

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

**Інженерно-енергетичний факультет
Кафедра Агроінженерії**

ПРОЦЕСИ І АПАРАТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА

**Методичні рекомендації
до виконання практичних робіт для здобувачів ступеня вищої освіти
«Бакалавр» напрямку 6.051401 «Біотехнологія» денної форми навчання**

МИКОЛАЇВ

2016

УДК 631.3

ББК 40.7

П54

Друкується за рішенням науково-методичної комісії інженерно-енергетичного факультету Миколаївського національного аграрного університету від 24. 11. 2016 р., протокол № 3.

Укладачі:

А. С. Пастушенко – канд. техн. наук, старший викладач кафедри агроінженерії, Миколаївського національного аграрного університету.

Н. С. Храмов – асистент кафедри агроінженерії, Миколаївського національного аграрного університету.

О. І. Норинський – асистент кафедри агроінженерії, Миколаївського національного аграрного університету.

Рецензенти:

М.І. Гиль – д-р. с.-г. наук, професор кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології, Миколаївського національного аграрного університету.

©Миколаївський національний аграрний
університет, 2016

ЗМІСТ

Практична робота №1	4стр.
Практична робота №2	8 стр.
Практична робота №3	14 стр.
Практична робота №4	20 стр.
Практична робота №5	28 стр.
Практична робота №6	32 стр.
Практична робота №7	37 стр.
ЛІТЕРАТУРА	48 стр.

Практична робота №1

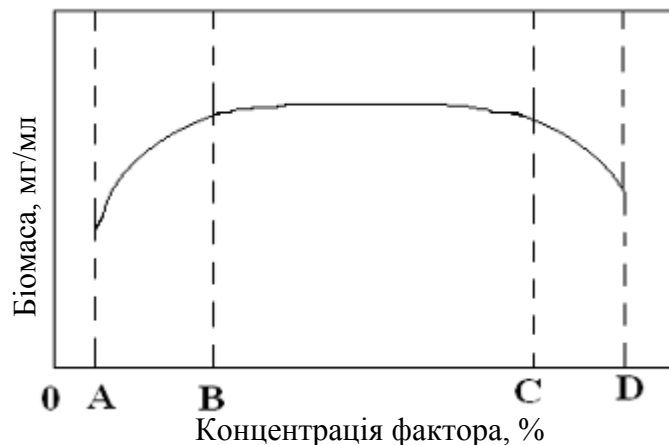
Тема: Оптимізація складу живильних середовищ для культивування промислових штамів – продуцентів біологічно активних речовин.

Мета: Оптимізація якісного і кількісного складу середовища для зростання дріжджів роду *Saccharomyces*.

Оптимізація біологічного процесу зводиться до експериментального визначення умов, за яких вихід процесу (накопичення біомаси або якогось продукту життєдіяльності) досягає максимального значення. Умови протікання процесу визначаються комплексом чинників, від яких залежить його вихід.

При оптимізації процесу культивування мікроорганізму покращують склад живильного середовища і умови культивування мікроорганізмів: температуру, рН, перемішування, освітлення, аерацію та ін.

Оптимізацію можна проводити за усією сукупністю чинників, що впливають на вихід процесу за допомогою математичного планування експерименту. Це достатньо трудомістке дослідження. На практиці часто доводиться стикатися з більш вузьким завданням підбору оптимального складу середовищ за заданих умов культивування, тобто при постійному рівні решти чинників. З фізіологічних відомостей можна вивести загальну форму залежності врожаю культури від концентрацій кожного окремого компонента середовища. Вид цієї залежності надано на рисунку.



Відрізок АВ відповідає області концентрацій, що лімітують урожай культури («лімітуюча область»); відрізок ВС – області, в межах якої зміна концентрації даного компонента не викликає помітної зміни урожаю («стаціонарна область»); відрізок CD – області, в якій зростання культури пригнічується надмірною концентрацією компонента («інгібіруюча область»). Для різних компонентів загальний вид залежності буде зберігатися, але набуває індивідуальних особливостей, що виражаються в різному нахилі і кривизні ділянок АВ і CD, протяжності ділянки ВС. Розглянутий вид залежності визначає вплив одного чинника на врожай культури. Проте при складанні середовищ, що є сукупністю багатьох компонентів, потрібно враховувати ефект їх сумісного впливу на величину урожаю. Вибір критерію оптимізації визначається конкретними вимогами завдання. Величина критерію оптимізації, тобто «вихід процесу» може бути виражений різними одиницями (оптичною щільністю суспензії, числом клітин, сухою масою і т.д.). В усякому разі, критерій оптимізації повинен бути безперервною чисельною величиною в усьому інтервалі існування біологічної системи, виміряти яку дослідник може за допомогою наявних у його розпорядженні засобів (приладів). Важливим моментом є вибір тривалості досліджуваного процесу, оскільки вона впливає на вихід процесу. Проте, оскільки максимальна біомаса для екстенсивної культури накопичується в стаціонарну фазу, для якої характерна відсутність зміни біомаси в часі, представляється можливим заздалегідь призначити час досліду, відповідний цій фазі. Практичне вирішення даної задачі полегшується тим, що тривалість стаціонарної фази для більшості відомих культур мікроорганізмів порівняно велика.

При підборі середовища для культури, що оптимізується, необхідно вибрати найбільш відповідні форми хімічних сполук, в яких присутні, перш за все, біогенні елементи (С, N, P, S), а також макро- і мікроелементи. Особливо важко це зробити по відношенню до азоту (що використовується у вигляді NO_3 , NH_4^+ , R-NH_2 , NO_2 , N_2 і т.д.) і вуглецю (хімічна форма якого

визначає фізіологічний тип живлення мікроорганізмів, – авто – або гетеротрофія). Як відомо, багато організмів здатні використовувати велике число хімічно різнорідних джерел вуглецю та азоту, причому частина з них залучається до процесів метаболізму одночасно і незалежно один від одного. Це дає підставу іноді включати до складу середовища декілька різних сполук вуглецю.

Таким чином, першим етапом вибору оптимального складу середовища являється **якісний відбір** необхідних для даної культури хімічних форм біогенних елементів. Вирішення цієї задачі може бути значно полегшено наявністю апріорних відомостей про культуру, що вивчається. В основу складу середовища, що оптимізується, може покладатися раніше відомий для цієї культури склад середовища, до якого повинні бути додані речовини, що надають позитивний ефект на зростання культури.

Наступним етапом є **кількісна оцінка** впливу відібраних компонентів на врожай досліджуваної культури. З числа компонентів середовища виділяють тільки ті, зміна концентрацій яких найсильніше позначається на врожаї, що дозволяє провести ранжування компонентів відповідно до міри їх впливу на врожай культури.

Хлібопекарські дріжджі роду *Saccharomyces cerevisiae* являють собою біомасу дріжджових клітин, що містять багатий комплекс біологічно активних речовин та володіють ферментативною активністю, яка забезпечує інтенсивне зброджування цукрів борошна і розпушування тіста. Дріжджі багаті вітамінами (рибофлавін, ергостерин, пантотенова, нікотинова та фолієва кислоти) і тому являються цінним продуктом для вітамінізації хлібобулочних виробів. У зв'язку з цим, хлібопекарські дріжджі роду *Saccharomyces cerevisiae* було обрано об'єктом дослідження для оптимізації складу поживних середовищ для культивування промислових штамів – продуцентів біологічно активних речовин.

Дріжджі – це однадерні клітини (відносно мікроорганізмів мають великі розміри) еукаріотичної будови, відносяться до сімейства грибів

(мікроскопічні), але не мають здатності утворювати гіфи, характеризуються хемогетеротрофним типом живлення, являються факультативними анаеробами та мезофільними організмами, розмножуються брунькуванням або діленням.

Дріжджі не зброджують полісахариди (крохмаль, клітковину), тому для їх культивування треба застосовувати моносахариди або проводити попередню обробку сировини (зазвичай рослинної) амілолітичними та іншими ферментами для оцукрювання полісахаридів живильного середовища до простих моносахаридів – глюкози. Оптимальним середовищем для культивування дріжджів є **середовище Сабуро** – живильне середовище для грибів: складається з 2%-го агарового гелю, 1%-го пептону, 4%-ї мальтози, рН 6,5–7. Стерилізують дане середовище протягом 15 хв при 120°C. Для зберігання грибів застосовують «середовище зберігання», аналогічного складу, але без додавання вуглеводу.

Контрольні питання:

1. Що розуміють під поняттям «оптимізація умов культивування мікроорганізмів»?
2. «Живильне середовище» – це...?
3. Наведіть класифікацію живильних середовищ за фізичним станом, хімічним складом та призначенням.
4. За якими елементами проводиться оптимізація складу живильних середовищ під час культивування мікроорганізмів?
5. Від чого залежить вибір сировини, що використовується для приготування живильних середовищ?
6. Назвіть та коротко охарактеризуйте фази зростання мікроорганізмів при періодичному культивуванні.
7. За типом вуглецевого живлення мікроорганізми поділяються на...?
8. За відношенням до температури мікроорганізми поділяються на...?
9. За споживанням кисню мікроорганізми поділяються на...?

Практична робота №2

Тема: Асептика в біотехнологічній промисловості. Мікробіологічний контроль ефективності різних методів стерилізації.

Мета: Вивчити антибактеріальну дію фізичних, хімічних і механічних способів стерилізації.

Біотехнологічні процеси, як правило, проводять в асептичних умовах, хоча можуть бути виключення для деяких з них. Наприклад, при культивуванні окремих еукаріот (дріжджі) у негерметизованих ферментаторах (нестерильний процес) відбувається помітне зниження рН середовища, де домінуюче положення дріжджів не змінюється при потраплянні **контамінуючих** бактерій (від лат. contaminatio – забруднення, зараження) – вони не можуть скласти конкуренції основному вигляду.

