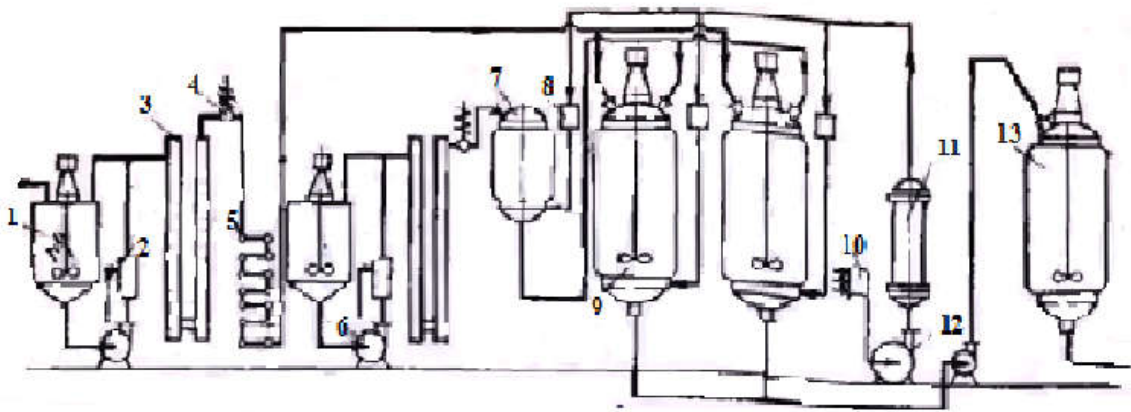


Рис. 13. Технологічна схема вирощування мікроорганізмів глибинним методом

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

Найбільш ефективною є протivotочна екстракція. В промисловості для екстракції ферментів із поверхневих культур мікроскопічних грибів використовують спеціальні 8-секційні дифузійні батареї Роберта для яких використовується цей принцип (рис. 14).

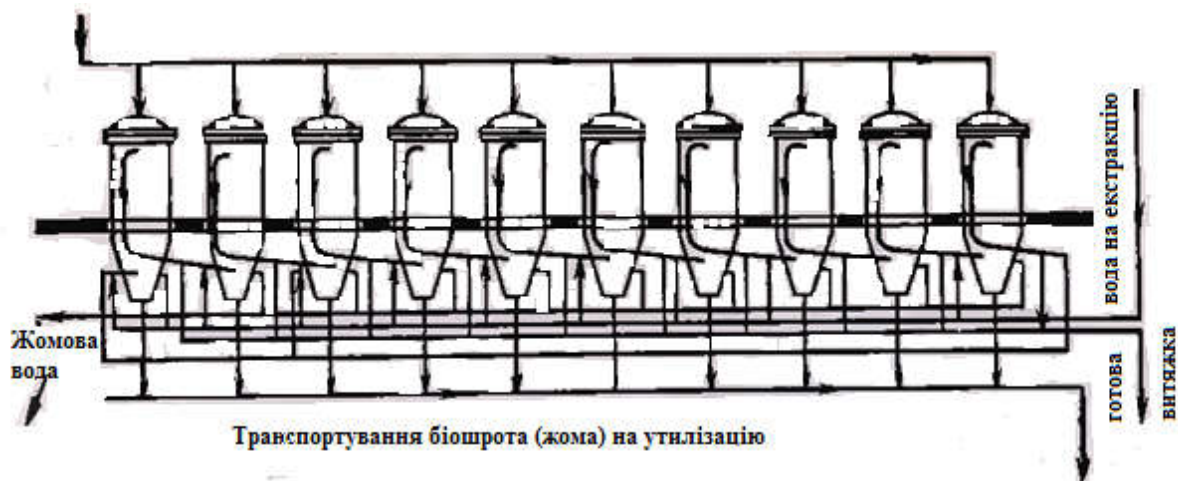


Рис. 14. Дифузійна батарея

Всі дифузійні батареї уніфіковані і мають форму вертикального циліндру з відкритою кришкою, що герметично закривається. В процесі роботи всі дефузори заповнені культурою. Кожен із дифузорів ємністю 300л завантажують 54-60 кг культури за абсолютно сухої речовиною (АСР). Вода температурою 25-27°C з невеликою кількістю антисептика (0,02% розчин формаліну) надходить у перший (хвостовий) дифузор. Після його заповнення

воду перекривають і масу витримують 30 хв. Потім відновлюють подачу води і рідке середовище з першого дифузора переходить у другий. Масу у другому апараті також витримують 30 хв. Процес продовжується до головного восьмого-дифузора, з якого витяжка збирається в збірник. Отримана витяжка містить 10-12% СР.

Вихід ферментів в екстракт значною мірою залежить від кількості відібраної витяжки по відношенню до культури, що знаходиться в дифузорі. Наприклад, повне вилучення амілолітичних і протеолітичних ферментів з культури *Asp. oryzae* досягається при відборі екстракту не менше 220% до абсолютно сухої маси завантаженої культури, а пектолітичні ферменти з культури гриба *Asp. awamori* – при відборі 350% екстракту до завантаженої маси. Повнота вилучення амілолітичних ферментів з культури гриба *Asp. awamori* досягається при відборі екстракту 400% до завантаженої культури.

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.

Сфери використання ферментних препаратів є такими:

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

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

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

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

Глюкаваморин П10Х – препарат комплексної дії, стандартизується за амілолітичною (300 од./г) та декстринолітичною активністю (1200 од./г). Містить також ферменти мальтозу, геміцелюлозу та інші. За результатами досліджень прирости молодняку великої рогатої худоби, який одержував препарат у дозі 0,1% від маси корму, збільшувалися на 9-12 %. Рівень препарату в комбікормах для поросят становить 0,1-0,2%, свиноматок – 0,5%, курчат – 0,5%, ягнят – 0,3%.

Пектаваморин П10Х – комплексний препарат, стандартизується за загальною пектолітичною активністю (3000 од./г) за йодотермічним методом. Препарат містить також геміцелюлазу, пектинестеразу тощо. Оптимальні умови дії: рН 3,5-4,5, температура – 37-40°C.

Амілосубтилін ГЗХ – містить амілолітичні ферменти (1000 од./г) та незначну кількість протеолітичних. Оптимальна дія препарату проявляється за рН 6,0-6,5, температури – 50-55°C. Доза введення в комбікорми – 180-300 г/т. Додавання амілосубтиліну ГЗХ сприяє підвищенню середньодобових приростів молодняку тварин на 10-15%.

Целовіридин Г20Х – світло-сірий порошок, стандартизується за целюлозолітичною активністю (не менше 2000 од./г), містить β-глюканазу 157 (2000-3000 од./г), ксиланазу (не нижче 700 од./г) та інші супутні ферменти. Препарат рекомендовано вводити в комбікорми з підвищеним вмістом ячменю, пшениці, жита, трав'яного борошна, соняшникового шроту та висівки. Норма введення складає від 30 до 100 г/т залежно від рецептури комбікорму, виду та віку тварин. Недоліком препарату є невдала порошкова форма (розпилюється та грудкується).

Протосубтилін ГЗХ поряд з основною протеолітичною дією, справляє комбінований вплив усіх ферментів, що входять до його складу, у тому числі β-глюканази, ксиланази та целюлази. Залежно від складу раціону протосубтилін може використовуватися в комплексі з амілосубтиліном ГЗХ, що забезпечує помітніший ефект. Загальний ефект протосубтиліну ГЗХ пов'язаний із комбінованим впливом усіх ферментів, що входять до його складу, у тому числі β-глюканази, ксиланази та целюлози. Залежно від складу раціону, протосубтилін можна використовувати в комплексі з амілосубтиліном ГЗХ, що забезпечує помітніший ефект.

МЕК СХ-1 являє собою мультиензимну композицію, яку одержують із ферментних субстанцій грибового та бактеріального походження у співвідношеннях, що забезпечують амілолітичну (1000 од./г) та целюлозолітичну (200 од./г) активність.

МЕК СХ-2 – мультиензимна композиція гідролітичної дії. Її одержують змішуванням стандартного препарату целовіридину Г20Х і стандартного препарату амілосубтиліну ГЗХ. Це однорідний дрібний порошок світло-жовтого, світло-сірого або світло-коричневого кольору (залежно від наповнювача). Усуває негативний вплив антипоживних факторів зерна жита та ячменю, сприяє підвищенню перетравності поживних речовин, руйнуючи стінки рослинних клітин, вивільняючи з них крохмаль, протеїн та жир, підвищуючи доступність поживних речовин на 8-12%. Доза уведення препарату в комбікорми – 0,5-2 кг/т. Ефект використання препаратів МЭК СХ становить 4-10%.

Пуріветин – новий багатокомпонентний ферментний препарат целюлозолітичної дії, основу якого становить целюлаза, глюканаза, глікозидаза, амілаза та інші препарати, які діють переважно на внутрішні зв'язки макромолекули целюлози кормів. Крім того, до складу препарату входять метаболіти рибоксин та метилурацил.

Ровабіо Ексель АП – порошкоподібний препарат, призначений для комбікормів на основі пшениці, жита або ячменю (ферменти β-ксиланази, β-глюканази, целюлази тощо, всього більше 17 видів ферментної активності). Доза уведення в комбікорми – 50 г/т.

Кемзайм – мультиензимний комплекс. Кожний вид кемзайму містить шість активних ферментів. Серед них три ферменти, що не виробляються в організмі тварин, розщеплюють некрохмалисті полісахариди (целюлаза, β-глюканаза, пентозоназа), інші виробляються – протеаза, ліпаза, α-амілаза. Оптимальні умови дії ферментів: рН 4,2-5,2, температура – 40°C. Ферменти кемзайма зберігають свою активність після гранулювання за 85°C.

Авізим 1200 – мультиферментний комплекс для бройлерів. Доза

уведення в комбікорм – 1 кг/т.

Натуфос 5000 – містить фітазу (не менше 5000 од./г). Сприяє збільшенню доступності фосфору, поліпшує перетравність білків та амінокислот. Норма введення в комбікорми для бройлерів, індиків та свиней – 100 г/т, для курей-несучок – 80 г/т. Для Натуфос 10000 норма введення в комбікорми у 2 рази нижча.

До ферментів, що застосовуються в тваринницькій галузі, висувають такі вимоги:

- вони повинні бути сумісними з мінералами та вітамінами, а також іншими сировинними компонентами;
- повинні зберігати свою активність у процесі складування;
- бути безпечними і легкими у застосуванні;
- поєднуватися за формою випуску з кормами.

Використання ферментів допомагає:

- поліпшити засвоєння білків і вуглеводів;
- підвищити активність власних травних ферментів;
- покращує економічні показники виробництва;
- більш корисно отримувати корисні речовини;
- скоротити кількість інфекційних захворювань і потребу в антибіотиках;
- знизити рівень посліду;
- збільшити продуктивність, не вдаючись до зміни раціону.

Українські виробники промислових ферментних препаратів

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

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

ТОВ «Дніпровська асоціація-К» (м. Київ). Підприємство створене в 2004 р. Напрями роботи підприємства – науково-виробнича діяльність, зокрема синтез і виробництво ферментних препаратів класу оксидаз і їх модифікацій, атестація препаратів для застосування в Україні та інших країнах,

розроблення і впровадження проектів і технологій застосування ферментних препаратів.

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

Питання для самоконтролю

1. Що таке ферменти і яку роль вони виконують у живих організмах?
2. Які фактори впливають на активність ферментів і чому вони індивідуальні для кожного ферменту?
3. Чим відрізняються індуковані ферменти від конститутивних? Наведіть приклад.
4. Які методи культивування мікроорганізмів-продуцентів ферментів існують і чим вони принципово відрізняються?
5. Які переваги і недоліки має глибинне культивування ферментопродуцентів?
6. Які переваги і недоліки має поверхневий метод культивування ферментопродуцентів?
7. Які способи виділення ферментів застосовують для позаклітинних і внутрішньоклітинних ферментів?
8. Які методи дезінтеграції клітин використовуються для отримання внутрішньоклітинних ферментів?
9. Які основні методи очищення ферментних препаратів і до яких технологій вони належать?
10. Що таке стандартизація ферментних препаратів і як визначається їх активність?

ТЕМА 13: ПРОМИСЛОВЕ ВИРОБНИЦТВО БАР

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

Біологічно активні речовини – це неорганічні органічні сполуки, загальною особливістю яких є висока активність у невеликих кількостях. Серед біологічно активних речовин є як низькомолекулярні (наприклад, вітаміни, алкалоїди), так і високомолекулярні сполуки (наприклад, ферменти, білкові гормони). Загальною особливістю є висока активність у невеликих кількостях.

Більшість БАР відносять до продуктів вторинного обміну, вважаючи первинними білки, ліпіди й вуглеводи. Вони не виконують ні будівельної, ні енергетичної функції, а забезпечують зміну швидкості обміну речовин, пристосовуючи організм до змін навколишнього середовища та здійснюють його захист від несприятливих впливів. До біологічно активних речовин відносять ферменти, гормони, фітогормони, вітаміни, фітонциди, алкалоїди, феромони, антибіотики та ін.

Загальна схема виробництва біологічно активних речовин представлена на рисунку 15.