Асептика (від греч. а – не, немає, sepsis – гниття) – це комплекс заходів, що спрямовано на запобігання потрапляння до середовища (об'єкта) сторонніх мікроорганізмів, включно хвороботворні. Отже, асептика в біологічній технології і, наприклад, в хірургії – це не одне і те ж поняття. У першому випадку припускають використання якого-небудь біооб'єкта (зокрема – мікроба) і повне виключення попадання інших мікроорганізмів, що є забруднювачами. У другому випадку прагнуть виключити будь-яку можливість потрапляння патогенних мікробів і мікробів-контамінатів на операційне поле або у рану.

Кожен з матеріальних потоків у біотехнологічних процесах – потенційне джерело мікробів-контамінатів. Джерелом сторонніх мікроорганізмів у біотехнологічних процесах являються сировина (компоненти живильного середовища), обладнання, вода, повітря та самі працівники.

Асептика може включати вологе прибирання приміщень, обробку їх ультрафіолетовими променями, антисептичними засобами, використання стерильних інструментів, середовищ, технологічного одягу, подачу стерильного повітря (столи з ламінарним потоком стерильного повітря в

боксових приміщеннях, надходження у ферментатор стерильного повітря через барботер – від франц. barbotage – перемішування) та ін. Отже комплекс засобів, що забезпечує асептику біотехнологічних процесів, включає: механічний, фізичний і хімічний захист біооб'єкта і місця його існування, а при необхідності – і кінцевий продукт. До механічного захисту належать: видалення механічних домішок, наприклад, з повітря, культиваторів, герметизація устаткування, ізоляція вузлів і з'єднань; до фізичної – обробка повітря і поверхонь приладів і апаратів ультрафіолетовими променями, кип'ятіння, стерилізація паром під тиском, обробка ультразвуком; до хімічної – обробка поверхонь хімічними антисептиками.

У виробничих умовах джерелами мікробів-контамінатів можуть бути ґрунт, вода, навколишнє повітря, люди. З ґрунту в сферу біотехнологічних процесів потрапляють спороутворюючі палички-бацили, конідії грибів, актиноміцети; ці ж мікроорганізми з пилом можуть потрапити у повітря, завдяки якому вони здатні проникнути у середовище вирощування біооб'єкта або у кінцевий продукт виробництва.

Якісний склад і розміри часток у повітряному пилу коливаються в широких межах. У виробничих приміщеннях це залежить від конструкційних особливостей будівлі, рози вітрів, географічної зони розташування міста і підприємства, наявності або відсутності потоків автомобільного та іншого транспорту, кількості безпосередньо зайнятих у технологічному процесі людей, характеру і локалізації складських приміщень і так далі.

Пил, що утворюється, та крапельки вологи у повітрі, як правило, містять на своїй поверхні шар адсорбованого повітря і більшу або меншу кількість мікроорганізмів. Газова оболонка запобігає змочуванню часток. Такі частки є дисперсною фазою аерозолі, стійкість якого залежить від розмірів (величини) часток, їх електричного заряду і поверхневої енергії.

З водою у сферу технологічного процесу можуть потрапляти грамнегативні бактерії з групи ентеробактерій, псевдомонад і деяких інших. У природних відкритих водоймищах виявляються целюлозоруйнуючі,

нітрифікуючі і денітрифікуючі бактерії, ціанобактерії, амоніфікатори, залізобактерії і багато інших. Лише вода артезіанських колодязів, глибоких свердловин і джерел відрізняється високою чистотою. Слід пам'ятати, що чим більше вода забруднена органічними речовинами, тим більше в ній міститься мікробів. З урахуванням всіх характеристик необхідно здійснювати підготовку води для використання її в біологічній технології.

Люди, зайняті в біотехнологічному виробництві, також можуть бути джерелом контамінуючої мікрофлори – грамнегативних бактерій, коків, мікоплазм, вірусів і ін. Тільки на поверхні шкіри може зосереджуватися до 10^{10} мікробних клітин. Найбільш забрудненими є руки, ступні, лікті, шия, груди, промежина, пахові області. Різноманітна і численна мікрофлора ротової порожнини: бактерійні і кокові форми, вібріони, спірили і спірохети, нокардії, дифтероїди, протозойні організми, аспорогенні дріжджі роду *Candida*, мікоплазми, віруси та ін. При розмові, кашлі, чханні мікроби у великому числі потрапляють у повітря. Встановлено, що здорова людина за одне чхання виділяє до 20000 мікробних клітин, здатних розповсюджуватися по горизонталі, в середньому, до 1,5 м. Крапельки носового слизу, слини і мокроти, підсихаючи, утворюють частинки, покриті білковою або глікопротеїновою оболонкою, що містять і мікробні клітини. У таких частинках мікроорганізми тривало зберігаються і можуть бути причиною нестерильності матеріалів (об'єктів) на яких-небудь технологічних операціях.

Джерелом мікробів-забруднювачів можуть бути деякі компоненти живильних середовищ, наприклад, кукурудзяний екстракт (фаги, дріжджі та ін.). Рослинні віруси часто виявляються в культурах калусних тканин та у культурах клітин тваринних тканин і клітин людини, так як вони являються сприятливими середовищами для контамінаційної мікрофлори.

Мікроби-контамінанти не тільки можуть подавляти розвиток і функції біооб'єкта через конкуренцію, але і дезорганізувати яку-небудь тканину – середовище вирощування; більш того, деякі з них здатні продукувати

токсичні речовини, які можуть потрапити в цільовий продукт (так само як і самі мікроби-забруднювачі).

Захист біотехнологічних процесів від мікробів-контамінантів ефективно здійснюється за допомогою різних фільтрів. Останнім часом широкого розповсюдження набула мембранна фільтрація в цілях отримання стерильних повітря і рідин (різновид холодної стерилізації). Більш того, мембрани знайшли застосування в рДНК-біотехнології, в дисперсійному та інших аналізах біомолекул. Багато термолабільних речовин стерилізують такими ж способами.

У біологічній технології, незалежно від умов проведення процесів, широко використовують стерильне повітря, що подається: у ферментатори для аеробних організмів (клітин, клітинних систем); у спеціальні приміщення у вигляді ламінарних потоків для асептичного приготування лікарських засобів, у бокси та операційні аварії, в розпилювальні сушарки для висушування деяких речовин, у шлюзи між (перед) асептичними блоками. Стерилізуюча мембранна фільтрація тут виявляється найбільш прийнятною.

Промисловий випуск мембранних фільтрів був початий з кінця 40-х років поточного сторіччя. Згідно з Р.Е. Кестінгому (1971) найбільш поширеними процесами фільтрації є звичайна фільтрація (її можна назвати макрофільтрацією), мікрофільтрація, ультрафільтрація, діаліз (зворотний осмос). Для макрофільтрації застосовують зазвичай паперові або скляні фільтри. При цьому відокремлюють частинки, розміри яких знаходяться в межах від 1 до 10^3 мкм. Для інших типів фільтрації використовують нітроцелюлозу, ацетилцелюлозні, полівінільні, поліамідні, фторвуглеводневі мембрани товщиною менше 0,1 мкм із високим ступенем пористості і з діаметром пори у межах від 10^4 до 10 мкм. У випадках мікрофільтрації відокремлюють частинки розмірами 2×10^2 –10 мкм, у випадках ультрафільтрації розміри макромолекул, що відділяються при цьому, знаходяться приблизно у межах від 0,001 до 0,02 мкм, а їх молекулярні маси відповідають 1–1000 кДа.

При діалізі через мембрани відокремлюють невеликі молекули, що співставляються за розміром з молекулами розчинника (10^{-3} мкм і менше або до 1 нм). Тут речовини розділяються унаслідок різних швидкостей дифузії через мембрану. Розчини, що підлягають стерилізації фільтруванням, повинні зберігатися перед розливом і при подальшому розливі в асептичних умовах. При цьому час між початком приготування розчину і його стерилізацією фільтруванням повинен бути якомога менше.

Будь-який фільтр, що використовується для стерилізуючої фільтрації, не винен якісно і кількісно змінювати кінцевий продукт (у тому числі й антибіотичну активність культуральних рідин після їх стерилізуючої фільтрації через батареї фарфорових свічок).

Повітря, що подається у ферментатори, повинне бути чистим і стерильним. У цих випадках ще використовують і інші матеріали, що фільтрують, якими заповнюються загальні та індивідуальні (для кожного ферментатора) фільтри, наприклад, з перхлорвінілу (у фільтрах Петрянова – ФП), скловати та ін. Профільтроване повітря стискується у компресорах, охолоджується в теплообміннику, надходить у ресивер (від англ. ресівер – ємність), що знімає пульсації повітря, з якого через бризкоуловлювач проходить загальний і індивідуальний фільтри, і лише після цього надходить через барботер в культуральну рідину.

Живильне середовище перед засівом біооб'єктом також повинно бути стерильним. У таких випадках застосовують теплову стерилізацію, піклуючись при цьому про збереження стабільності інгредієнтів середовища. У мікробній біотехнології зазвичай використовують методи періодичної і безперервної стерилізації. Першу з них здійснюють в апаратах малої ємності безпосередньо у ферментаторах глухою або гострою парою під тиском протягом 30–40 хв при температурі 134°C ($2,02650 \times 10^5$ Па) після видалення повітря з апарата при нагріві до 100°C . Потім середовище охолоджують водою через змійовик або сорочку апарата і засівають тим або іншим біооб'єктом.

Метод безперервної стерилізації заснований на тому, що концентрат живильного середовища подають насосом через систему конструкцій, що включає нагрівач, витримувач (власне стерилізатор) і теплообмінник (охолоджувач, в якому охолодження середовища відбувається до температури, оптимальної для культивування клітин).

Названі вище методи знезараження відносять до найбільш поширених, проте, враховуючи необхідність стерилізації досить широкого асортименту різних матеріалів, доводиться вдаватися і до інших способів. Цим підтверджується те положення, що універсальних методів стерилізації не існує.

Контрольні питання:

1. Що таке асептика?
2. Що таке дезінфекція?
3. Що таке антисептика?
4. Наведіть джерела інфекції під час виробництва біотехнологічного продукту?
5. Наведіть методи стерилізації поживних середовищ.
6. Наведіть методи стерилізації за принципом дії.
7. Перелічить методи стерилізації спрямовані на створення умов для відмирання мікрофлори.
8. Наведіть приклади фізичних методів стерилізації.
9. Наведіть приклади хімічних методів стерилізації.
10. Наведіть приклади механічних методів стерилізації.
11. Поясніть методику механічного фільтрування та можливості її застосування.

Практична робота №3

Тема: Отримання засівного матеріалу для поверхневого і глибинного культивування промислових мікроорганізмів.

Мета: Вивчити способи отримання засівного матеріалу в промисловості та отримати засівний матеріал промислового мікроорганізму.

Будь-який біотехнологічний процес починається з підготовки біооб'єкта. Біооб'єкт, або промисловий штам в ідеалі повинен задовольняти наступним основним вимогам:

- стабільність структурно-морфологічних ознак і фізіологічної активності при тривалих зберіганнях і експлуатації у виробництві;
- підвищені швидкості росту і біосинтезу цільового (-их) продукту (-ів) у лабораторних і виробничих умовах;
- достатньо широкий діапазон стійкості до дії несприятливих зовнішніх чинників (коливання температури, рН, аерація, перемішування, в'язкість середовища);
- помірна вимогливість до обмеженого числа джерел живлення; чим ширший набір джерел вуглецю, азоту та інших елементів може використовувати виробничий штам, тим легше його культивувати і з більшою економічною вигодою.

Насправді кожен штам має свої особливості і не за всіма показниками відповідає вимогам, що висуваються для промислових робочих штамів.

Штами промислових мікроорганізмів на біотехнологічні виробництва надходять, в основному, в ампулах або у флаконах, де вони законсервовані у вигляді чистих культур. Штами міцеліальних грибів – на скошеному агаризованому живильному середовищі в мікробіологічних пробірках (під шаром мінеральної олії або без нього). Кожна культура має паспорт з описом живильних середовищ, морфологічних, фізіологічних і інших характеристик, умов для їх підтримки, вирощування і терміну зберігання. Режим зберігання культур припускає охолодження, заморожування або зневоднення; у всіх

випадках повинен бути різко скорочений або повністю припинений клітинний обмін речовин.

Культури мікроорганізмів зберігають:

- на косому агарі при температурі мінус 1–5°C або плюс 1–5°C;
- замороженими при температурі нижче мінус 20°C (неприпустимо повторне відтавання і заморожування);
- ліофілізованими в ампулах, що зберігаються протягом декількох років.

Більшість культур клітин ссавців, у тому числі і клітин людини, вдається зберігати невизначено довгий час замороженими в спеціальному середовищі при температурі мінус 180°C.

Через певний час, специфічний, для кожного виду мікроорганізмів і виду зберігання, культуру пересівають.

Перед початком технологічного процесу культуру, що зберігається в умовах, близьких до анабіозу, оживляють додаванням стерильного рідкого живильного середовища з подальшим висівом на тверде живильне середовище. Переконавшись у достовірності і чистоті культури, її розмножують у стерильних умовах при оптимальному складі живильного середовища і режимі вирощування, методом **проліферації**. Для цього поступово збільшують об'єм культури, поступово збільшуючи об'єм живильного середовища. У промисловості засівний матеріал, зазвичай, отримують глибинним способом у спеціальних апаратах – **інокуляторах**.

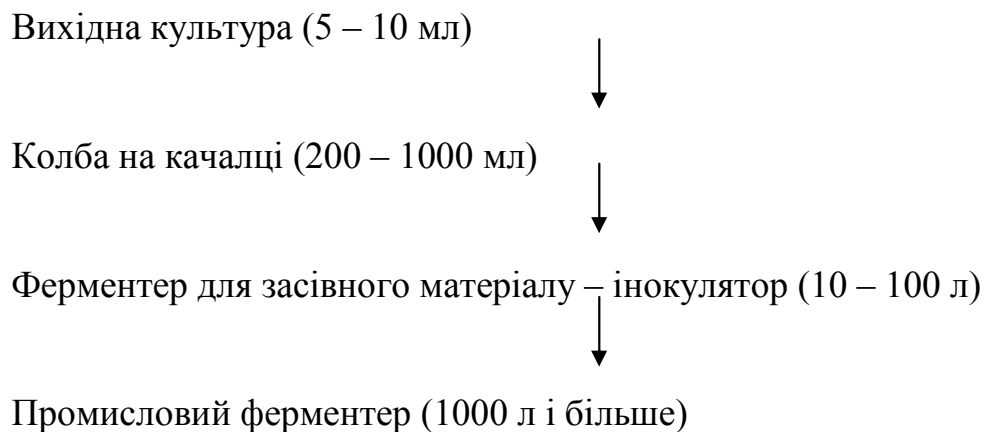
Засівний матеріал повинен володіти:

- високою життєздатністю;
- бути абсолютно стерильним;
- володіти високою біохімічною активністю.

Засівну культуру продуценту отримують глибинним та поверхневим способами (Рисунки 1–3). Під час виробництва пробіотику «Біоспорин» (продуцент *Bacillus subtilis*), лимонної кислоти (продуцент *Aspergillus niger*),

вирощування їстівних шапинкових грибів та ін. засівний матеріал одержують не глибинним способом на рідких живильних середовищах, а поверхневим способом. На рисунку 3 зображена схема отримання засівної культури мікроорганізмів – продуцентів біологічно-активних речовин (ферментів, органічних кислот, антибіотиків, пробіотиків тощо). Отримання засівної виробничої культури проводиться у декілька етапів: 1) оновлення початкової культури на агаризованому середовищі; 2) отримання маточної культури; 3) отримання засівної культури (рисунок 4).

Загальна схема отримання промислового засівного матеріалу глибинним способом наступна (див. рис. 1, 2):



Під час глибинного культивування (див. рис. 2) початковий продуцент з пробірки 1 пересівають на матраці 2 з великою кількістю агаризованого середовища. З матраців культуру змивають стерильною водою та у вигляді суспензії використовують для засіву колб 3. Частіше засів роблять відразу з пробірки у колби. Колби закріплюють на гойдалці 4, яка струшує рідину у колбах і сприяє розчиненню кисню в середовищі, що забезпечує нормальні умови життєдіяльності мікроорганізмів. Готову культуру з колб збирають в одну ємність при дотриманні правил асептики і переносять в малий інокулятор 5 із стерильним охолодженим середовищем. Засів роблять у полум'ї факела, через засівний патрубок інокулятора. У малий інокулятор через індивідуальний фільтр 6 подається стерильне повітря. Підготовку,

стерилізацію та охолодження живильного середовища проводять у малому інокуляторі. Піногасник стерилізують та охолоджують у спеціальній ємності і подають у малий інокулятор за мірою потреби. Для великого інокулятора 7 середовище готують, як правило, в спеціальних апаратах, потім його стерилізують, охолоджують приблизно до 30–40°C і подають у стерильний охолоджений до 60–70°C великий інокулятор, вирівнюють температуру середовища до оптимальної для вирощуваного продукту. Після цієї операції готову культуру з малого інокулятора передавлюють стерильним повітрям у великий інокулятор на свіже живильне середовище. Культивування на всіх стадіях ведеться при оптимальній температурі та аеруванні.

Міцеліальні гриби вирощують для отримання їстівного білка та як джерело біологічно-активних речовин: ферменти, амінокислоти, органічні кислоти, антибіотики тощо. Мікроскопічний гриб *Aspergillus niger* являється продуцентом лимонної кислоти, а вищий їстівний гриб *Pleurotus ostreatus* являється джерелом екологічно чистого білка харчового та кормового призначення.

Одержання засівної культури міцелію вищого їстівного грибу *Pleurotus ostreatus* поверхневим способом (рис. 4)

Зазвичай, для отримання засівної культури міцелію застосовують зерно злакових культур. Зерно миють, варять, підсушують і вносять мінеральні добавки для регулювання рН. Підготовлене зерно засипають на 2/3 у ємності, зазвичай це 1–3-літрові банки, які закривають і стерилізують автоклавуванням (1,5 години при 1–1,5 атм. та 120°C). Стерильне зерно охолоджують і засівають чистою культурою міцелію (одержану з музейних культур) з пробірок, що знаходиться на агаризованому середовищі. Засіяні банки з міцелієм витримують в інкубаційній камері (22–25°C у приміщенні, вологість повітря 60%). За 3–4 тижні субстрат заростає білим пухким міцелієм. Зрілий засівний міцелій готовий до інокуляції підготовлених субстратних блоків. Засівний міцелій може зберігатися за низьких температур (2–5°C) або у замороженому стані із застосуванням рідкого азоту

(до мінус 196°C). Далі засівний міцелій вносять у твердий субстрат (соняшникове лушпиння, солома та інші) для поверхневого вирощування у мішках. Гливу вирощують для отримання їстівних плодкових тіл.

Одержання засівної культури міцелію мікроскопічного гриба *Aspergillus niger* поверхневим способом (Грачева, 1982)

Оновлення культури. Музейну культуру з колекційної пробірки пересаджують у біологічні пробірки (діаметр 18 мм) із свіжим поживним середовищем «сусло–агар» (5–6% пивне сусло та 1,5–2% агару), що скошено. Засіяні пробірки витримують у термостаті при 30°C протягом 3–4 діб. Зростання гриба закінчується інтенсивним спороутворенням.

Отримання засівної культури. У конічні колби ємністю 250 см³ поміщають 15–20 г. пшеничних висівок із вологістю 45%, закривають ватяними пробками і папером. Колби із висівками автоклавують 1 годину при 120°C. Після охолодження висівок у колбах після автоклавування до 30–40°C їх засівають у стерильних умовах суспензією спор мікроскопічного гриба. Суспензію отримують змиванням стерильною водою (1 см³ на одну скошену пробірку) спор із косяка з оновленою культурою. Засіяні колби ставлять до термостату на 2–3 доби при 30°C. За цей час міцелій гриба щільно пронизує субстрат із конідіями жовто-зеленого забарвлення. Даний матеріал являється засівною культурою для подальшої пересадки на тверде живильне середовище у кювети для вирощування поверхневим способом.