Сучасне промислове виробництво продуктів біотехнологічної промисловості є єдиним ланцюгом послідовних стадій і операцій, кількість і особливості яких залежать від виду продукції і її товарної форми. Початковим і основним елементом біотехнологічного процесу є продуцент. Потенційні можливості штаму-продуцента зумовлюють економічні показники біотехнологічної схеми в цілому. Основною стадією процесів є стадія культивування штаму-продуцента, на якій відбувається біосинтез цільового продукту – біомаси або метаболітів.

Стадія культивування продуцента може бути охарактеризована якісно і кількісно. Кількісна характеристика – об'ємна продуктивність – виражається в грамах (кілограмах) цільового продукту на 1 м³ устаткування, ферментації, за 1 год і служить загальним критерієм ефективності процесу, який визначає собівартість цільового продукту.

На подальших стадіях виробництва біопрепаратів не відбувається приріст цільового продукту, а проводиться його обробка. Мета цих стадій – отримання необхідної товарної форми препарату. На цих стадіях необхідно максимально зберегти цільовий продукт.

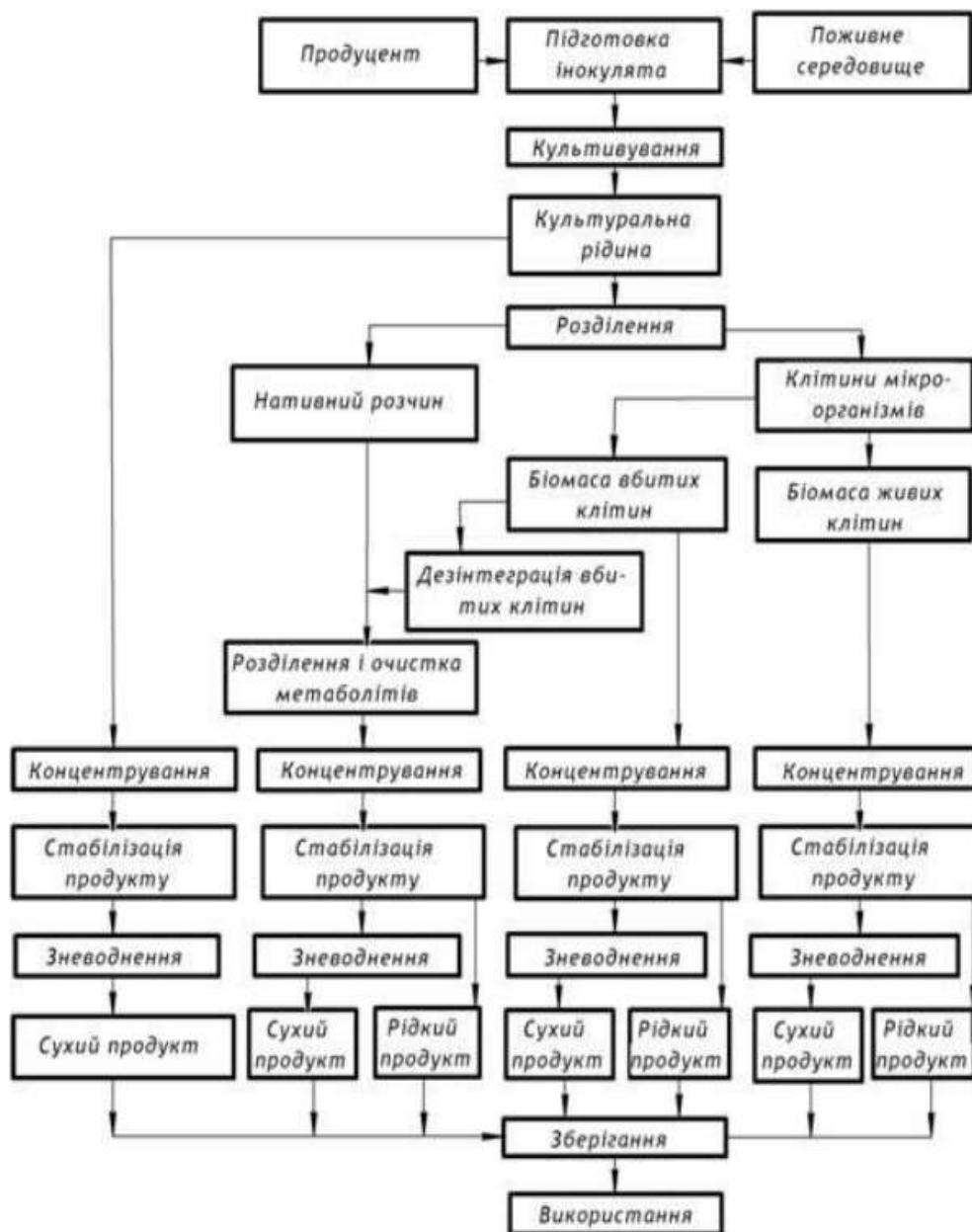


Рис. 15. Загальна схема виробництва біологічно активних речовин

Основна маса товарної продукції випускається промисловістю в двох формах: сухий продукт (порошок, гранули, мілкодисперсні частинки) і рідкий продукт (концентрат із вмістом сухої речовини до 50%).

На рисунку 15 показані чотири варіанти обробки культуральної рідини при виробництві біопрепаратів. Найбільш простий – варіант, коли кінцевий продукт – культуральна рідина.

По цій схемі одержують кормові препарати вітамінів, кормові антибіотики і ін. Схеми отримання біопрепаратів на основі продуктів, що містяться в твердій фазі культуральної рідини, складніші. По цих схемах одержують біопрепарати, що мають життєздатні або убиті клітини мікроорганізмів. І четвертий, останній, шлях отримання біопрепаратів – на

основі очищених продуктів метаболізму, виділених з фільтрату культуральної рідини або із зруйнованої маси (дезинтеграта) кліток продуцента. Ця схема охоплює виробництво продуктів біотехнологічного синтезу з різною ступенем чистоти.

Як бачимо, процес виробництва БАР багатостадійний, складний та тривалий. Однією із кінцевих стадій виробництва БАР є їх концентрування з метою виділення кінцевого продукту.

Найбільш широко вживаними методами виділення і хімічного очищення є екстракційні, іонообмінні методи, мембранні процеси і осадження. Відмітні особливості всіх методів – велика кількість технологічних стадій (неодноразове відділення – фільтрація осадів, дво- і триступінчате екстрагування, кристалізація, концентрація розчинів вакуум випаровуванням, застосування різних методів сушки і т. д.), різноманітність і складність використовуваного устаткування, його різномасштабність (на перших стадіях об'єми – до сотень кубічних метрів, на останніх – іноді декілька літрів). Так, наприклад, застосовують вакуум-барабанні фільтри, фільтрпреси, друк- і нутч-фільтри, сепаратори і центрифуги різної продуктивності, екстрактори різних конструкцій, іонообмінні колони, плівкові випарники різних систем, сушильні установки, що працюють за принципом розпилювання, псевдозрідження, сублімації льоду, і інші види устаткування.

Необхідно підкреслити, що в самій схемі виробництва продуктів біотехнологічного синтезу закладена можливість комплексної переробки культуральної рідини, тобто створення безвідходних технологій. При проектуванні нових виробництв цю можливість необхідно реалізувати.

В основі **промислового виробництва БАР** із культури клітин рослин лежить ряд послідовних стадій і операцій: одержання високопродуктивних продуцентів, розробка найбільш сприятливих умов культивування продуцента БАР із максимальним біосинтезом цієї речовини, добір і впровадження в практику відповідних методів виділення та очищення БАР, створення готових препаратів і контроль якості. Робота на кожному з цих етапів має проводитися кваліфікованими фахівцями (технологами, біотехнологами, генетиками).

Підготовка середовища для культивування продуцента посівного матеріалу (*перша стадія*). Для кожного продуцента БАР, для кожного наново утвореного калусу і суспензійної культури рослин розробляється своє оптимальне середовище, яке повинне задовольняти основним вимогам:

а) забезпечувати добрий ріст біомаси і максимально утворювати БАР (алкалоїди, глікозиди, полісахариди, терпеноїди та ін.);

б) містити доступні за вартістю компоненти; в) забезпечувати застосування найбільш економічних і ефективних способів виділення та очищення БАР.

Середовище для культивування. Компоненти середовища для вирощування калусних і суспензійних культур можна розділити на шість груп, що звичайно відображає порядок готування концентрованих вихідних розчинів:

1. основні поживні речовини (макроелементи);
2. мікроелементи;
3. джерела заліза;
4. органічні добавки (вітаміни);
5. джерела вуглецю;
6. регулятори росту рослин.

Середовища Мурасіге-Скуга (МС) і Шенка-Хільдебрандта (ШХ) належать до найбільш використовуваних у роботі з культурами клітин рослин і виявилися ефективними для росту різних одно- і дводольних рослин. Їх вважають середовищами з високим вмістом солей (у порівнянні з низькосольовим середовищем Уайта).

Середовище ШХ від інших середовищ відрізняється дуже високим, десятикратним вмістом мезоінозиту. Середовища МС і ШХ містять залізо в хелатній формі в комплексі з етилендіамідтетраацетатом (ЕДТА). Це забезпечує його доступність при рН до 8,0 протягом усього періоду росту культури, тоді як за відсутності характеристичного агента нестача може виникнути дуже швидко.

У реактор із мішалкою за допомогою вакууму вносять по черзі приготовлені розчини, дотримуючись такої черговості:

- розчин макросолей;
- агаризований розчин;
- розчин феруму хелату;
- розчин мікроелементів;
- розчин кальцію нітрату;
- розчин цукру.

Суміш ретельно перемішують протягом 15хв, потім 1-2 хв. Проводять вертикальне перемішування барботуванням при включеній мішалці.

Обов'язково відбирають контрольні проби для визначення рН середовища (рН має бути в межах 5,6-6,2, температура розчину $152 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$).

Стерилізація живильних середовищ у промислових умовах здійснюється двома основними методами: періодичним і безперервним. Періодичний метод стерилізації. Застосовують під час використання

невеликих об'ємів середовища. Він полягає в тому, що середовище, нагріте до певної температури (120-125°C) безпосередньо у ферментаторах або в спеціальних парових стерилізаторах ГПСД-1700, витримується при цій температурі протягом 30-60хв (залежно від об'єму середовища або від його складу), після чого охолоджується до 27-30 °С.

Безперервний метод стерилізації доцільно застосовувати при використанні великих об'ємів середовища. Приготовлене середовище зі спеціальної посудини за допомогою насоса подається в стерилізаційну колону, через яку пропускається гостра пара (тиск пари близько 5атм). Пара подається зверху по внутрішній трубі, яка має щілиноподібні прорізи, завдяки чому пара надходить у середовище і швидко його нагріває. Середовище в колону подається знизу і рухається по спіралі навколо внутрішньої труби.

Нагріте в колоні до необхідної для стерилізації температури (близько 125°C) середовище надходить у спеціальний апарат – видержувач, де воно витримується при температурі 120-125°C. Час витримування залежить від складу середовища (5-10хв.) Звидержувача стерильне середовище надходить у змішувальний холодильник. Тут воно охолоджується до 30-35°C (на виході) і надходить у ферментатор. Безперервний метод стерилізації має багато переваг перед періодичним методом: можливість автоматичного регулювання процесу, швидке і рівномірне нагрівання середовища, забезпечення більш повної стерильності середовища та інші чинники.

Підготовка посівного матеріалу – одна з відповідальних операцій у циклі біологічного методу одержання БАР із культури тканин.

Культуру тканини (колекцію культури) заводу отримують з академій і університетів. Кожна культура має паспорт із докладним описом морфології, фізіології, характеристики середовища для культивування і збереження.

Для **твердофазного методу культуру тканини** вирощують на агаризованому стерильному живильному середовищі в колбах місткістю 0,25 л у термостатованому приміщенні або термостаті з температурою $27 \pm 1^\circ\text{C}$. Через 38-46діб росту тканину материнської культури ріжуть таким чином, щоб інокулюм складався із вертикального стовпа (верхній шар, середній і частина нижнього шару безагаризованого середовища).

Не можна допускати дій на культуру деззасобів, бактерицидних ламп, тому що це призводить до інактивації росту. З однієї материнської культури пересаджують 7-9 дочірніх культур і через 38-46 діб росту в термостатованому приміщенні відбирають колби з культурами тканин кращих ростових ознак. Для таких культур характерні швидкий ріст, максимальне використання поживного середовища, колір тканини від

ясножовтого до молочного, відсутність некротичних включень.

Для *глибинного (суспензійного) методу культуру тканини* попередньо вирощують на агаризованому стерильному середовищі в пробірці, потім із пробірок висівають у колби з рідким живильним середовищем і проводять дві генерації глибинного вирощування на качалках протягом 38-46 діб для кожної генерації. З другої генерації культури (у колбі) проводять висівання у невеликий (10 л) інокулятор, а потім культуру, яка добре розвивається, переносять в основний ферментатор. Для засівання в основному ферментаторі використовують від 5 до 10 об'ємних відсотків посівного матеріалу (інокуляту).

Промислове виробництво БАР із культури клітин рослин

Стадія біосинтезу (друга стадія виробництва БАР) – основна біологічна стадія процесу одержання БАР із культури тканин. *Завдання цієї стадії* – забезпечення для продуцента БАР таких умов розвитку, які б сприяли максимальному рівню біосинтезу БАР.