Одержання засівної культури міцелію мікроскопічного гриба *Aspergillus niger* глибинним способом (Фараджева, 2002)

Із спор гриба, ліофілізовано висушених, готують суспензію: 3 г сухих спор замочують у 2–3 дм³ мелясного розчину (відхід цукрового виробництва) і витримують при 32°C у термостаті протягом 5–6 годин (оновлення культури). Отриману суспензію засівають у посівний ферментер (малий інокулятор) із аерацією та перемішуванням. Постійно темпорально проводять аналіз на стерильність. Міцелій спливає на поверхню, знизу залишається прозорий розчин. Міцелій пластівцеподібний, дифузний із світлими тонкими

гіфами являється засівною культурою і придатний до подальшого засівання у промисловий ферментер.

Контрольні питання:

1. Чиста культура – це...?
2. Накопичувальна культура – це...?
3. Наведіть способи одержання засівної культури продуцентів біологічно-активних речовин.
4. Наведіть технологічні стадії одержання засівної культури промислового продуцента.
5. У якому вигляді і за яких умов зберігаються промислові культури продуцентів?
6. Які вимоги висуваються до промислових штамів у біотехнологічному виробництві?
7. Які вимоги висуваються до промислової засівної культури у біотехнологічному виробництві?
8. У яких апаратах відбувається процес одержання засівної культури?
9. Як називається метод поступового нарощування об'ємів засівної культури?
10. Наведіть особливості мікроорганізмів, які сприяють широкому застосуванню мікроорганізмів як біооб'єктів у промисловості для одержання багатьох біотехнологічних продуктів?
11. Що передбачає стадія підготовки біооб'єкта?

Практична робота №4

Тема: Поверхнєве та глибинне культивування промислових мікроорганізмів.

Мета: Вивчення способів культивування мікроорганізмів. Здійснення поверхневого та глибинного культивування.

Культивування мікроорганізмів у промисловості здійснюють поверхневим або глибинним способами. Поверхневим способом вирощують тільки аеробні мікроорганізми на поверхні твердого або сипучого живильного середовища. Глибинним методом вирощують мікроорганізми в рідкому живильному середовищі, цей метод застосовується як для вирощування аеробних, так і анаеробних мікроорганізмів.

Поверхнєве культивування мікроорганізмів

Процес культивування продуцента починається з моменту засіву охолодженого стерильного живильного середовища посівним матеріалом. Засів середовища при періодичній стерилізації зазвичай проводиться безпосередньо в стерилізаторі в охолоджене середовище при постійному перемішуванні. При безперервній стерилізації середовище засівають у відсіку стерилізатора, де воно охолоджується, потім засіяне середовище передають у цех вирощування.

Поверхнєве культивування мікроорганізмів може проводитися різними способами. Традиційним є кюветний спосіб, який, на жаль, вимагає застосування важкої ручної праці і величезних виробничих площ. Новішим методом є вирощування продуцентів у механізованих установках.

Кюветний спосіб вирощування. Елементарним місцем для вирощування є кювета – ємність чотирикутної форми площею 0,25–0,50 м² і висотою 2–50 мм. Вона виготовляється з листа металу з перфорованим дном і рідше – з суцільного листа. Кювети бувають відкриті і з кришками. Найбільшого поширення набули відкриті кювети з оцинкованого заліза з

перфорованим днищем. Перфорація виконується у вигляді довгастих вузьких щілин завдовжки 20 мм і шириною 1,5–2 мм, розташованих або в шаховому порядку, або підряд із зазором між отворами 3 – 5 мм і відстанню між рядами 10 мм.

Стерильні кювети заповнюють зволженим та засіяним продуцентом живильним середовищем шаром 2–2,5 см і транспортують у зрощувальні камери, де кювети розташовуються на багатоярусних рухомих етажерках або стаціонарних стелажах з відстанню між ярусами 10–11 см. Зазвичай у стелажах і етажерках влаштовано 17–18 ярусів при загальній висоті не більше 2 м. Це пов'язане з тим, що кювети з середовищем завантажуються на стелажі уручну робітником, що стоїть на підлозі. Перша кювета встановлюється на висоті 20–25 см від підлоги. Етажерки і стелажі повинні виконуватися з металу з антикорозійним покриттям. Перед завантаженням кювет камеру миють і дезінфікують формаліном, який потім видаляється з камери при аерації та обробці аміаком. Камери бувають різного типу і форми. Вони можуть використовуватися з максимальним заповненням простору і мати висоту 2,2 м, або з вільнішим заповненням, коли висота стель може бути 3 м і більше. Камера може заповнюватися кюветами суцільно, наприклад, на пересувних стелажах-етажерках або кювети можуть розташовуватися на стаціонарних стелажах, коли між стелажима передбачається вільний прохід. Найчастіше камера має форму довгого вузького коридору з дверима в торцях. Безпосередньо над камерою розташовується відділення кондиціонування та очищення повітря.

Камери всіх типів працюють за наступним графіком: завантаження; культивування (зазвичай складає від 20 до 72 год); підсушування культури на кюветах сухим, підігрітим до 40–45°C повітрям протягом 3–4 год; вивантаження; прибирання і миття камери; обробка формаліном, аміаком і парою (3 год) і провітрювання камери (близько 3 год). Повний технологічний цикл в камері з урахуванням тривалості зростання продуцента зазвичай складає від 36 до 90 год і залежить від виду продуцента.

Зрощувальні камери розташовують так, щоб у них можна було вести вирощування культури з дотриманням всіх правил асептики. Кожна камера має два виходи. З одного боку камера сполучена із стерильним коридором, з якого в камери завантажують кювети з тільки що засіяним середовищем, а з іншою примикає до розвантажувального коридора, по якому з камер транспортують кювети з готовою культурою. Використання кювет у виробництві пов'язане з витратою великої кількості ручної праці, оскільки майже всі операції на стадії культивування виконуються вручну. І хоча отримання культури продуцента технологічно порівняно просте, її собівартість достатньо висока.

Вирощування в механізованих установках. Основна складність при створенні механізованих ліній полягає в тому, що шар живильного середовища повинен добре аеруватися, не спресовуватися і не підсушуватися. Механізована установка повинна бути влаштована так, щоб можна було без зупинки лінії у разі виникнення інфекції провести стерилізацію і негайне вивантаження зараженого середовища. Механізовані установки розробляються і реалізуються на практиці у ряді країн світу: США, Японії, Франції, Чехії, Германії, Росії, країнах СНД та ін.

Найбільш відомими є механізовані установки Андеркофлера, Джеффра і Хрістенсена. В установці Джеффра здійснюється механізоване завантаження засіяного середовища в кювети, які переміщуються по транспортеру і за допомогою спеціального пристрою передаються на підвісну етажерку. Завантажена етажерка по монорельсі входить у зрошувальний коридор, де створюються необхідні умови, і з швидкістю, залежно від тривалості культивування продуцента, переміщається до іншого кінця коридора. Готова культура при виході із зрошувального коридора автоматично розвантажується, і цикл повторюється.

В установці Хрістенсена процес вирощування здійснюється на безперервно рухомій стрічці скребкового транспортера і процес накопичення ферментів у культурі завершується у зрошувальній камері барабанного типу.

Продуктивність цих установок – 1,6 т/добу. Але ці установки мають істотний недолік: у разі інфікування необхідні повна зупинка процесу і стерилізація всієї лінії.

Механізована установка Андеркофлера періодичної дії має продуктивність – до 10 т/добу.

Достатньо надійною є механізована установка Чехії для вирощування поверхневої культури продуктивністю 0,4 т/добу. Ця установка є камерою, в якій розміщений багатоярусний ланцюговий транспортер з підвішеними до нього лотками. При русі транспортера лотки заповнюються до тих пір, поки перший заповнений лоток не дійде до останньої позиції нижньої стрічки транспортера. Потім камера підключається до кондиціонера, рух транспортера припиняється до кінця культивування. Коли зростання закінчене, включають транспортер, лотки по черзі перекидаються, культура потрапляє в бункер. Після розвантаження камера і лотки миються, стерилізуються, і цикл повторюється. Ця установка має невелику продуктивність, але дуже надійна в експлуатації.

У наш час реальною установкою, здатною працювати в умовах виробництва, є механізована лінія з вертикально розташованими кюветами, створена у ВНДІФС і ВНДІ біотехніка за ідеєю А.В. Соловйова.

Принципова схема установки продуктивністю 1,5 т/добу для вирощування культури у вертикальних кюветах дана на рисунку 5а. Простерилізовані засіяні висівки за допомогою спеціального розподільного пристрою завантажуються на вібраційному столі в зрошувальну камеру і по рейковому шляху подаються в зрошувальне відділення. На спеціальних візках траверсів зрошувальні камери підводяться до повітряних дифузорів. Останні підключені до кондиціонерів, які можуть подавати повітря до зростаючої культури по різних режимах залежно від фази зростання культури. Аерація культури здійснюється через вертикальні канали, що знаходяться між кюветами, через перфоровані стінки кювет. Повітря переміщається уздовж кювет. Кондиціонери працюють з рециркуляцією

повітря, підсос свіжого повітря складає 10%. Викид в атмосферу відпрацьованого повітря також 10%. Відпрацьоване повітря перед видаленням очищається від мікрофлори і пилу. Культура в зрошувальній камері практично не підсихає, навіть спостерігається її додаткове зволоження вологою, що виділяється мікроорганізмами в процесі зростання. Схематично зрошувальна камера є ящиком прямокутної форми з алюмінієвого сплаву (рис. 5б). Перфоровані перегородки з круглими отворами діаметром 3 мм і кроком 40 мм утворюють усередині ящика вертикальні кювети. Просвіти між кюветами виконують роль повітряних щілинних каналів. Кювети можуть відкриватися знизу і зверху (рис. 5в).