Ефективність стадії біосинтезу залежить від рівня утворення БАР із культури тканини і визначається генетичними особливостями організму, складом живильного середовища, режимом розвитку продуцента. Вона також залежить від часу максимального утворення БАР, вартості компонентів середовища, піногасників і енергетичних витрат, пов'язаних із процесом розвитку організму – продуцента БАР.

Нині виробництво БАР із культури тканин здійснюють двома способами ферментації: *культивуванням на поверхні твердого середовища (твердофазна ферментація)* і *зануреним глибинним культивуванням (суспензійне)*.

Розвиток організму-продуцента БАР у ферментаторах. Процес розвитку організму-продуцента БАР у ферментаторах проходить за умови суворого контролю всіх стадій, дуже точного виконання розробленого регламенту умов нагромадження БАР. Велика увага приділяється підтримці заданої температури культивування, активної кислотності середовища рН, ступеня аерації і швидкості роботи мішалки. З огляду на споживання організмом основних поживних компонентів субстрату (джерела вуглеводу, азоту, калію, магнію, фосфору, амінокислот, вітамінів) контролюється утворення БАР.

Особливу увагу під час розвитку продуцента у ферментаторах звертають на процес *піногасіння*. При продуванні повітря через організм-продуцент БАР часто відбувається густе піноутворення, що суттєво порушує проходження всього процесу розвитку штаму-продуцента БАР у ферментаторі. Основна причина появи великої кількості піни – висока

в'язкість живильного середовища, обумовлена сильним нагромадженням біомаси.

Для боротьби з піною у ферментаторах при одержанні біомаси використовують різні **поверхнево-активні речовини**: рослинні олії (соєву, соняшникову), мінеральні масла (вазелінове, парафінове), спирти і жирні кислоти. Нерідко як піногасники використовують спеціальні синтезовані речовини (силікони, діазобуталкарбоміл та інші сполуки).

Вирощування тканини проводять протягом 70 діб. У цей період здійснюють мікробіологічний, біохімічний і візуальний контроль.

Візуальний контроль проводять не рідше одного разу в 10 днів – відбраковують інфіковані тканини.

Попередня обробка біомаси (третьа стадія).

У процесі розвитку організму-продуцента БАР ці речовини майже повністю виділяються з клітин у навколишнє середовище. Однак у деяких випадках лише частина БАР виділяється в культуральне середовище, а інша частина зберігається усередині клітин. У деяких продуцентах БАР вони майже повністю містяться в клітинах організму.

Залежно від того, де антибіотична речовина зосереджена, застосовують відповідні методи її екстракції.

При твердофазному способі культивування з колби місткістю 0,25 л із добре вирощеної культурної тканини спочатку знімають сиру біомасу, потім сушать біомасу на листах при температурі $58 \pm 2^\circ\text{C}$. Час сушіння біомаси залежить:

- від початкової вологості біомаси;
- товщини шару біомаси;
- температури сушіння.

Закінчення процесу сушіння визначають на дотик. Не повинно бути м'яких вологих грудок. Суха маса повинна мати забарвлення від жовтого до коричневого кольору, має бути пухкою, легко розсипатися при продавлюванні між пальцями. Залишкова вологість біомаси після висушування – не більше 12%. Потім суху біомасу подають на стадію виділення та очищення БАР з аналітичним паспортом на вміст БАР.

При глибинному культивуванні, якщо БАР знаходиться в культуральній рідині, її виділяють методами екстракції розчинниками, які не змішуються з рідкою фазою, або осаджують у вигляді нерозчинної сполуки, або сорбують іонообмінними смолами.

Виділення БАР із клітин організму-продуцента здійснюють за допомогою екстракції органічними розчинниками. Якщо БАР містяться в культуральній рідині та в клітинах продуцента, первинною операцією їх

виділення є переведення у фазу, з якої найбільш доцільно їх ізолювати. Для цього БАР, яка міститься в культуральній рідині і в клітинах продуцента, переводять в осад, а потім її екстрагують.

Відділення нативного розчину від біомаси і завислих частинок проводять методами фільтрації або центрифугування.

Для *процесу фільтрації* використовують різні фільтрувальні апарати: фільтрпрес, нутч-, друк-фільтри, центрифуги, сепаратори.

Фільтрпреси використовують для обробки великих об'ємів культуральної рідини. Ці апарати складаються із плит і рам, що чергуються, і фільтрувальних перегородок між ними. Процес фільтрації здійснюється під тиском.

Для фільтрації невеликих об'ємів культуральної рідини звичайно використовують **нутч-, друкфільтри**. Перший апарат працює під вакуумом, другий – в умовах підвищеного тиску над рідиною, що фільтрується.

Для одержання рідини, звільненої від завислих частинок, найбільшого поширення набув **метод центрифугування**. Хороші результати досягаються при правильному виборі швидкості подачі рідини (кращий варіант – 15 000 об/хв).

Відділення міцелію або інших завислих частинок може також відбуватися в сепараторах. При швидкості обертання барабана, яка дорівнює 7000-7500 об/хв, завдяки відцентровій силі тверді частинки спрямовуються до стінок барабану, де й осаджуються, а відсепарована рідина спрямовується до центра барабана і піднімається в спеціальні камери.

Виділення та очищення БАР (четверта стадія).

У процесі утворення БАР у біомасі (твердофазний спосіб культивування) і в культуральній рідині (глибинний спосіб культивування) разом із різними невикористаними компонентами середовища виділяються і різноманітні продукти обміну, продукти автолізу клітин.

Видалення домішок – перша і дуже важлива стадія хімічного очищення БАР.

Стадія виділення і хімічного очищення включає низку процесів: від обробки нативного розчину до висушування готового очищеного препарату. На цій стадії, залежно від властивостей БАР, їх хімічної будови і місця основного накопичення застосовують різні методи виділення та очищення. Як основні методи застосовують екстракцію в системах рідина-рідина, екстракцію осадження, сорбцію на різних сорбційних матеріалах, мембранні методи очищення, кристалізацію, упарювання, висушування.

Однією з особливостей стадії виділення і очищення є те, що під час виділення БАР доводиться працювати з дуже невисокими концентраціями

речовин, що виділяються, (не перевищують 2%).

Питання для самоконтролю:

1. Надати загальну характеристику біологічно активним речовинам.
2. Які основні стадії виробництва біологічно активних речовин?
3. В чому суть стадії біосинтезу виробництва БАР?
4. За яких умов проходить процес розвитку організму-продуцента БАР у ферментаторах?
5. Які кінцеві стадії виробництва БАР?
6. Які відмінні особливості всіх методів виділення біологічно активних речовин?
7. Які методи екстракції залежно від локалізації антибіотичної речовини?.
8. Які стадії виділення та хімічного очищення БАР?

ТЕМА 14: ТЕХНОЛОГІЧНІ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА КОРМОВИХ АНТИБІОТИКІВ

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

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

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

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

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

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

Основними вимогами при використанні антибіотиків у якості стимуляторів росту і продуктивності сільськогосподарських тварин було – дозування препаратів у відповідності до встановлених норм, рівномірне змішування з кормами, безперервне давання їх тваринам, своєчасне виключення їх із раціону тварин, які йдуть на забій.

Антибіотики – сильнодіючі засоби, тому препарати антибіотиків зберігають як речовини списку Б: у окремому темному, сухому, прохолодному приміщенні, не більше 12 місяців з дня їх виготовлення.

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

перемішують з іншою порцією концентратів.

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

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

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

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

Промисловий процес виготовлення антибіотиків проходить за наступними етапами (рис. 16):

1. Стадія біосинтезу (утворення) антибіотика. Це основний біологічний етап складного процесу одержання антибіотичної речовини. *Головне завдання на цій стадії* – створення оптимальних умов для розвитку продуцента й максимально можливого біосинтезу антибіотика. Висока результативність стадії залежить від рівня біосинтетичної активності продуцента антибіотика, часу його максимального накопичення, складу поживних середовищ для культивування організму, у тому числі вмісту застосовуваних попередників, а також загальних енергетичних витрат на процеси, пов'язані з розвитком продуцента антибіотичної речовини.

2. Стадії попередньої обробки культуральної рідини, клітин (міцелію) мікроорганізму й фільтрації (відділення культуральної рідини від біомаси продуцента). Ефективність стадії багато в чому визначається складом середовища для вирощування продуцента антибіотика, характером його росту, місцем основного нагромадження біологічно активної речовини (у культуральній рідині або всередині клітини).

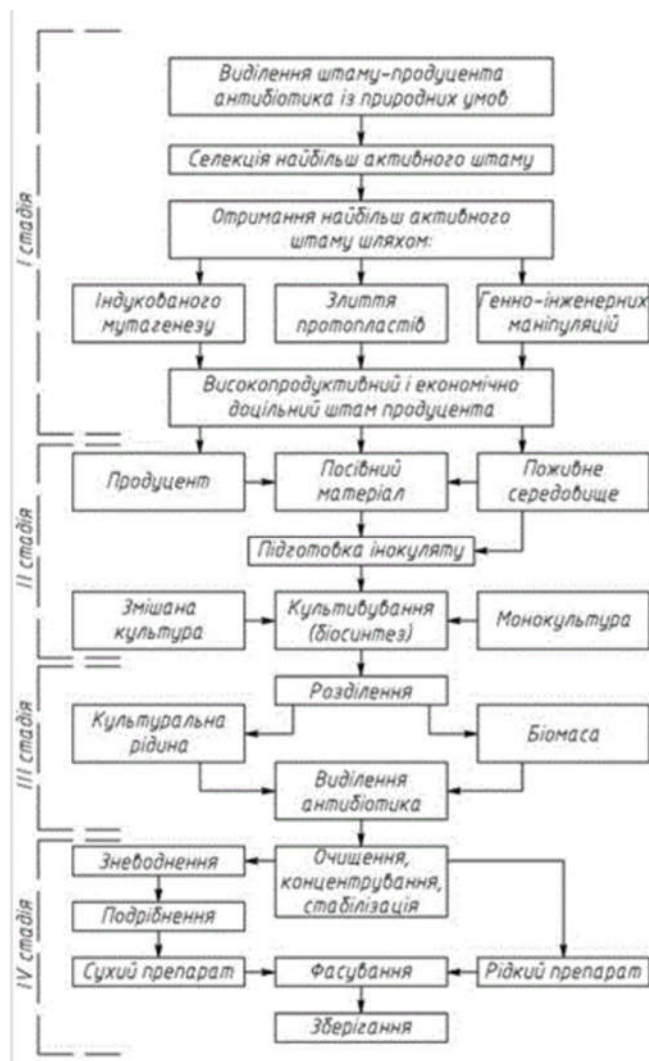


Рис. 16. Схема виробництва антибіотиків в процесі мікробіологічного синтезу

3. Стадії виділення й очищення антибіотика. На цій стадії, залежно від властивостей антибіотика, його хімічної будови й основного місця нагромадження антибіотичної речовини, застосовують різні методи виділення й очищення. У якості основних методів використовуються екстракція, осадження, сорбція на йонообмінних матеріалах, розпарювання, сушіння.

Особливість цієї технологічної стадії визначається тим, що на першій стадії мають справу з невеликою концентрацією (~1%) антибіотика в оброблюваному розчині, тоді як на наступних етапах його концентрація збільшується до 20-30 %. Усе це вимагає застосування різних місткостей і об'ємів використовуваних реагентів.

4. Стадії одержання готової продукції, виготовлення лікарських форм, розфасовки. Особливість стадії обумовлюється дуже високими вимогами до якості кінцевого продукту. У випадку випуску антибіотиків,

призначених для ін'єкцій, препарати повинні бути стерильними; одержання таких антибіотичних препаратів, готування різних лікарських форм, дозування (розфасовка) і пакування повинні здійснюватися в асептичних умовах.

У господарствах антибіотики додають у корма частинами. Спочатку відміряну кількість антибіотика змішують з невеликою або рівною кількістю концентратів. Потім до суміші додають ще стільки концентратів, щоб у отриманій суміші антибіотиків було не менше 10 частин, і ретельно перемішують з іншою порцією концентратів.

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

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

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 біоміцину або *Penicillium chrisogenum* для пеніциліну (рис. 17).

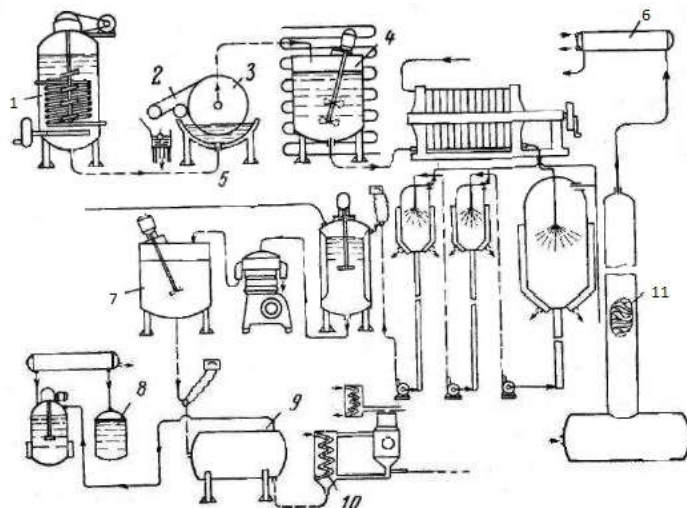


Рис. 17. Класична технологічна схема виробництва кормового антибіотику

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

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.

Аерація культури в ферментері (рис. 18) 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.