Звільнена від культури зрошувальна камера по рейковому шляху подається в мийну камеру, забезпечену форсунками, що подають могутні струмені води. Зрошувальна камера миється і потім стерилізується в спеціальній стерилізаційній камері. Чиста простерилізована зрошувальна камера подається в стерилізаційне відділення на вібраційний завантажувальний стіл, і цикл повторюється. Місткість кожної камери складає 500 кг за сухими висівками.

Переваги цієї установки полягають у повній механізації процесу вирощування, в ізолюванні зрошувальних камер, що у разі потреби дозволяє ізолювати осередок інфекції і провести повну послідовну стерилізацію всіх камер, чого не можна зробити в установках, які безперервно діють.

Представляє практичний інтерес установка колонного типу конструкції ВНДІ біотехніка, призначена для вирощування мікроскопічних грибів у товстому шарі (рис. 6). Складність вирощування в товстому шарі пов'язана з тим, що відбувається перегрів внутрішніх шарів у результаті інтенсивного тепловиділення, і аерація культури сильно ускладнена. При вирощуванні культур у закритому герметичному апараті рух газу відбувається не уздовж поверхні шару середовища, а розповсюджується на весь об'єм. Виникає режим об'ємної аерації, здатний забезпечити конвективний і дифузійний

тепломасообмін по всій висоті шару зростаючої культури, що дозволяє в 10 і більше разів збільшувати висоту шаруючого середовища (до 300 мм).

Апаратом є вертикальний циліндр, розділений на секції перфорованими пластинами, укріпленими консольно на поворотних осях. У середині апарата розташовані перемішувачі пристрої для періодичного перемішування, що забезпечують рівномірність висоти шару і що виключають утворення застійних зон середовища усередині кожної секції. Таким чином, в шарі підтримується задане розподілення повітря. Верхня частина апарата герметично сполучена із стерилізатором. Стерильне повітря для аерації надходить у кожну секцію під перфоровані пластини із заданою температурою та об'ємом і перед виходом в атмосферу піддається бактеріальному очищенню.

Глибинне культивування мікроорганізмів. Цей спосіб має ряд очевидних переваг перед поверхневим, оскільки дозволяє значно скоротити виробничі площі, виключити важку непродуктивну ручну працю, поліпшити гігієну праці, спрощує механізацію та автоматизацію виробництва, робить можливим перехід на безперервний спосіб культивування. При глибинному способі культивування раціональніше використовуються живильні речовини середовищ, що дають можливість значно скоротити відходи виробництва у вигляді нерозчинних осадів твердого живильного середовища, отримувати препарати з меншим вмістом домішок і більшою питомою активністю. Глибинне культивування проводять у вертикальних герметичних ємностях різного розміру, що називаються ферментаторами (рис. 7, 8). Основна вимога до ферментатора – можливість проведення процесу культивування продуцента в асептичних умовах при інтенсивній аерації середовища. Для підтримання стерильних умов ферментатори мають бути абсолютно герметичними, а всі лінії трубопроводів мають бути доступні до обробки гарячою парою. В процесі культивування доводиться мати справу з складною трифазною системою рідина – тверда суспензія – газ. У такій системі ускладнені процеси масообміну і тому ускладнюється апаратурне

оформлення всієї стадії вирощування. Сучасні ферментатори містять вимірювальні прилади та регулюючі пристрої. Ферментатори обладнані пристроями для піногасіння та оглядовими люками. Ферментатори також обладнані арматурою та трубопроводами для подачі живильного середовища, води, пари, розчину, що регулює рН, піногасників, повітря, тощо.

Використовуються ферментатори з пневматичним перемішуванням і аерацією середовища. Усередині таких ферментаторів вмонтовуються форсунки, дифузори, барботери для подачі повітря. Такі ферментатори можуть бути циліндричними, кульоподібними, горизонтальними із звичайним і інтенсивним масообміном.

Дуже важливо переконатися, що у ферментаторі забезпечуються асептичний режим культивування, дотримання всіх параметрів зростання мікроорганізму і створюються сприятливі умови біосинтезу цільового продукту. Для дотримання цієї вимоги ферментатори повинні витримувати жорстку стерилізацію і працювати протягом всього культивування під невеликим надмірним тиском.

Послідовність процесу культивування мікроорганізмів є загальною як для глибинного (рис. 9), так і для поверхневого (рис. 10) способу культивування. Вона включає стадії приготування посівного матеріалу, приготування живильного середовища, його стерилізації, охолодження, засіву посівним матеріалом і вирощування. Проте залежно від способу культивування апаратурне оформлення технологічної схеми істотно розрізняється.

Технологічні схеми глибинного культивування (див. рис. 9) аеробних і анаеробних мікроорганізмів майже не відрізняються одна від одної, за винятком того, що в схемах культивування анаеробних мікроорганізмів виключається стадія підготовки повітря і використовуються ферментатори без аеруючих і перемішуючих пристроїв.

Контрольні питання:

1. Наведіть технологічні стадії культивування мікроорганізмів.
2. Наведіть промислові способи культивування мікроорганізмів.
3. Наведіть переваги глибинного культивування мікроорганізмів.
4. Наведіть складнощі, що виникають під час глибинного культивування мікроорганізмів та шляхи їх подолання.
5. Яка апаратура являється основною під час глибинного культивування та які вимоги висуваються до неї?
6. Наведіть способи поверхневого культивування мікроорганізмів, їх переваги та недоліки.
7. У яких апаратах відбувається процес основної ферментації?
8. Наведіть будову кювети?
9. Наведіть засоби механізації та автоматизації глибинного способу культивування?

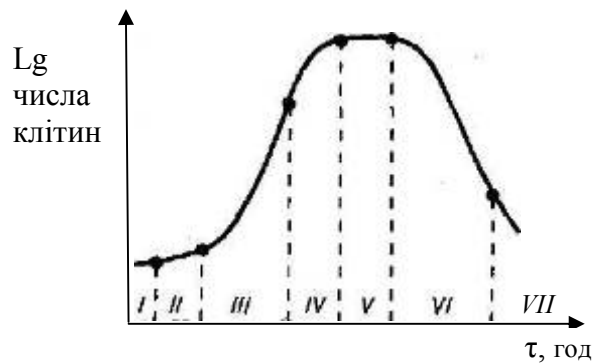
Практична робота №5

Тема: Ріст мікроорганізмів у періодичній (статичній) культурі. Вплив умов культивування на показники росту мікроорганізмів.

Мета: Дослідження росту культури при періодичному культивуванні. Побудова кривої росту. Розрахувати кінетичні показники періодичного культивування.

До промислових способів культивування мікроорганізмів належать періодичне, безперервне культивування та культивування іммобілізованих клітин. Найбільш поширений **спосіб періодичного культивування**. При даному способі інокулянт вносять у живильне середовище, яке містить задану кількість всіх необхідних поживних речовин. При цьому ні один з істотних компонентів живильного середовища не надходить у систему у процесі культивування, тобто це замкнута система. Періодичне культивування застосовується як для поверхневих культур (на поверхні твердого живильного середовища), так і глибинних культур (в рідкому живильному середовищі). Зростання мікроорганізмів у живильному середовищі припиняється тоді, коли зміст якого-небудь з необхідних компонентів середовища досягає мінімуму або у середовищі накопичуються продукти метаболізму, що інгібують ріст мікроорганізмів.

Крива, що описує залежність логарифма числа живих клітин від часу, називається кривою росту. Типова крива росту періодичної культури мікроорганізмів, зображена на рисунку, має S-подібну форму і характеризується різними фазами, пов'язаними із зміною складу живильного середовища, складом біомаси та фізіолого-біохімічними властивостями мікроорганізмів.



I – лаг-фаза; II – фаза прискореного росту; III – фаза логарифмічного росту (експоненціальна); IV – фаза уповільненого росту через нестачу джерел живлення або через накопичення інгібуючих продуктів; V – стаціонарна фаза; VI – фаза відмирання клітин; VII – фаза виживання клітин

Під час культивування мікроорганізмів у **безперервній культурі** всі компоненти живильного середовища постійно надходять у систему і виводяться з неї. Це відкрита система і культивування здійснюється тільки в глибинній культурі, найчастіше аерованій.

Культивування іммобілізованих клітин відбувається шляхом прикріплення клітин мікроорганізмів (іммобілізація) на будь-які інертні носії. Живильне середовище постійно надходить у систему й виводиться з неї, тобто це теж відкрита система.

Для культивування мікроорганізмів необхідна наявність життєздатної засівної культури (інокуляту), живильного середовища, що містить всі необхідні елементи живлення (джерело енергії, вуглецю, макро- і мікроелементів і, у разі потреби, фактори росту), відсутність у середовищі різного роду інгібіторів росту. Необхідна, також підтримка оптимальних для росту мікроорганізмів фізико-хімічних умов навколишнього середовища (температура, рН, тиск, умови аерації, джерела світла та ін.).

Основні параметри росту мікроорганізмів: X – концентрація біомаси, г/л; N – кількість клітин в одиниці об'єму (титр культури, щільність популяції), кількість клітин у 1 мл; μ – питома швидкість росту – приріст

біомаси або числа клітин за одиницю часу, віднесений до концентрації біомаси або кількості клітин, год⁻¹.

Для кількісної характеристики культивування мікроорганізмів користуються двома показниками – середньою та питомою швидкістю росту. Середня швидкість росту V характеризується приростом біомаси за одиницю часу:

$$V = \frac{x - x_0}{\tau - \tau_0},$$

де x_0 – кількість біомаси на початку культивування, кг/м³; x – біомаса за час культивування τ , кг/м³; τ_0 і τ – початковий і кінцевий час відліку відповідно, год.

Питома швидкість росту характеризує годинний приріст на одиницю зростаючої біомаси:

$$\mu = \frac{dx}{dt} \times \frac{1}{x}.$$

Математична модель зростання кількості біомаси – рівняння Моно – застосовується для кількісного опису динаміки росту біомаси:

$$\frac{dx}{d\tau} = \mu x.$$

Величину μ за певний проміжок часу можна знайти, вирішивши рівняння питомої швидкості росту шляхом логарифмування:

$$\mu = \frac{\ln \frac{x_0}{x}}{\tau - \tau_0} \quad \text{або} \quad \mu = \frac{2,3(\lg x - \lg x_0)}{\tau - \tau_0}.$$

Розмірність питомої швидкості μ , год^{-1} . З наведених рівнянь виходить, що питома швидкість росту залежить від кількості біомаси дріжджів, які засіваються та отримуваних, від тривалості процесу.

Для визначення росту мікроорганізмів використовуються ряд методів, які поділяються на прямі і непрямі методи визначення. До прямих методів належать:

- визначення біомаси ваговим або турбідиметричним методом;
- визначення кількості клітин мікроорганізмів при використанні лічильних камер або при висіванні на тверді середовища.

При використанні непрямих методів проводять визначення маси окремих компонентів клітини (білок, клітинний азот, нуклеїнові кислоти, аденозінтрифосфорна кислота та ін.), маси спожитого субстрату (джерела вуглецю, азоту, кисню та ін.), маси утворених продуктів метаболізму тощо.

Контрольні питання

1. Назвіть основні відмінності періодичного і безперервного культивування?
2. Які фази розвитку проходить біомаса клітин в умовах періодичного культивування?
3. Які показники використовують для характеристики процесів зростання популяції мікроорганізмів?
4. У яких одиницях вимірюється питома швидкість росту, загальна швидкість росту?
5. Як можна змінити питому швидкість росту?

Практична робота №6

Тема: Технологічний контроль на підприємствах біотехнологічної промисловості.

Мета: Вивчити види контролю на біотехнологічних підприємствах. Здійснити контроль якості сировини та готового продукту.

На підприємствах біотехнологічної промисловості санітарно-бактеріологічний або мікробіологічний контроль є обов'язковим і здійснюється органами санітарного нагляду в плановому порядку, а також позапланово за епідемічними показниками.

Як показник санітарного стану діючого закладу широко використовується характеристика мікробного засівання поверхні різних об'єктів – приладів та обладнання, інвентарю, одягу, рук персоналу. Основними тестами мікробної забрудненості предметів є загальна кількість мікроорганізмів на одиницю поверхні досліджуваного предмета (мікробне число) і наявність на предметах санітарно-показових та недопустимих мікроорганізмів (*Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* та ін.).

Основним методом взяття проб для дослідження мікробної забрудненості поверхні будь-якого предмета є його **змив з певної площі**. З цією метою стерильною серветкою, ватним тампоном, змоченими у стерильній воді, протирають певну площу поверхні об'єкта і переносять серветку / тампон у пробірку зі стерильною водою. Обережно збовтують суміш для десорбції мікроорганізмів і одержану суспензію використовують для аналізу. Змиви з рук, рушників і санітарного одягу здійснюють до початку і після роботи. Кількість мікроорганізмів (мікробне число) у змивах часто визначають за методом Коха і виражають на одиницю поверхні досліджуваного об'єкта, найчастіше на 1 см^2 . Залежно від ступеня мікробного засівання із різних розведень змиву беруть по 1 мл і висівають на МПА у

чашках за загальноприйнятою методикою. Мікробне число визначають за такою формулою:

$$M = \frac{n \times 10}{S},$$

де М – мікробне число; n – кількість мікроорганізмів, які містяться в 1 мл вихідного розведення змиву (для визначення цієї кількості число колоній, які вирости на МПА в чашках, перераховують з огляду на розведення); 10 – кількість рідини, яка використовувалася для десорбції мікрофлори, мл; S – площа, з якої зроблено змив, см².

Санітарний стан поверхні досліджуваного об'єкта вважається дуже відмінним, якщо загальна кількість мікробів на 1 см² складає не більше 100, добрим – якщо їх від 100 до 1000, задовільним – якщо мікробів понад 1000, поганим – якщо їх більше 10000.

Визначення титру кишкової палички у досліджуваних змивах. З цією метою посів змивів здійснюють на середовище Кесслера і ставлять чашки у термостат при температурі 43°C на 24 год. Це перший етап виявлення кишкової палички, який дістав назву бродильної проби. Якщо утворення газів і помутніння не відбувається, роблять остаточний висновок про відсутність бактерій групи кишкової палички.

При виявленні газоутворення і помутніння проводять другий етап визначення кишкової палички. Для цього пересівають культуру, яка виростила на середовищі Кесслера, на диференціально-діагностичне живильне середовище Ендо. Засіяні чашки Петрі розміщують у термостаті при температурі 37°C на 24 год. Після закінчення інкубації відбирають лактозопозитивні (червоні) колонії і виготовляють із них мікропрепарати, фарбують за Грамом і вивчають під мікроскопом. Якщо в полі зору виявляються грамнегативні неспорозні палички, то для остаточної ідентифікації кишкової палички проводять оксидазний тест – третій етап. Цей тест пропонується як експрес-метод для диференціації *E. coli* від сапрофітних бактерій, що морфологічно подібні до неї, але відрізняються

тим, що мають фермент оксидазу і можуть окислювати фенілєндіамінові сполуки до індофенолу. Останній має яскраво синій колір. Для проведення оксидазного тесту бактеріологічною петлею відбирають невеличку кількість колонії, яка виросла на середовищі Ендо, на фільтрувальний папір, просочений розчином фенілєндіаміну. Якщо на місці нанесення бактеріальної маси колір паперу не змінюється, то оксидазний тест буде негативним, і, навпаки, якщо бактерії володіють активною оксидазою, папір стає синім протягом 1 хв.

Виявлення у досліджуваних змивах кишкової палички, умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів свідчить про грубе порушення санітарно-гігієнічних правил та необхідність проведення негайних профілактичних заходів!

Мікробіологічний контроль хлібобулочних виробів. У хлібопекарному виробництві мікроорганізми мають важливе значення. Наприклад, такі мікроорганізми, як дріжджі та молочнокислі бактерії, спеціально використовуються для виготовлення тіста. Інші види мікроорганізмів, які потрапляють у сировину із зовнішнього середовища, можуть знижувати якість сировини, викликати псування готової продукції і бути причиною харчових отруєнь.

Сировина, яка використовується для виробництва хліба, часто буває засіяна мікробами. Так, мікрофлора борошна походить переважно від мікрофлори зерна. Кількісний і якісний склад мікроорганізмів борошна залежить від ступеню інфікованості зерна, способу його розмелювання та очистки. Загальна кількість мікробів у 1 г борошна може доходити до 3 млн. Проте, ця цифра змінюється залежно від вмісту вологи, тривалості зберігання тощо. Якість борошна значною мірою визначається вмістом у ньому неспорноносних *Envina herbicola* і спорноносних *Bacillus mesentericus* та *Bacillus subtilis* мікроорганізмів. Картопляна (*B. mesentericus*) і сінна (*B. subtilis*) палички – найбільш поширені збудники мікробного процесу псування хліба. Спори цих бактерій дуже термостійкі, завдяки чому вони

зберігаються у хлібі під час його випікання. При повільному охолодженні такого хліба, створюються сприятливі умови для проростання спор, що спричинює в ньому гнильні процеси. У цьому випадку м'якуш хліба стає липким і набуває неприємного запаху. Такий хліб не придатний для споживання. Картопляна хвороба найчастіше вражає пшеничний хліб влітку. Пшеничний і житній хліб часто уражується також і «крейдяною хворобою», при якій на м'якуші хліба з'являється білий мучнистий наліт. Це міцелій цвільових грибів (наприклад *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*) і дріжджеподібних мікроорганізмів (наприклад *Saccharomyces*).

Бактеріологічний аналіз молока. Молоко являє собою дуже сприятливе середовище для розмноження та зберігання різних видів мікроорганізмів. Кількість їх у 1 мл молока може сягати кількох мільйонів. Засівання молока мікробами відбувається переважно під час доїння і зберігання. Традиційно у молоці переважають непатогенні неспорутворюючі мікрококи або паличкоподібні представники відділу *Lactobacillales* (наприклад, *Lactococcus lactis* або *Lactobacillus acidophilus*), молочнокислі бактерії та інші. Молочнокислі бактерії – це група мікроаерофільних грампозитивних мікроорганізмів, що зброджують вуглеводи з утворенням молочної кислоти як одного з основних продуктів. До молочнокислих бактерій також відносять корисну неспорутворюючу мікрофлору молока: рухому паличку, *Streptococcus lactis* та нерухому «болгарську паличку» *Lactobacillus bulgaricus*, що викликають природне сквашування. Процес природного сквашування лежить в основі виробництва кисломолочних продуктів: кефіру, йогурту, ряжанки, сирів, тощо.

У забрудненому молоці міститься значна кількість представників групи кишкової палички, а також маслянокислі та гнильні бактерії. За певних умов у молоко потрапляють патогенні мікроби, що може спричинити до виникнення епідемій серед населення. Найчастіше визначають загальну кількість мікроорганізмів у молоці (мікробне число), колі-титр і пробу на

редуктазу. Визначення у молоці патогенних мікробів здійснюється в спеціальних мікробіологічних лабораторіях.

Контрольні питання:

1. Які види технологічного контролю здійснюються на підприємствах біотехнологічної промисловості?
2. Опишіть методику змивів з поверхні?
3. Що передбачає контроль якості сировини?
4. Наявність яких мікроорганізмів не допускається у сировині та готових біотехнологічних продуктах?
5. Які в основному мікроорганізми контролюються у молоці та борошні?
6. Які живильні середовища застосовуються для аналізу на бактеріальне та грибне інфікування? За яких температурних умов?
7. Для чого здійснюють розведення проб сировини, наприклад молока або борошна?
8. Для чого борошно, що підлягає мікробному контролю, потребує попередньої температурної обробки?
9. Опишіть методику розведень?
10. Які існують методи підрахунку мікроорганізмів?

Практична робота №7

Тема: Методи виділення та очищення кінцевих продуктів біотехнологічних виробництв.

Мета: Вивчити методи виділення та очищення кінцевих продуктів біотехнологічного виробництва.