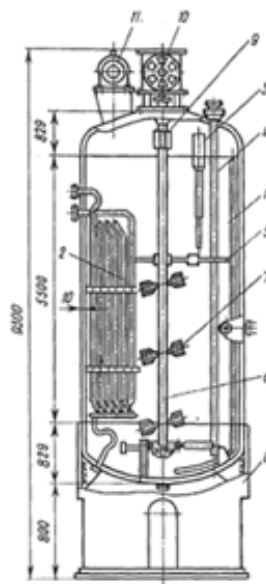


Рис. 18. Ферментер для глибинного вирощування продуцентів антибіотиків

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

Підтримання температури, оптимальної для гарного росту продуцента антибіотика і прояви їм підвищеної фізіолого-біохімічної активності, забезпечується сорочкою ферментера або системою змійовиків. Змійовики використовуються також для подачі пари в процесі стерилізації або води для охолодження.

Спостереження за основними процесами життєдіяльності організму здійснюється контрольовано-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 вугіллям.

Питання для самоконтролю:

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

ТЕМА 15: ТЕХНОЛОГІЧНА СХЕМА ВИРОБНИЦТВА ЖИРО- ТА ВОДОРОЗЧИННИХ ВІТАМІНІВ

Вітаміни – це низькомолекулярні органічні сполуки, роль яких для нормальної життєдіяльності організму добре відома. Оскільки в харчових продуктах вітамінів міститься небагато(в 100 мл на100 г їжі)і вони швидко руйнуються, треба вітамінізувати готову їжу та продукти. Ось тому вітаміни вже давно виробляються в великих кількостях.

Вітаміни класифікують за фізичними властивостями **на розчинні в жирах і розчинні у воді**. Позначення літерою об'єднує групу вітамінів, що використовуються при одному типі захворювань (крім вітамінів групи В та ще деяких виключень).

Жиророзчинні вітаміни (добова норма, мг):

А – антиксерофтальмічний; ретинол (2,7),

Д – антирахітичний; кальціфероли (0,01-0,025),

Е – вітамін розмноження; токофероли (5,0),

К – антигеморагічний, чинник згортання крові; нафтохінони (1,0).

Водорозчинні вітаміни:

В – цілий комплекс вітамінів різної спрямованості дії:

В1 – антиневритний; тіамін (1,2),

В2 – вітамін росту; рибофлавін (1,7),

В3 – антидерматитний; пантотенова кислота (3-5),

В6 – антидерматитний; піридоксин (2),

В12 – антианемічний; ціанокобаламін (0,003),

Вс – антианемічний, фолієва кислота (1-2,2),

С – протицинготний, аскорбінова кислота (75),

РР – противопелагричний, капіляррозміцнюючий; біофлавоноїди (18),

Н – антисеборейний; біотин (0,25).

Традиційно способи отримання вітамінів основані або на переробці великої кількості сировини, або в рідких випадках на штучному синтезі. Ось тому вітамінна промисловість вимагає більш ефективних технологій. Такі технології успішно створені лапша вок заказать на дом wok in box доставка китайской лапши вок.

З допомогою генетичних маніпуляцій були отримані штами мікроорганізмів, які продукують в десятки тисяч разів більше вітамінів, ніж необхідно для їх росту. Це штами *Denitifrilians* і *Propionibacterium freudenreichii*, які продукують вітаміни В₁₂ та інші.

В Японії розроблений ефективний ферментативний спосіб отримання стабільного необхідного вітаміну С-аскорбін-2-фосфата, який

використовується в якості антиоксиданту.

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

Більшість вітамінів в організмі не синтезується, а надходить із їжею, головним чином рослинною. Рослинна вітаміномістка сировина коштовна тим, що концентрати з нього містять комплекс речовин, що підсилюють лікувальний ефект вітамінів.

Вітаміномісткі препарати випускають у рідких лікарських формах (масляні розчини, соки, концентрати, вітамінізовані бальзами, засоби для парентерального застосування), у твердій (збори для готування чаю, драже, таблетки, капсули). Різні сполучення вітамінів можуть входити до складу інших лікарських форм.

Більша частина вітамінних препаратів у цей час або є синтетичними речовинами, або являє собою натуральні продукти (наприклад, риб'ячий жир). Однак серед них є екстракційні препарати, одержувані з рослинної лікарської сировини. Це препарати плодів шипшини, незрілих плодів волоського горіха, хвої ялини й сосни, ягід чорної смородини, обліпихи й інших.

Вітамінна промисловість – галузь медичної промисловості, підприємства якої виробляють синтетичні вітаміни, коферменти та їхні препарати (драже, таблетки, ампули, капсули, гранули, концентрати), а також вітамінні препарати з рослинної сировини.

За допомогою генетичних маніпуляцій були отримані штами мікроорганізмів, які продукують в десятки тисяч разів більше вітамінів, ніж необхідно для їх росту. Це штами *Denitifrificans* і *Propionibacterium freudenreichii*, які продукують вітаміни B₁₂ та інші.

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

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

Світова продукція вітаміну B₁₂ становить 9-11 тис. кг на рік; з них 6500 кг використовують на медичні цілі, а іншу частину - для тваринництва. Виробництво вітаміну B₁₂ засновано головним чином на культивуванні пропіоновокислих бактерій (в Великобританії, Угорщини), мезофільних та термофільних меганогенних бактерій (Угорщина), а також актиноміцетів і споріднених форм (Італія).

У нашій країні в якості продуцента вітаміну B₁₂ використовують *Propionibacterium freudenreichii* var. *Shermanii*.

Для отримання вітаміну B₁₂ 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.

Для збагачення кисломолочних продуктів вітаміном В₁₂ використовують пропіоновокислі бактерії як у чистому вигляді, так і у вигляді концентрату, приготованого на молочній сироватці.

Для потреб тваринництва вітамін В₁₂ отримують, використовуючи змішану культуру, яка містить термофільні метаноутворюючі бактерії. Встановлено утворення кориноїдів не тільки в змішаній, а й у чистій культурі метаноутворюючих бактерій *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium formicum*, *Mb. thermoautotrophicum* при зростанні в присутності Н₂ і СО₂. Вміст кориноїдів у метанобразуючих бактерій випадках становить 1,0-6,5 мг/г сухої біомаси.

За допомогою змішаної культури метаноутворюючих бактерій розроблено метод одержання кормового препарату вітаміну В₁₂-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.

Технологічна схема отримання вітаміну В₁₂ (рис. 19).

Посівний матеріал готують спочатку в пробірках по 30 мл, потім в колбах по 500 мл і послідовно в ферментерах ємністю 100 і 1000 л. Приготування посівного матеріалу проводять в анаеробних умовах протягом 2-4 діб при 30°C на середовищі аналогічного складу до накопичувального з додаванням 0,003 г хлористого кобальту.

Попереднє вирощування культури для виробництва вітаміну В₁₂ займає до 18 діб. Заключну ферментацію проводять також в анаеробних умовах.

Ферментація проходить у дві фази. Перша триває 67 год (з моменту засіву середовища культурою бактерій до внесення 5,6-ДМБ) і протікає в строго стерильних умовах при 28-30°C. При цьому відбувається розмноження бактерій з інтенсивним наростанням біомаси (50-55 год

ферментації), супроводжуване утворенням пропіонової і оцтової кислот, які нейтралізуються додаванням 40% розчину їдкого натру або аміачної води, підтриманням рН на рівні 6,5-7,0.



Рис. 19. Технологічна схема отримання вітаміну B₁₂

У першій фазі *P. shermanii* накопичує в основному (80% і більше) який не містить нуклеотидного підстави попередник вітаміну B₁₂ (фактор В), а також деяку кількість повних кориноїд, в тому числі кобаламін (8-10%), псевдовітамін B₁₂ і фактор А.

Трансформація цих продуктів в активну для людини і тварин форму вітаміну B₁₂ (кобаламін) відбувається в другій фазі ферментації в результаті внесення в середу 5,6-ДМБ (10-20 мг/л) в умовах аерації (2 м³/год).

За цей час фактор В і частина інших аналогів вітаміну B₁₂ переводяться в кобаламін, що містить в нуклеотидної частини молекули доданий азотистих основ.

Для екстрагування вітаміну клітини нагрівають при 80-120°C протягом 30 хв при рН = 6,1-8,5.

Перетворення в кобаламін досягають, обробляючи гарячий розчин або клітинну суспензію ціанідом або тіоціанатом, часто в присутності NaNO₂ або хлораміну В₁₂. Кориноїд сорбують на різних носіях: амберліт IRC-50, Al₂O₃, активному вугіллі і елюїрують водними спиртами або водно-фенольними

сумішами. З водних розчинів кориноїд екстрагують спиртом, фенолом або крезолу, або сумішшю цих фенолів з бензином, бутанолом, тетрахлорид вуглецю або хлороформом.

Основні точки контролю. Важлива умова нормального процесу бродіння – контроль рівня жирних кислот і амонійного азоту. Вітамін В₁₂ нестійкий при тепловій обробці, особливо в лужному середовищі. Тому перед випарюванням до метанової бражки додають НСІ до оптимального значення рН 5,0-5,3 і сульфід Na (оптимальний вміст 0,07-0,1%).

Вихід продукту зазвичай становить 50-60% від його вмісту у вихідній культуральній рідині. До кристалічного вітаміну В₁₂ додають воду для ін'єкцій.

Технологічна схема отримання концентрату вітаміну В₁₂ за допомогою змішаної культури метаноутворюючих бактерій представлена на рис. 20.

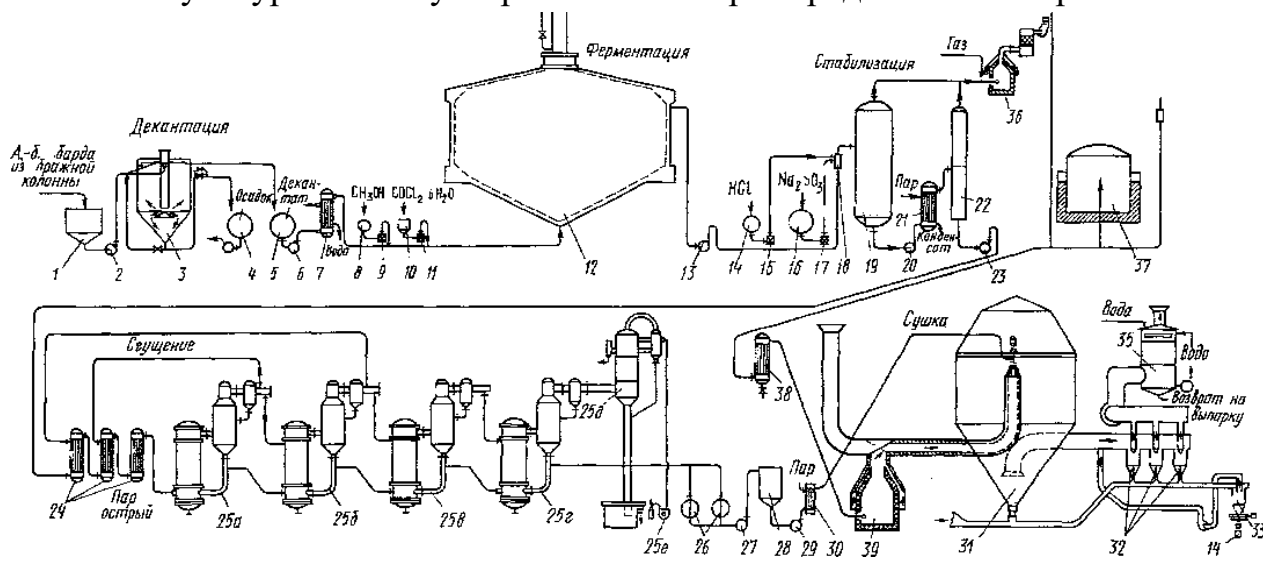


Рис.20. Технологічна схема отримання концентрату вітаміну В₁₂ за допомогою змішаної культури метаноутворюючих бактерій

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 – циклон 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°C, метанол і хлористий кобальт надходять в ферментер 12.

Зброджену масу з верхньої частини ферментера відбирають і направляють в реактор 19, де здійснюють стабілізацію вітаміну B₁₂ 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.

Питання для самоконтролю:

1. Надати характеристику терміну «вітаміни».
2. Надати характеристику терміну «вітамінна промисловість».
3. Назвіть специфічні особливості вітамінних препаратів.
4. Що використовують в якості теплоносія для сушіння вітамінів?
5. Охарактеризуйте технологічну схему виробництва концентрату вітаміну B₁₂.
6. Яким методом культивують бактерії для отримання вітаміну B₁₂?
7. Які бактерії застосовують для збагачення кисломолочних продуктів вітаміном B₁₂?
8. Технологічні стадії отримання концентрату вітаміну B₁₂.
9. Яка важлива умова нормального процесу бродіння?
10. Які фактори роблять економічним технологію отримання вітаміну B₁₂?

ТЕМА 16: ВИРОБНИЦТВО ПРОБІОТИКІВ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ У ТВАРИННИЦТВІ

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.

Для застосування в кормах доступні **3 основних види пробіотиків**.

Мікроорганізми, використовувані в кормах для тварин в ЄС, – це в основному бактеріальні штами грампозитивних бактерій, що належать до типів *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, і штам дріжджів виду *Saccharomyces cerevisiae*. Ці штами можна розділити на 3 основні групи:

- спороутворюючі бактерії (*Bacillus*);
- молочнокислі бактерії;
- живі дріжджі.