Завершальні стадії біотехнологічного процесу – виділення цільового продукту – істотно різняться залежно від того, накопичується продукт у клітині або він виділяється у культуральну рідину, або ж продуктом є клітинна біомаса. Найбільш складним є виділення внутрішньоклітинного продукту. При цьому клітини необхідно відокремити від середовища культивування, піддати їх руйнуванню, а потім цільовий продукт очистити від залишків зруйнованих клітин.

Виділення продукту істотно полегшується, якщо він екскритується продуцентом у культуральну рідину. Тому однією з первинних завдань біотехнології є створення промислових штамів мікроорганізмів, які виділяють якомога більшу кількість цінних продуктів у значних кількостях.

Технологія виділення та очищення значною мірою визначається природою цільового продукту. У ряді випадків не потребується ретельне очищення продукту: продукт володіє необхідною активністю в неочищеному стані; домішки сторонніх речовин у продукті не надає жодного небажаного впливу при його застосуванні. Деякі традиційні біотехнологічні процеси взагалі виключають етап відділення продукту.

Першим етапом у процесі очищення цільового продукту є поділ культуральної рідини і клітинної біомаси – **сепарація**. У деяких випадках перед сепарацією відбувається спеціальна обробка реакційної суміші, яка сприяє більш ефективному відділенню біомаси та стабілізації продукту, що виділяється. Застосовуються різні методи сепарації.

Методи сепарації

Флотація. Метод використовується в тому випадку, якщо клітини продуцента через низьку гідрофільність накопичуються у поверхневих шарах вмісту біореактора. Особливі пристрої (флотатори) різної конструкції видаляють піну разом з прилиплими до бульбашок газу клітинами, що утворюється при культивуванні. Підвищення ефективності відбору біомаси досягається спінюванням рідини з подальшим відділенням її верхнього шару механічним шляхом. Достоїнствами методу є його економічність, висока продуктивність і можливість використання у безперервних процесах.

Фільтрація. Застосовуються різні фільтруючі системи (барабанні, стрічкові, тарілчасті фільтри, карусельні вакуум-фільтри, фільтри-преси, мембранні фільтри) засновані на однаковому принципі – затримки біомаси на пористій фільтруючій перегородці. Недоліком способу є налипання клітин на фільтри, шар яких знижує швидкість потоку рідини в процесі фільтрування.

Центрифугування. Даний спосіб потребує більш дорогого устаткування, ніж фільтрування, тому він застосовується якщо: а) суспензія фільтрується занадто повільно; б) виникає необхідність максимального звільнення культуральної рідини від частинок, що в ній містяться; в) потрібно забезпечити безперервний процес сепарації, коли фільтри розраховані на періодичну дію.

Центрифугування і фільтрацію в деяких біотехнологічних процесах застосовують у комбінації, тобто застосовуються фільтраційні центрифуги, в яких розподіл рідкої і твердої фаз заснований на двох процесах фільтрування та центрифугування.

Методи руйнування клітин

Руйнування клітин проводиться фізичними, хімічними і ферментативними методами. Найбільше промислове значення мають фізичні способи дезінтеграції:

1. ультразвуком;
2. лопатками або вібрацією – метод, зазвичай використовують у пілотних і промислових установках;

3. струшуванням із скляними намистами;
4. продавлюванням через вузькі отвори під високим тиском;
5. роздавлюванням замороженої маси;
6. розтиранням у спеціальних ступках;
7. за допомогою осмотичного шоку;
8. багатократним заморожуванням і відтаванням;
9. стискуванням клітинної суспензії з наступним різким зниженням тиску (декомпресією).

Фізичні способи дезінтеграції відрізняються більшою економічністю у порівнянні з іншими методами, проте вони характеризуються відсутністю вираженої специфічності, внаслідок чого обробка може негативно впливати на якість одержаного цільового продукту.

Відділення та очищення продуктів

Виділення цільового продукту з культуральної рідини або одержаного у результаті процесів дезінтеграції гомогенату зруйнованих клітин здійснюється шляхом осадження, екстракції або різних методів адсорбції.

Осадження розчинених речовин здійснюється фізичними (нагрівання, розведення або концентрування, охолодження розчину) або хімічними факторами, що переводять розчинну речовину в малорозчинний стан. Залежно від мети і властивостей продукту, що виділяється, підбирається той чи інший метод та фактор дії, тобто підбирається реагент і ін.

Екстракція підрозділяється на твердо-рідиннофазну (при якій продукт з твердої фази переходить у рідку) та рідинно-рідиннофазну (коли забезпечується переведення продукту з однієї рідинної фази в іншу, також рідинну фазу). Твердо-рідиннофазна екстракція зводиться часом до простої обробки твердого зразка водою або органічним розчинником з метою вилучення з нього розчинних сполук. Досить широко застосовуються різні органічні розчинники, зокрема екстрагування ацетоном, який ефективно переводить у розчин ряд ліпідних і білкових компонентів клітин.

Адсорбція є досить поширеним методом відділення продукту і розглядається в якості окремого випадку екстракції, при якому екстрагуючим агентом служить тверде тіло. Механізм її зводиться до зв'язування речовини, що виділяється з рідкої або газоподібної фази поверхнею твердого тіла. Традиційними адсорбентами є деревне вугілля, пористі глини та ін.

Більш сучасні методи розділення речовин включають хроматографію, електрофорез, ізотахофорез, електрофокусировку, які засновані на принципах екстракції та адсорбції.

Поділ речовин шляхом хроматографії засновано на їх неоднаковому розподілі між двома фазами, що не змішуються. Розрізняють хроматографію на папері, пластинках і колонках. При хроматографії на папері або на пластинках однією з фаз, що не змішуються, є рухомий розчинник, а іншою (нерухомою фазою) служать волокна паперу або частки покриває пластинку якогось матеріалу (наприклад, силікагелю). При хроматографії на колонках рухомою фазою є розчинник, що протікає через колонку, а нерухому фазу представляє адсорбент, що заповнює колонку (найчастіше це гранульований гель). Хроматографія на колонках допускає масштабування процесу, в результаті чого вона досить широко застосовується в промислових умовах і включає кілька різновидів. Один з них – іонообмінна хроматографія, колонка наповнюється гранулами адсорбенту, які несуть заряджені катіонні (NH_4) або аніонні (SO_4) групи, здатні захоплювати іони протилежного заряду. Даний метод використовується для виділення іонізованих речовин з рідини, а також для очищення нейтральних з'єднань від домішок іонної природи.

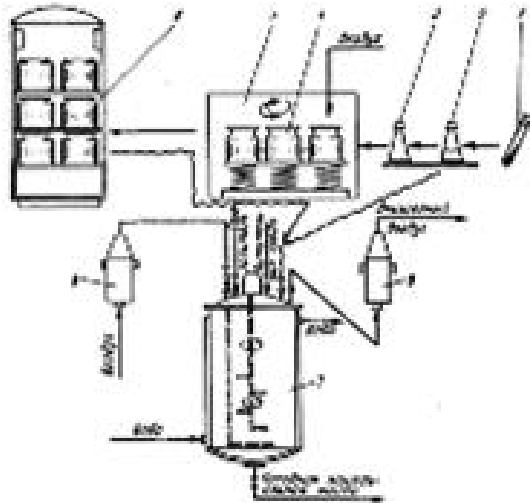


Рисунок 1. Технологічна схема отримання засівної культури глибинним способом культивування (міцеліальний продуцент) (Грачева І.М., 1987):

1 – вихідна культура продуцента в пробірках; 2 – культура в колбі на суловому середовищі; 3 – культура на висівках у колбі; 4 – ємність для отримання глибинної культури; 5 – качалка; 6 – холодна кімната; 7 – інокулятор; 8 – фільтри для очищення повітря

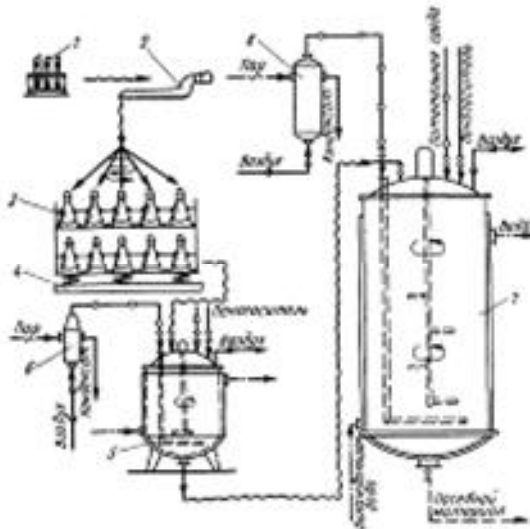


Рисунок 2. Технологічна схема отримання засівної культури глибинним способом культивування (бактерійний продуцент) (Грачева І.М., 1987):

1 – пробірки із продуцентом; 2 – матраци із агаризованим середовищем; 3 – колби для засіву; 4 – качалка для колб; 5 – малий інокулятор; 6 – фільтр; 7 – великий інокулятор