2. Різні способи дії і цільове використання

Пробіотичні форми відрізняються один від одного за властивостями і способом дії. Ці відмінності безпосередньо впливають на вибір відповідного пробіотика в залежності від передбачуваної мети.

Спори *Bacillus* – для покращення шлунково-кишкової функції і зростання. *Bacillus* використовується в промисловості для виробництва ферментів. У тварин ці спори утворюють ферменти і сприяють засвоюваності корму. Завдяки продукуванню ферментів, пробіотики на основі бацил допомагають покращити продуктивність тварин з точки зору щоденного приросту ваги і використання корму. Іншим сприятливим аспектом у годівлі тварин є те, що *Bacillus* в залежності від штаму проявляє інгібуючу дію проти певних патогенів. Як правило, штами *Bacillus B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* і *B. coagulans* наразі використовуються в кормах для тварин.

Молочнокислі бактерії – швидка колонізація ШКТ молодих тварин. Молочнокислі бактерії широко використовуються в продуктах для годівлі тварин і харчування людини. Варто тільки подумати про промислове виробництво молочної кислоти або «квашеної капусти». Ця бактерія особливо корисна для молодняка. Завдяки її здатності швидко колонізувати кишечник. Молочна кислота також інгібує патогенні мікроорганізми. Це дає перевагу корисним бактеріям і, як відомо, робить позитивний вплив на молодих тварин.

Живі дріжджі корисні для жуйних тварин – вони запобігають ацидозу

рубця і покращують засвоюваність клітковини

Пробіотичні властивості живих дріжджів в першу чергу корисні для використання у жуйних і коней, а також для свиней. Особлива перевага живих дріжджів полягає в тому, що вони зменшують утворення молочної кислоти в рубці, що знижує ризик виникнення ацидозу рубця.

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визначає пробіотики як живі мікроорганізми, які «при введенні в адекватних кількостях приносять користь здоров'ю господаря». Пробіотики дозуються в колонієутворюючих одиницях (КУО). КУО є параметром, що вказує на життєздатність пробіотика, і може бути вимірний шляхом підрахунку пластин. Високий рівень КУО забезпечує безпеку і надійність.

Пробіотики, які передбачено використовувати у годівлі тварин, повинні бути дозволені як кормова добавка. При цьому повинен бути відомим механізм дії пробіотика і доведена його безпечність для здоров'я тварини і людини. Живі культури не повинні також втрачати свої активності при зберіганні.

Залежно від технології сучасні пробіотики поділяють на дві групи. До першої групи належать пробіотики, які виробляють **методом ліофільного сушіння суспензії живих активних бактерій**. Така форма готового продукту характеризується тривалим терміном придатності та стійкістю до нетривалих змін температури зберігання. Істотним її недоліком є те, що після ліофілізації бактерії перебувають у анабіозі (неактивному стані). Для повернення в активний фізіологічний стан їм потрібно 2-4 год, а за цей час більша частина бактерій виводиться з організму. Крім того, в процесі ліофілізації бактеріальні клітини втрачають специфічні рецептори, які забезпечують прикріплення до поверхонь, тому тривалість їхнього перебування у кишечнику істотно знижується.

Другу групу складають рідкі **«живі» пробіотики**, під час виробництва яких мікробні клітини залишаються в активному стані та здатні до колонізації ПКТ уже через 2 год.

Незважаючи на різноманітність пробіотичних препаратів, їхнє виробництво передбачає два основних блоки робіт: допоміжні роботи і власне технологічний процес.

До **допоміжних робіт** належать: санітарна підготовка виробництва (підготовка виробничого персоналу, виробничих приміщень, технологічного обладнання і технологічного одягу, приготування мийних, дезінфікувальних та мийно-дезінфікувальних розчинів); підготовка повітря для виробничих приміщень, води фармакопейної якості, сировини і матеріалів (приготування поживних і захисних середовищ, первинного пакування).

Технологічний процес охоплює приготування посівного матеріалу (за потреби одержання культури I-III генерації), виробничий біосинтез, змішування культуральної рідини із захисним середовищем (середовище сушіння), розлив, одержання ліофілізованого напівпродукту (заморожування і сублімаційне сушіння), герметизація напівпродукту, пакування готової продукції, маркування і відвантаження. У деяких випадках мікробна суспензія заморожується і сушиться у низькотемпературних піддонах, після чого подрібнюється і використовується для подальшого виробництва таких форм пробіотичних препаратів, як капсули, таблетки, супозиторії.

Традиційна принципово-технологічна схема отримання пробіотику «Біфітен» представлена на рисунку 21.

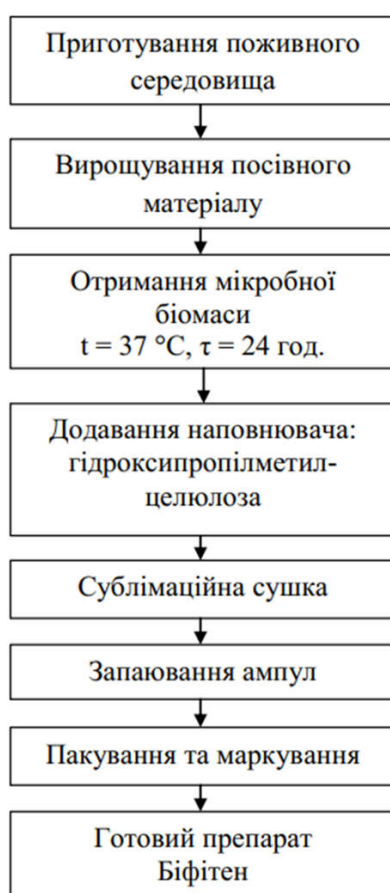


Рис. 21. Традиційна принципово-технологічна схема отримання пробіотику «Біфітен»

Основні етапи технологічного процесу

Підготовка посівного матеріалу та виробничий біосинтез. У процесі виробництва пробіотиків, як й інших продуктів мікробного синтезу, критичним фактором є можлива мінливість виробничих штамів мікроорганізмів унаслідок багаторазових пересівів. З урахуванням цього під час зберігання музейних і робочих культур мікроорганізмів потрібно

постійно контролювати стабільність штамів та їхню фізіологічну активність.

Підготовка інокуляту у виробництві пробіотиків передбачає кілька етапів, першим з яких є одержання робочої культури мікроорганізму з музейної. Далі здійснюють кілька послідовних пересівів робочої культури на рідких поживних середовищах. Іноді для вирощування посівного матеріалу використовують різні поживні середовища. У деяких випадках підготовка інокуляту може охоплювати до шести стадій (генерацій культури).

Виробничий біосинтез здійснюють в умовах глибинного періодичного культивування в реакторах, установлених у боксах.

Реактори зазвичай оснащують мішалкою й паровою оболонкою.

Основними факторами, що обмежують розвиток мікроорганізмів за таких умов, є вичерпання компонентів поживного середовища та накопичення токсичних продуктів метаболізму. Цьому можна запобігти, здійснюючи дробну подачу субстрату або використовуючи діалізні камери для вилучення небажаних метаболітів. Перспективним також є безперервне культивування. Проте нині такий спосіб культивування широко не застосовують у виробництві пробіотиків.

Упродовж виробничого біосинтезу періодично відбирають проби культуральної рідини для визначення кількості живих клітин (КУО/см³).

Пробіотики знаходять застосування й у ветеринарній практиці. Перелік пробіотиків, що найчастіше застосовуються для сільськогосподарських тварин: Ліобіфідус, Біфідаген, Лактомікс, Пробіоз, Галако, Лактосан тощо. Одні використовуються як лікувально-профілактичні препарати, інші – рістстимулюючі.

Завдяки **застосуванню пробіотиків у птахівництві** можна заощаджувати такі дорогі інгредієнти, як амінокислоти, ферменти та вітаміни. Пробіотики можуть покращити темпи росту курчат-бройлерів та контролювати або запобігати кишковим захворюванням, у тому числі сальмонельозу, некротичному ентериту та кокцидіозу. Існують дослідження, що показують, що пробіотики збільшують швидкість росту бройлерів краще, ніж авіламіцин та деякі ефірні олії.

Пробіотики селекційних штамів (зокрема спороутворюючі) підвищують конверсію корму, зокрема завдяки стимуляції росту ворсинок кишечника. Одним із цікавих спостережень, отриманих у ході випробувань пробіотичної годівліц свійської птиці, є те, що деякі культури мікроорганізмів сприяють росту в початковій (ранній) фазі, тоді як інші впливають на фазу заключного періоду годування. Деякі дослідження реєструють покращення росту протягом усього циклу виробництва бройлерів.

Пробіотики у свинарстві виступають насамперед як альтернатива кормовим антибіотикам. Наприклад, кормові добавки на основі *B. subtilis* та *B. licheniformis* дозволяють замінити або скоротити використання таких речовин, як неоміцин, окситетрациклін, тилозин та ін, покращити конверсію корму.

Біо Плюс 2 Б – кормовий пробіотик нового покоління для всіх видів тварин. Є мікробіологічним продуктом, в якому як активна субстанція міститься суміш бактерій *Bacillus Licheniformis*, штам *CH 200* та *Bacillus subtilis*, *штам 201*. Антибактеріальна дія препарату проявляється відносно грампозитивних та грамнегативних бактерій. Бактерії, які містяться в препараті, унаслідок витиснення із організму тварин патогенної мікрофлори слугує ефективним засобом проти колібацильозу та анаеробного клостридіозу.

Піг-протектор – засіб для збереження новонароджених поросят. Являє собою пасту на основі жиру, запаковану у пластмасовий тюбик об'ємом 80 мл (розрахований на 40 поросят). У 1 мл пасти містяться три види спор пробіотичних бактерій ($2,5 \times 10^9$ КУО), *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecium*), вітамін А (10000 ІО), вітамін С (10 мг), вітамін Е (10 мг), вітамін В12 (5 мкг), цинк (2,4 мг), мідь (0,2 мг), молочні продукти. Доза застосування – 2 мл на одне порося зразу ж після народження.

Реск'ю Кіт – водорозчинний препарат, рекомендується для випоювання молодняку птиці з метою створення добрих стартових умов та досягнення максимальної продуктивності; застосовується після лікування антибіотиками, по закінченню транспортування, а також одночасно з кокцидіостатиками типу саліноміцину, аватеку. Оскільки до складу препарату входять спори бактерій *B.Licheniformis* та *B.subtilis* (1600×10^9 КУО/кг), його не рекомендують задавати одночасно з антибіотиками. Крім того, у складі препарату містяться бетаїн, хелатні форми цинку, міді, марганцю, вітаміни В₁, В₂, В₆, В₁₂, К₃, нікотинова кислота та пантотенат кальцію. Дозування: 1 кг на 1000 л води.

Пробіолакт – пробіотичний препарат, створений працівниками науковобіотехнологічного підприємства «БТУ-Центр» (м. Ладижин Вінницької області). Це сухий порошок світло-коричневого кольору, до складу якого входять спрямовано відселекціоновані штами молочнокислих бактерій: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium*, які легко приживлюються у травному тракті тварин, сприяючи формуванню нормальної мікрофлори.

I-Сак1026 – новий пробіотик з вмістом живих культур дріжджів спеціально відібраного штаму *Saccharomyces cerevisiae* 1026 разом із середовищем її розмноження. Це єдина культура дріжджів, схвалена в ЄС та рекомендована для застосування у раціонах молочної і м'ясної худоби та телят. I-Сак містить 5×10^9 КУО/г.

Ендоспорин – пробіотик нового покоління, який являє собою суху пористу масу від жовтого до світло-коричневого кольору. Це жива культура *Bacillus subtilis* штамів 39 та 51, які не токсичні для тварин і людини.

Целобактерин є натуральним комплексом живих целюлозолітичних і молочнокислих бактерій, поєднує властивості могутнього кормового ферменту і пробіотика. Целюлозолітичні бактерії здатні розщеплювати щільні целюлозні структури, недоступні для звичайних кормових ферментів.

ТОВ «ТЕКРО» (Україна) виготовляє пробіотичну добавку **Лактіферм Л5, Л50**, який містить 5×10^{12} та 50×10^{12} , відповідно, живих молочнокислих бактерій *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 (Aberdeen, Scotland). Препарат призначено для використання в преміксах та сипких повнораціонних комбікормах в кількості від 100-400 г/т для свиней, 400 г/т – для телят, 100-500 г/т – для птиці.

Моноспорин розроблено на основі штаму «сінної палички», ізолюваного з кишечника здорової тварини. Механізм дії препарату полягає в тому, що штам, який входить до його складу продукує антибіотичну субстанцію з високим спектром антибактеріальної та протигрибкової дії.

Бацелл – ферментно-пробіотична кормова добавка виробництва ООО СХП «НИВА» для птахівництва, тваринництва, рибництва. Препарат отримано шляхом ферментації мікроорганізмів, виділена з травного тракту жуйних тварин (лось) та птиці (глухар). Містить мультиензимний комплекс, натуральний комплекс живих целюлозолітичних та молочнокислих бактерій, а також вегетативні та спорові клітини пробіотику *Bacillus Subtilis* 8130.

Препарат Бета Плюс – порошок сірого кольору. Містить у своєму складі ліофілізовані спороутворюючі бактерії *Bacillus subtilis* і *Bacillus licheniformis*, і амінокислоту бетаїн, які сприяють підвищенню ефективності годівлі, збільшенню приростів маси і поліпшенню конверсії корму під час відгодівлі.

Лактин-К – комплексний пробіотичний препарат на основі культур *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus fermentum* і *Lactobacillus salivarius*, який виготовляє ООО «Іномекс» (Україна). Застосування Лактину-К дозволяє підвищити продуктивність тварин і птиці, а також зменшити на 3-5 % витрати комбікормів.

ТЕМА 17: ТЕХНОЛОГІЧНІ СХЕМИ ТА ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БАКТЕРІАЛЬНИХ ЗАКВАСОК

Закваски – це чисті культури або суміш культур мікроорганізмів, які використовують при виробництві кисломолочних продуктів, кисломолочного масла та сиру.

Якість та біологічна цінність кисломолочних продуктів залежить від виду та складу мікрофлори препаратів, що використовують для сквашування молочної сировини. Ці заквашувальні препарати поділяються на закваски, бактеріальні концентрати, закваски прямого внесення.

Закваски сухі, рідкі, одно- або багатокомпонентні. Бактеріальні (бактерійні) концентрати містять велику кількість життєздатних клітин.

Бактеріальні препарати прямого внесення призначені для безпосереднього внесення у молоко.

Розрізняють закваски одноштамові складаються з одного штаму певного виду мікроорганізмів, багатоштамові одновидові (з кількох штамів мікроорганізмів одного виду) та багатоштамові різновидові, до складу яких входять багато штамів різних видів бактерій.

За складом мікрофлори закваски поділяються на: *бактеріальні, грибкові та змішані*.

За фізичним станом поділяються на: *рідкі, сухі (ліофілізовисушені) та заморожені*.

Закваски, отримані у спеціальних лабораторіях, називаються **маточними, або лабораторними**.

Рідкі закваски – чисті культури молочнокислих бактерій, вирощених на стерильному молоці. Перевага: активний стан мікрофлори і їхня чистота. Недолік: короткий термін зберігання (не більше 2-х тижнів за температури $4\pm 2^{\circ}\text{C}$) та використовують на заводах, що розташовані недалеко від лабораторії.

Рідкі закваски готують на стерильному знежиреному молоці або цільному. Технологічний процес приготування рідких заквасок проводять в наступній послідовності (рис. 22). 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.



Рис. 22. Схема виготовлення рідкої закваски

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.

Сухі закваски – це чисті молочнокислі бактерії, які після сквашування піддали зневодненню.

Виготовлення (рис. 23): 30% рідкої закваски вносять у захисне середовище – водний розчин, що містить сахарозу, цитрат натрію і желатозу, перемішують, фасують у флакони по 1см³, заморожують та висушують шляхом сублімації (видалення вологи з клітин у замороженому стані при високому вакуумі за температури – 15-17°C) та досушують за температури 40°C упродовж 5 год. Термін зберігання не більше 4-х місяців.

Кількість молочнокислих бактерій у сухих заквасках становить 10⁸ КУО/г. Сухі або ліофільні закваски порошкоподібні або мають вигляд таблеток білого чи кремового кольору.

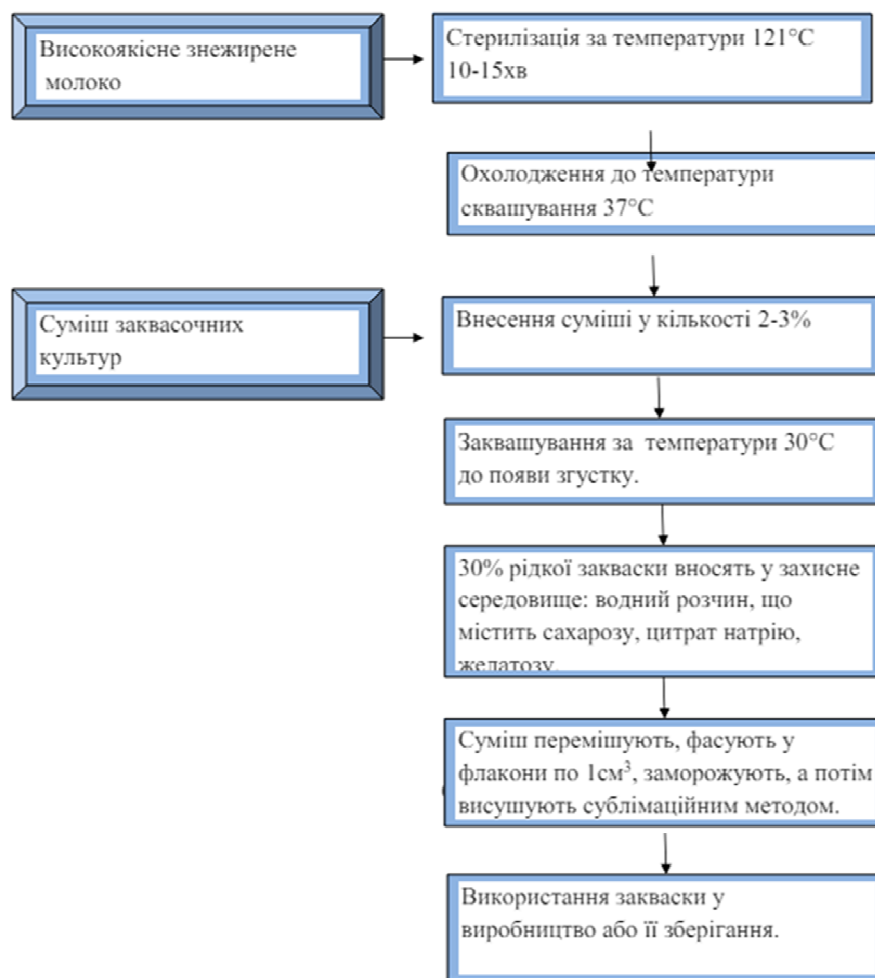


Рис. 23. Схема виготовлення сухої закваски

Сухі закваски готують на основі бактеріальної маси в захисному середовищі розведенням сухого бактеріального концентрату наповнювачем і висушуванням комбінації культур в захисному середовищі.

Сухі закваски, приготовані на основі бактеріальної маси за складом мікрофлори ідентичні сухому бактеріальному концентрату і відрізняються від нього лише за кількістю клітин молочнокислих бактерій. Вони містять приблизно в 100 разів менше бактеріальних клітин, ніж бактеріальний концентрат, через більшу розведення бактеріальної маси захисної середовищем.

Знежирене молоко стерилізують, витримують у термостаті для перевірки його на стерильність, після чого контролюють мікрокопіюванням забарвлених препаратів. Потім у молоко вносять комбінацію культур в кількості 0,5-1,0% і витримують при оптимальній температурі до утворення згустку.

Вирощену комбінацію культур в кількості 30% вносять в захисне середовище – водний розчин, що містить сахарозу (10%), трьохзаміщений

лимоннокислий натрій (5%), глутамат натрію (2,5%) і желатинозу (5%); суміш добре перемішують, фасують порціями по 1 мл у флакони, заморожують і висушують при сублімаційного сушіння.

Режим заморожування і сушіння заквасок аналогічний режимам отримання сухого бактеріального концентрату. Зберігати суху закваску можна не більше 4 міс при температурі 3-8°C з дня вироблення, зокрема 1 міс на підприємстві виготовлювача.

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

Бактеріальні (бактерійні) концентрати – мають велику кількість клітин, більш активні, тому використовують у меншій кількості.

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 сірчано-кислий марганець, аскорбінова кислота, аміак.

У живильному середовищі, приготовленому на сироватці, міститься зайва кількість лактози, яка пригнічує ріст молочнокислих бактерій. Для усунення інгібуючої дії в живильне середовище додають певну кількість води.

Молочнокислі бактерії розрізняються за потреби до тих чи інших буферних солей і стимуляторів росту, у зв'язку з цим запропоновані різні поживні середовища для нарощування клітин мезофільних молочнокислих стрептококів, термофільних молочнокислих стрептококів і ацидофільних молочнокислих паличок.

Відбір і підготовку молока проводить аналогічно цими операціями при періодичному способі приготування закваски.

Перед початком роботи всю лінію піддають ретельній циркуляційній мийці і дезінфекції. Цільне або знежирене молоко стерилізують в потоці при температурі 135°C з витримкою 7-8 с.

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.

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, нежний, слабо виражений запах. Консистенція закваски однорідна, без виділення сироватки.

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

Приготування виробничої закваски на чистих культурах (рис. 24) і кефірної закваски (грибкової та виробничої) проводять у двох ізольованих приміщеннях заквасочного відділення. На невеликих підприємствах (до 25 т переробки молока за зміну) допускається приготування заквасок на чистих культурах і кефірної в одному приміщенні.

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

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

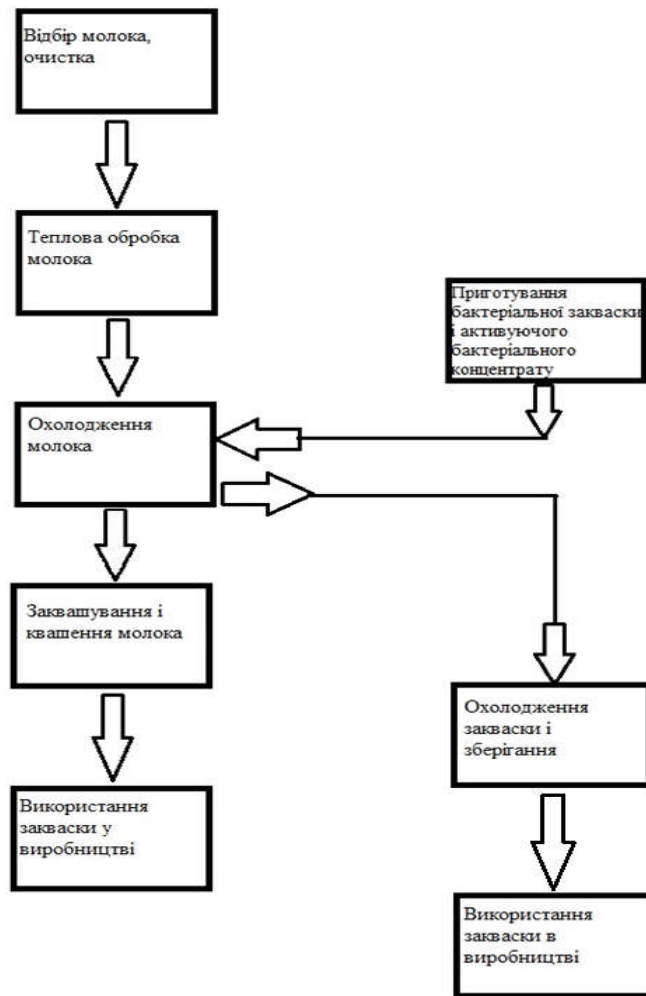


Рис. 24. Отримання виробничої закваски на чистих культурах

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

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

Приготування закваски на чистих культурах на пастеризованому молоці, культивування кефірних грибків (приготування грибкової закваски) і приготування виробничої кефірної закваски проводять у спеціальних заквасочниках (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 закільцьованих з нею трубопроводів і насосів час циркуляції миючого розчину збільшують до 45-50 хв, кислоти – до 45-60 хв.

Санітарну обробку окремих вузлів (пастеризатора, охолоджувача, молокопроводу) проводять після пастеризації молока, після охолодження молока й закваски; обробку всієї системи – після закінчення роботи і перед початком роботи. При виконанні всіх операцій приготування закваски суворо дотримуються чистоти. Особливу увагу слід звертати на дотримання правил особистої гігієни працюючих в цеху.

Питання для самоконтролю:

1. Яким чином здійснюється приготування виробничої закваски?
2. Охарактеризувати технологічний процес виробництва сухих заквасок?
3. Надати загальну характеристику рідким закваскам.
4. Які речовини служать середовищем для нарізання молочнокислих бактерій?
5. Технологія отримання виробничої закваски на чистих культурах.

ТЕМА 18: ВИРОБНИЦТВО ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ

При вивченні біотехнологій органічних кислот слід розрізняти леткі та нелеткі кислоти. Стосовно деяких кислот цей поділ носить дещо умовний характер. Так, наприклад, молочна кислота, яка широко застосовується в народному господарстві, і має дуже важливе значення для медицини певною мірою летка, але її завжди відносять до фракції нелетких кислот. Молочна кислота утворюється в процесі зброджування вуглеводнів, і кількість останніх визначає швидкість її утворення.

Оцтова кислота має найбільше народногосподарське значення серед летких кислот. Оцет використовують як приправу до різних блюд, а також для виготовлення маринадів, гірчиці, соусів та ін.

Біосинтетична пропіонова кислота, яка широко застосовується в харчовій та фармацевтичній промисловості в якості консерванта, утворюється в результаті пропіоновокислого зброджування середовищ, що містять глюкозу, пропіоновокислими бактеріями *P. acnes*, *P. freudenreichii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici*, *P. granulosum*.

Кінцеві продукти ферментації (пропіонат і ацетат) можна не відокремлювати, постільки обидві кислоти мають консервуючі властивості.

Молочна і пропіонова кислоти утворюються в анаеробних умовах, в той час як деякі інші органічні кислоти, такі як лимонна, глюконова та ітаконова і деякі інші утворюються в результаті окислювального (аеробного) процесу.

Маслянокисле бродіння викликають представники роду *Clostridium*. Воно відбувається в ґрунті, водоймах, силосних ямах.

В промисловості маслянокисле бродіння використовується для отримання масляної кислоти, а також зустрічається як побічне небажане явище.

Близьким за хімізмом варіантом маслянокислого зброджування являється ацетонобутилове бродіння. Маслянокислі і ацетонобутилові бактерії дуже схожі за морфолого-фізіологічними властивостями.

При ацетонобутиловому бродінні із попередників масляної кислоти утворюється ацетон і бутанол.

Цей вид бродіння викликається *Clostridium aurolyticum*. Співвідношення продуктів маслянокислого і ацетонобутилового бродіння залежить не лише від видової приналежності мікроорганізмів, а і від умов, за яких воно відбувається (кислотності середовища, характеру джерела вуглецевого живлення та ін.).

Серед органічних кислот найважливіша – **оцтова**. На ринок США її щорічно надходить близько 1,4 млн. т. загальною вартістю до 500 млн. дол. У

минулому основну частину оцтової кислоти одержували шляхом мікробіологічного окислювання етанолу, але сьогодні, за винятком виробництва оцту, цей процес по економічних міркуваннях не застосовується.

Світове виробництво оцтової кислоти складає близько 8,8 млн т. В основному вона виробляється синтетично: карбонуванням метанолу (більше 60%) і окисленням ацетальдегіду або етилену.

Важливою областю застосування оцтової кислоти є харчова промисловість, потреба якої задовольняється ферментативно одержуваною оцтовою кислотою – **оцтом**.

Біохімічний оцет – продукт життєдіяльності оцтовокислих бактерій. Розрізняють спиртовий (білий), яблучний (сидровий) та винний оцти.

Спиртовий оцет виготовляють на основі суміші води й етанолу з додаванням у середовище солей фосфору, азоту, калію та біологічних стимуляторів (витяжки солодових паростків, дріжджової витяжки тощо).

Яблучний натуральний оцет одержують на основі збродженого яблучного соку.

Органолептичні показники і поживна цінність яблучного оцту набагато вища, ніж спиртового. Винний оцет має найкращі смакові якості; його випускають на основі сухих виноградних вин.

Крім того, оцет одержують з ячмінного сусла (сусловий) (рис. 25), збродженої сироватки (сироватковий), зброджених цукрових розчинів (цукровий), зброджених глюкозних розчинів (глюкозний), збродженого оцукрованого рисового крохмалю (рисовий).

Оцет являє собою розведений водний розчин оцтової кислоти. Його виробляють шляхом оцтовокислого бродіння спиртовмісних рідин.

Оцтову кислоту можна отримувати двома способами: хімічним – із продуктів сухої перегонки деревини та мікробіологічним – в результаті оцтового збродження спиртовмісних рідин, таких, як: виноградне вино, сидр, пивне сусло, зброджений мед та соки різних фруктів або водний розчин етилового спирту (C_2H_5OH).

В таких рідинах окислення етанолу до оцтової кислоти в більшості випадків здійснюють оцтовокислі бактерії *Acetobacter aceti*. Реакція окислення виглядає наступним чином:



В результаті неповного аеробного окислення в готовому продукті опиняється не лише оцтова кислота, але і невелика кількість складних ефірів, альдегідів та інших органічних сполук.

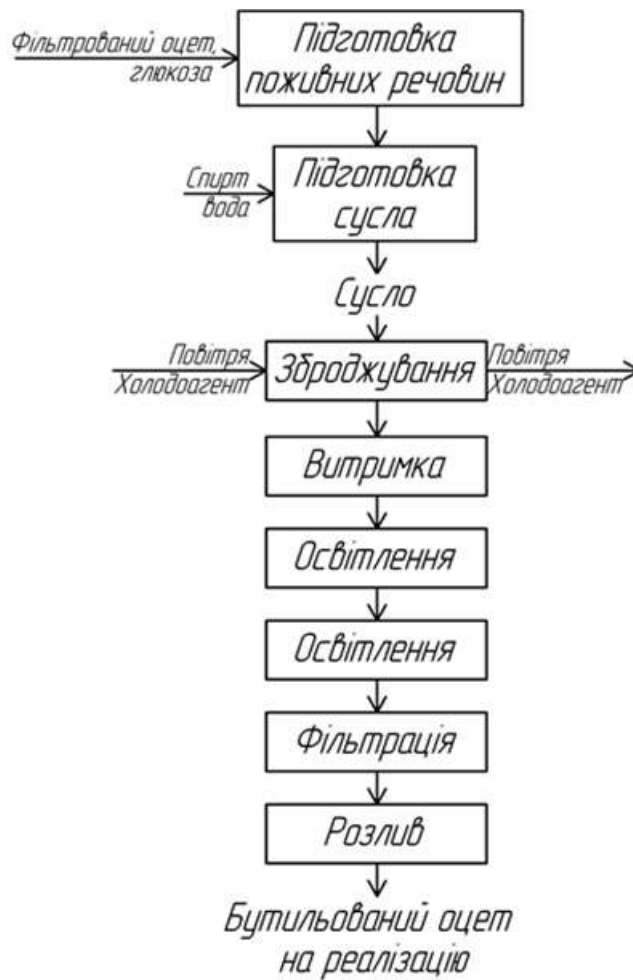


Рис. 25. Загальна схема виробництва оцту

Технологічна схема виробництва харчового оцту складається із наступних стадій:

- **Розведення чистої культури оцтовокислих бактерій (ОКБ) на живильному середовищі Лойцяньської або середовищі Геннеберга:** спочатку культуру оцтовокислих бактерій вирощують в пробірках з агаризованим середовищем Лойцяньської, а через 3-4 діб здійснюють серію послідовних пересівань оцтовокислих бактерій на свіжі середовища живлення, поступово збільшуючи кількість інокульованих пробірок з культурою оцтовокислих бактерій вдвічі. Отримавши необхідну кількість пробірок, плівку бактерій із поверхні агаризованого середовища пересівають на рідке середовище Лойцяньської, розлите в колби Ерленмейера ємністю 800 см³ по 250 см³. Інокуляцію проводять із розрахунку 10 пробірок на 1 колбу. В кожену колбу з рідким поживним середовищем одразу ж після інокуляції додають по 5 см³ етилового спирту 96 %-ної концентрації.

Найкращою сировиною для оцтовокислого бродіння являється *етиловий спирт*, отриманий із зерно-картопляної сировини. Може використовуватися як ректифікат, так і спирт-сирець. Але при підвищеному вмісті в спирті

сивушних олій виробничий процес порушується.

Інокульовані колби поміщають у термостат, що має температуру ($30 \pm 1^\circ\text{C}$). Через одну-дві доби на поверхні поживного середовища з'являється тонка плівка, що містить культуру оцтовокислих бактерій.

Визначення кислотності культуральної рідини в колбах проводять титриметричним методом. Після досягнення 1 %-ної кислотності інокулят в колбах передають на наступну стадію технологічного процесу.

- Вирощування культури оцтовокислих бактерій в апаратах-культиваторах ємністю 30 дм³, що містять по 7 дм³ живильного середовища.

Середовище в апаратах (середовище №1) містить (в перерахунку на 1 дм³ середовища): спирту етилового 96%-ного – 1,4 %, оцтової кислоти 80 %-ної концентрації – 2%, амонію фосфорнокислого однозаміщеного – 0,9 г, калію фосфорнокислого однозаміщеного – 0,35 г, магнію сірчанокислого – 0,35 г.

Інокуляцію стерильного середовища культурою оцтовокислих бактерій здійснюють: 100 см³ інокуляту із колб на 1 дм³ живильного середовища. В апаратах постійно підтримується стабільний температурний режим в межах ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) та здійснюється постійна подача стерильного повітря із розрахунку 0,40-0,35 дм³ повітря на 1 дм³ поживиноного середовища за 1 хв.

Вирощування оцтовокислих бактерій в апараті здійснюється при постійному перемішуванні культуральної рідини мішалкою. Після досягнення культурою оцтовокислих бактерій експоненціальної стадії росту поживне середовище в апараті закаламучується, концентрація оцтової кислоти в середовищі збільшується до 4,0-4,2%. Починаючи з цього часу, в середовище живлення необхідно здійснювати дозовану подачу живильного середовища, що містить близько 7,2-8,0% суміші спирту та кислоти для того, щоб концентрація оцтової кислоти в культуральній рідині залишалася постійною. Середовище (№2), яке додають до культуральної рідини в процесі вирощування, має наступний склад (на 1 дм³ середовища):

- спирт етиловий 96% – 100 см³;
- оцтова кислота 80 % – 175 см³;
- KH_2PO_4 – 3,5 г;
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 7 г;
- MgSO_4 – 3,5 г.

Після повного заповнення культиватора поживним середовищем культуральну рідину передають до апарату ємністю 1,5 м³.

- Вирощування культури оцтовокислих бактерій в апараті ємністю 1,5 м³.

Склад поживного середовища в апараті ємністю 1,5 м³ відповідає складу середовища в культиваторі. Коефіцієнт заповнення апарату поживним середовищем – 0,55.

Інокуляцію середовища живлення в апараті проводять повним об'ємом культуральної рідини з одного культиватора (за винятком 7 дм³, які залишають в культиваторі для проведення наступного циклу інокуляції за описаною вище схемою).

Вирощування культури оцтовокислих бактерій в апараті ємністю 1,5 м³ проводять таким же самим чином, як і в апараті ємністю 30 дм³. Але на цій стадії технологічного процесу масова частка оцтової кислоти в апараті повинна постійно підтримуватися, починаючи з експоненціальної стадії росту, на рівні 4%.

- Вирощування культури оцтовокислих бактерій в батареї з апаратів ємністю 9 м³.

В робочих ферментерах ємністю 9 м³ готують по 3,5 м³ середовища живлення №1. Середовища живлення у всіх ферментерах батареї інокують оцтовокислими бактеріями, вирощеними в апаратах ємністю 1,5 м³.

В період засіву всі ферментери батареї функціонують обособлено. Вирощування оцтовокислих бактерій в ферментерах проводять таким же самим чином як і в культиваторах, та в апаратах ємністю 1,5 м³.

Після того, як ємність культуральної рідини в першому ферментері з батареї досягне 6 м³, а концентрація оцтової кислоти 4,2-5,0%, частину культуральної рідини з апарату передають до наступного за ним ферментера, а з нього – до третього, та за ланцюгом, до останнього апарату в батареї.

Таким чином, перший апарат батареї являється генератором оцтовокислих бактерій і безперервно постачає всі апарати в батареї активною культурою.

Технологічний процес проводять таким чином, щоб вміст оцтової кислоти в останньому з батареї апараті становив 9,0% або вище, а вміст етилового спирту 0,1-0,3%. Максимальна швидкість потоку культуральної рідини між ферментерами батареї не повинна перевищувати 500 дм³ за годину.

В процесі оцтовокислого бродіння температура культуральної рідини від ферментера до ферментера знижується від 28°C до 25°C. Зменшується також і аерація з 0,35-0,4 м³ повітря на 1 м³ середовища на хвилину до 0,1-0,15 м³/м³хв в останньому апараті.

Для підтримання в 2-4 апаратах батареї необхідної концентрації спирту в них подають поживне середовище з 40%-ним етанолом.

З останнього в батареї апарату проводять відбір оцту з концентрацією

оцтової кислоти не нижче 9,0% і не вище 9,2-9,3%.

Як уже зазначалося вище, в процесі виробництва оцту єдиними супутниками оцтовокислих бактерій являються вугриці та незначна кількість молочних паличок. Позбавитися від присутності цих нематод а також, одночасно, від завислих часток та довести оцет до необхідної концентрації дозволяють технологічні операції висолювання та пастеризації. Вибір процедури при проведенні технологічного обробітку оцту обумовлюється умовами конкретного виробництва.

При *висолюванні* до оцту додають 1-2% харчової солі. Сіль попередньо розчиняють в невеликій кількості води або оцту. Концентрований розчин солі змішують з оцтом в купажній ємності. Суміш витримують протягом одної-двох діб до повного осідання завислих часток та загибелі вугриць.

Альтернативним до методу висолювання являється *пастеризація оцту* при 85-90°C з наступним освітленням за допомогою бентонітових глин з невеликою кількістю лимонної кислоти.

Із бентонітових глин готують 2% водну суспензію, яку змішують з попередньо освітленим оцтом. Освітлення оцту проводять змішуванням 1000 дм³ оцту з 2,5 кг повітряно-сухого бентоніту. Суміш оцту з бентонітом ретельно перемішують протягом 30-40 хв. При утворенні великої кількості завислих пластів вугриць суміш залишають для освітлення на 10-12 год, попередньо провівши визначення кислотності.

Одночасно з висолюванням або після пастеризації проводять *купажування оцту* – тобто доводять його кислотність до необхідного рівня, передбаченого вимогами регламенту виробництва. Купажування оцту здійснюється шляхом його розведення водопроводною водою (при високій концентрації оцтової кислоти) або шляхом укріплення оцту харчовою оцтовою кислотою більш високої концентрації (при низькій концентрації оцтової кислоти).

Стандартизований оцет фільтрують через бентонітові глини або через інші фільтри. Готовий оцет розливають у пляшки, маркують та передають на реалізацію споживачу.

Молочна кислота – це одноосновна кислота. В кристалічному вигляді ця кислота може бути отримана при обережному випарюванні водного розчину молочної кислоти. Водні розчини молочної кислоти являються врівноваженою системою, яка складається з молочної кислоти та її ангідридів; чим більша концентрація водного розчину, тим більше в ньому ангідридів молочної кислоти.

Свіже молоко швидко заселяється бактеріями, що діють на молочний цукор – лактозу; бактерії забезпечують себе енергією, розщеплюючи лактозу

та виділяючи молочну кислоту.

Потім, під впливом кислоти краплі жиру в молоці коалесцирують і молоко звертається. Під час приготування йогурту процес прискорюють та регулюють, додаючи до молока змішану культуру бактерій *Lactobacillus bulgaricus* та *Streptococcus thermophilus*, які утворюють молочну кислоту.

Штами *Lactobacillus*, за винятком *Lactobacillus casei*, синтезують, в основному, D(–) – молочну кислоту або суміш ізомерів. Термофільні штами *Streptococcus* синтезують винятково L(+) – молочну кислоту.

Для зброджування сульфітних щолоків використовуються молочнокислі бактерії виду *L. plantarum*. Вони зброджують гідролізати, які містять пентози (ксилозу, арабінозу) приблизно з однаковим виходом молочної та оцтової кислот. Сировиною для виробництва молочної кислоти слугує товарний цукор, картопляний та кукурудзяний крохмаль, меляса, рафінадна та кукурудзяна крохмальна патока, молочна сироватка, зернові культури, гідролізати деревини, сульфітні щолоки.

Найбільш доступною є крохмалевмісна сировина (патока, злакові культури). Технологія переробки цих субстратів в молочну кислоту була розроблена В.М. Шапошніковим та А.Я. Мантейфель. Вона базується на зброджуванні середовищ термофільними молочнокислими бактеріями виду *Lactobacterium cereale*.

Бродіння молочної кислоти здійснюють бактерії *Lactobacterium bulgaricum*, *Streptococcus lactis*.

Одним із видів сировини у виробництві молочної кислоти являються гідролізати деревини та сульфітні щолоки.

Їх зброджують сумішню декількох штамів гомо- та гетероферментативних бактерій. При такому зброджуванні отримують суміш молочної, оцтової та інших кислот. Молочну кислоту із цієї суміші виділяють відгоном.

Підготовка поживного середовища із меляси та цукрової патоки заключається у наступному: спочатку їх освітлюють та розводять водою до 10:12 %-ної концентрації, а потім інвертують за допомогою сірчаної або хлористоводневої кислоти. В це середовище вводять необхідні для живлення бактерій сполуки фосфору у вигляді суперфосфату або інші поживні речовини у вигляді водного екстракту солодових зародків. Після нейтралізації середовища до рН 6,5 та введення 2% крейди (по відношенню до цукру), його стерилізують, а потім зброджують.

При використанні крохмалевмісної сировини здійснюють оцукрювання крохмалю кислотою, ферментами солоду або пліснявих грибів.

В якості джерела азотного живлення в середовище вводять муку із

насіння бобових рослин (горох, квасоля, соя та ін.) або водний екстракт із солодових зародків.

Оцукрене середовище направляють на бродіння. Під час ферментації до поживного середовища декілька разів на добу (3-4 рази) додають крейду (з метою підтримки стабільного рівня рН в межах 6,3-6,5).

Мікробіологічне виробництво молочної кислоти проводять за наступною схемою:

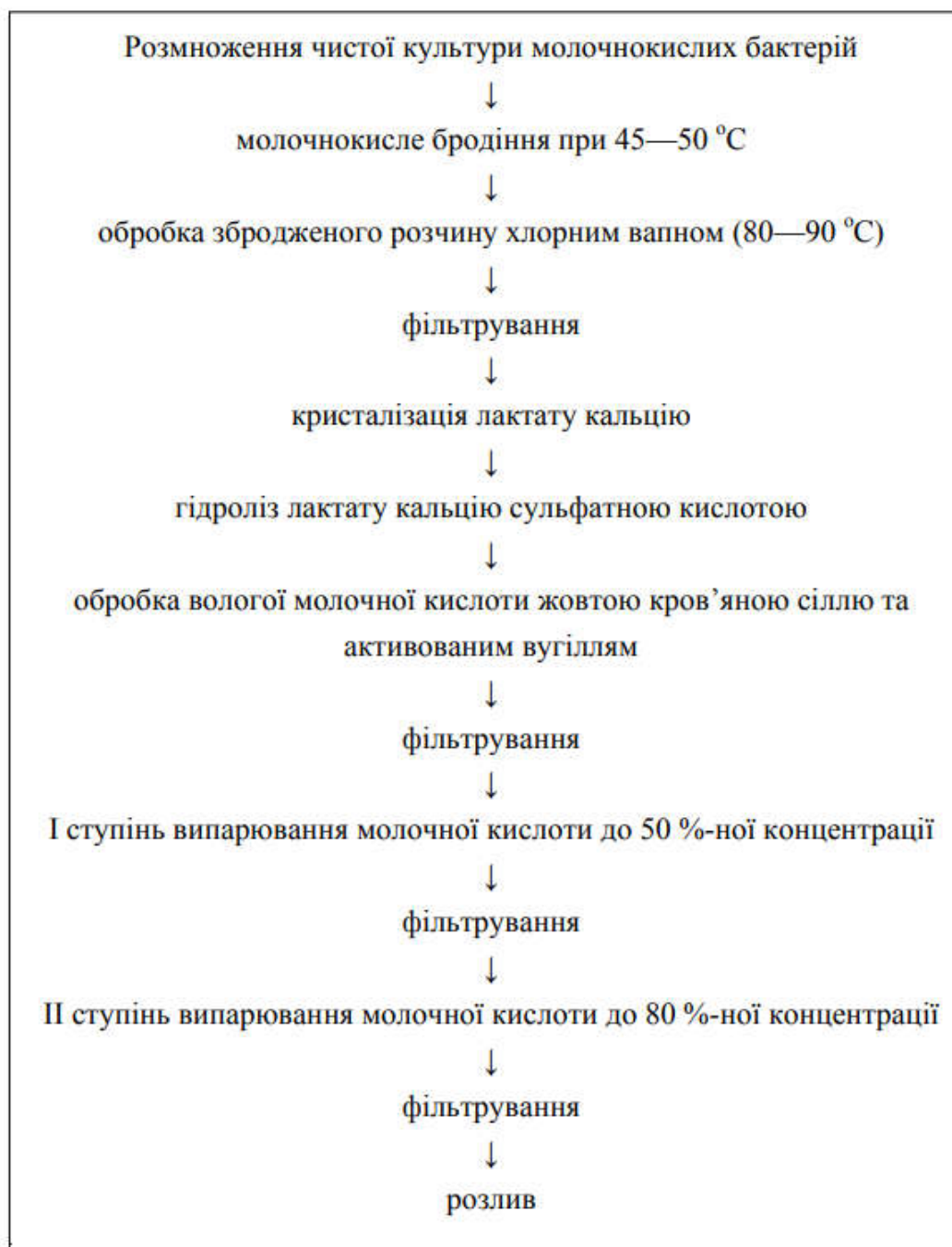


Рис. 26. Схема мікробіологічного виробництва молочної кислоти

Молочнокисле зброджування проводять при постійній температурі у межах 49-50°C. Зниження температури до 46-48°C викликає різке послаблення біохімічної активності культури бактерій та сприяє розвитку сторонньої мікрофлори. Підвищення температури до 53-55°C також викликає інактивацію культури та уповільнення бродіння.

Позитивний вплив на молочнокисле бродіння мають високоактивні речовини. З цією метою до поживного середовища додають екстракт зародків солоду. При нормальному бродінні за добу бактеріями зброджується близько 1-1,5% цукрів, а весь цикл бродіння закінчується за 7-11 діб.

Значна роль в технології виробництва молочної кислоти відводиться обробці збродженого розчину та фільтруванню. Для відокремлення крейди та колоїдів зброджений розчин нагрівають до 80-90°C, а потім змішують з хлорним вапном до слабколужної реакції. Суміш витримують протягом 3-5 год для відстоювання. Для вилучення грубої зависі та твердих часток шар відстою з розчином лактату кальцію декантують.

Розщеплення лактату кальцію здійснюють після його центрифугування. Для запобігання обвуглюванню лактату сірчаною кислотою процедуру розщеплення лактату кальцію з метою виділення вільної молочної кислоти проводять при температурі 60-70°C.

Для відокремлення іонів заліза отриману вологу молочну кислоту при температурі 60-70°C оброблюють жовтою кров'яною сіллю. При цьому в осад випадає берлінська синь.

Знебарвлення молочної кислоти здійснюється методом адсорбції за допомогою активованого вугілля. Упарювання продукту відбувається на вакуум-апаратах при тиску 10-15 кПа та залишковому тиску пари 0,2 МПа.

Питання для самоконтролю:

1. Вказати методи отримання оцтової кислоти.
2. Описати загальну характеристику молочної кислоти.
3. Вказати промислові способи синтезу оцтової кислоти. Охарактеризуйте основні хімічні та фізичні властивості молочної кислоти.
4. Яка роль молочної кислоти в процесах сквашування, маринування, силосування, в інших процесах?
5. Які штами молочнокислих бактерій застосовуються у промисловому виробництві молочної кислоти?
6. Дайте характеристику основних компонентів живильних середовищ із крохмалевмісної сировини для біосинтезу молочної кислоти.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Біотехнології харчових продуктів : курс лекцій / Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника. Івано-Франківськ, Супрун В.П., 2020. 310 с.
2. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. Біотехнологія в агросфері : навч. посіб. Київ : НУБІП, 2014. 247 с. URL: https://nubip.edu.ua/sites/default/files/biotehnologiya_v_agrosferi.pdf
3. Бондар І. В., Гуляєв В. М. Промислова мікробіологія. Харчова агробіотехнологія. Дніпропетровськ : В-во ДДТУ. 2004. 280 с. URL: <https://www.dstu.dp.ua/Portal/Data/5/8/2-8-b4.pdf>
4. 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.
5. Головка А. М., Рубленко І. О. Ветеринарна санітарна мікробіологія : навчальний посібник. Київ : Аграрна освіта. 2010. 284 с.
6. Екологічна біотехнологія. У 2 кн. : навч. посіб. Кн. 1 / О. В. Швед, та ін. Львів : Львівська політехніка, 2018. 424 с.
7. Пляцук Л. Д., Черниш Є. Ю. Екологічна біотехнологія: принципи створення біотехнологічних виробництв : навчальний посібник. Суми : Сумський державний університет, 2018. 293 с. URL: <https://essuir.sumdu.edu.ua/server/api/core/bitstreams/437c13b2-9209-4d83-b221-05099345e3a5/content>
8. Каленська В. С. Мистецтво перетворень у світі вірусів та бактерій : наук. допом. бібліогр. покажч. Київ : НУХТ. 2021. 126 с.
9. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л., Бородай В. В., Коломієць Ю. В. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник. Київ : ФОП Корзун, 2014. 252 с. URL: https://document.kdu.edu.ua/info_zab/162_481.pdf
10. 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. 113 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/22000>
11. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія : підручник. Київ : НУХТ. 2009. 336 с.
12. Пирог Т. П., Пенчук Ю. М. Біохімічні основи мікробного синтезу : підручник. Київ : НУХТ. 2020. 258 с.
13. Поліщук Ю. В. Технологія продуктів мікробного синтезу : навчальний посібник. Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського. 2022. 26 с.

14. Пробиотики і пребіотики. Глобальні практичні рекомендації Всесвітньої Гастроентерологічної Організації. Київ : Diagen. 2021. 43 с. URL: https://diagen.com.ua/wp-content/uploads/2022/04/probiotiki_compressed.pdf
15. Промислова біотехнологія : курс лекцій для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія» спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої освіти / уклад. О. І. Юлевич. Миколаїв : МНАУ, 2024. 159 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/17401>
16. Курта С. А. Примислові біртехнології : курс лекцій / Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника. Івано-Франківськ, Супрун В.П., 2018. 197 с.
17. Старовойтова С. О., Скроцька О. І., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П. Технологія пробіотиків : підручник. Київ : НУХТ, 2012. 318 с.
18. 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.
19. Трохимчук І., Плюта Н., Логвиненко І., Сачук Р. Біотехнологія з основами екології : навчальний посібник. Київ : Кондор, 2019. 304 с.
20. Українець А. І., Богорош О. Т., Поводзинський В. М. Проектування типового і спеціального устаткування мікробіологічної, 112 фармацевтичної та харчової промисловості : навч. посібник. Київ : НУХТ, 2007. 148 с.
21. Юлевич О. І., Луговий С. І., Каратєєва О. І., Баркарь Є. В. Біотехнології та біоінженерія. Вступ до фаху : навчальний посібник. Миколаїв : МНАУ, 2022. 285 с.
<https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/11705>

Навчальне видання

**МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ВИРОБНИЦТВО КОРМІВ ТА
КОРМОВИХ ДОБАВОК**

Методичні рекомендації

Укладачі:

КАРАТЄЄВА Олена Іванівна

ЛЮТА Ірина Миколаївна

Формат 60×84.1/16. Ум. друк. арк. 7,4

Тираж ___ прим. Зам № _____

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

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