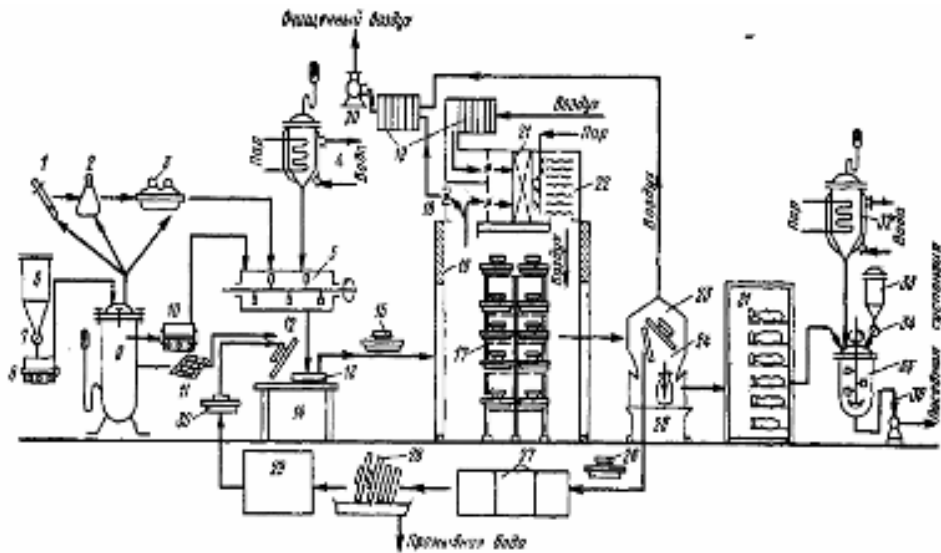


Рис. 3. Технологічна схема отримання засівної культури поверхневим способом культивування (Грачева І.М., 1987): 1 – вихідна культура продуцента у пробірках; 2 – культура у колбі на висівках; 3 – культура на висівках у банці; 4 – ємність для підігрівання води; 5 – стерилізатор; 6 – ємність для зберігання висівок; 7 – дозатор; 8 – бікс із висівками; 9 – автоклав; 10 – бікс із стерильними висівками; 11 – стьобана ватно-марлева салфетка; 12 – кришка для кювети; 13 – кювета на завантаженні; 14 – стіл; 15 – заповнена кювета; 16 – камера для вирощування; 17 – стілажі; 18 – викидання повітря із калориферу до атмосфери; 19 – фільтри для повітря; 20 – вентилятор; 21 – калорифер; 22 – відбійники; 23 – ручний маніпулятор для завантаження кювет; 24 – готова засівна культура; 25 – стерильний флакон; 26 – забруднена кювета; 27 – ванна для миття кювет; 28 – сушка кювет; 29 – шухляда для стерилізації кювет; 30 – стерильна кювета; 31 – холодна кімната; 32 – ємність для стерилізації та охолодження води; 33 – ємність для поверхово-активної речовини; 34 – дозатор; 35 – ємність для приготування засівної суспензії; 36 – насос

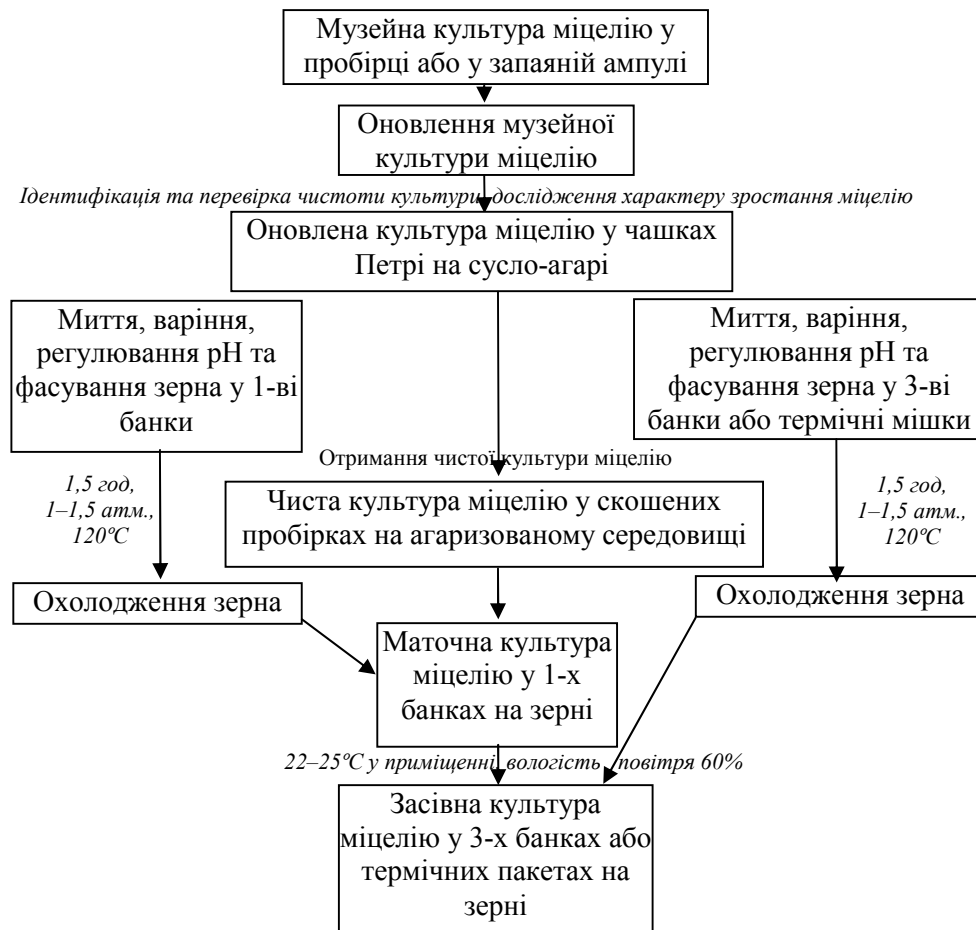


Рисунок 4. Блок-схема одержання засівної культури міцелію гливи звичайної, поверхневим способом

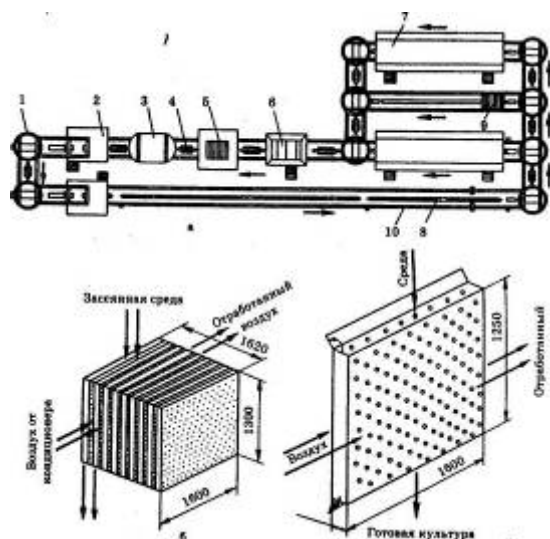


Рисунок 5. Установа з вертикальними кюветами для вирощування поверхневої культури:

а – Загальна схема:

1 – поворотне коло; 2 – вібраційний стіл для завантаження; 3 – стерилізатор камер; 4 – штовхач; 5 – пристрій для миття камер; 6 – стіл для розвантаження; 7 – коридор з кондиціонерами для вирощування; 8 – транспортер; 9 – зрошувальна камера; 10 – рейковий шлях;

б – Зрошувальна камера;

в-Кювета

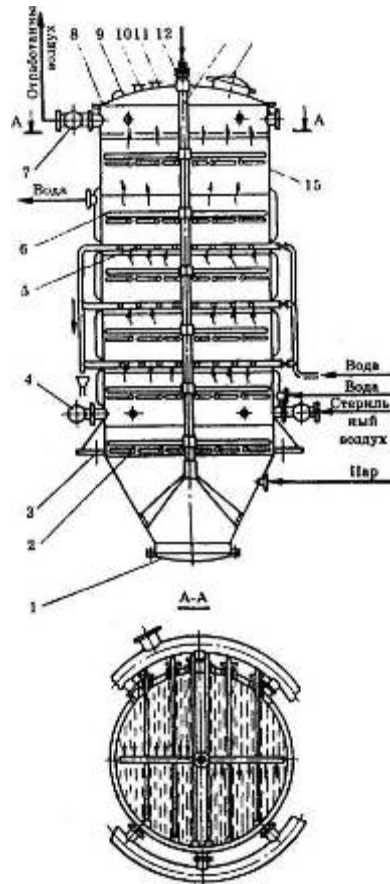


Рисунок 6. Апарат для механізованого вирощування мікроорганізмів у товстому шарі середовища:

1 – люк для вивантаження; 2 – вал секції; 3 – опора; 4 – колектор підведення стерильного повітря; 5 – змійовики, що охолоджують; 6 – лопать валу; 7 – колектор відведення відпрацьованого повітря; 8 – кришка; 9 – бобишка манометра; 10 – штуцер; 11 – повітряний клапан; 12 – шестерня приводу вала; 13 – вал; 14 – люк для завантаження; 15 – корпус

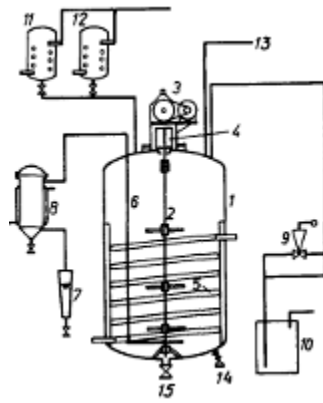


Рисунок 7. Схема ферментера із допоміжними пристроями (Беккер, 1974):

1 – корпус ферментера; 2 – вал змішувача із турбінами; 3 – електродвигун із коробкою передач; 4 – сальник вала змішувача; 5 – спіраль теплообмінника; 6 – перфорований барботер; 7 – пристрій для визначення витрати повітря; 8 – фільтр для стерилізації повітря; 9 – повітряний клапан із вентилем регулювання; 10 – уловлювач, наповнений фенолом; 11, 12 – резервуари для стерилізації піногасника та додаткової подачі живильного середовища під час ферментації; 13 – трубопровід для живильного середовища; 14 – вентиль виводу; 15 – вентиль для відбору проб

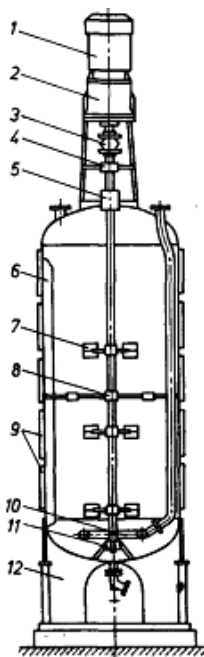


Рисунок 8. Принципова схема ферментатора (Беккер, 1974):

1 – електродвигун; 2 – редуктор; 3 – муфта; 4 – прокладка; 5 – сальник кришки; 6 – ребра корпусу; 7 – триступеневий змішувач; 8 – тяжі центрування вала змішувача; 9 – теплообмінник; 10 – повітряний барботер; 11 – ложе підшипника; 12 – опора

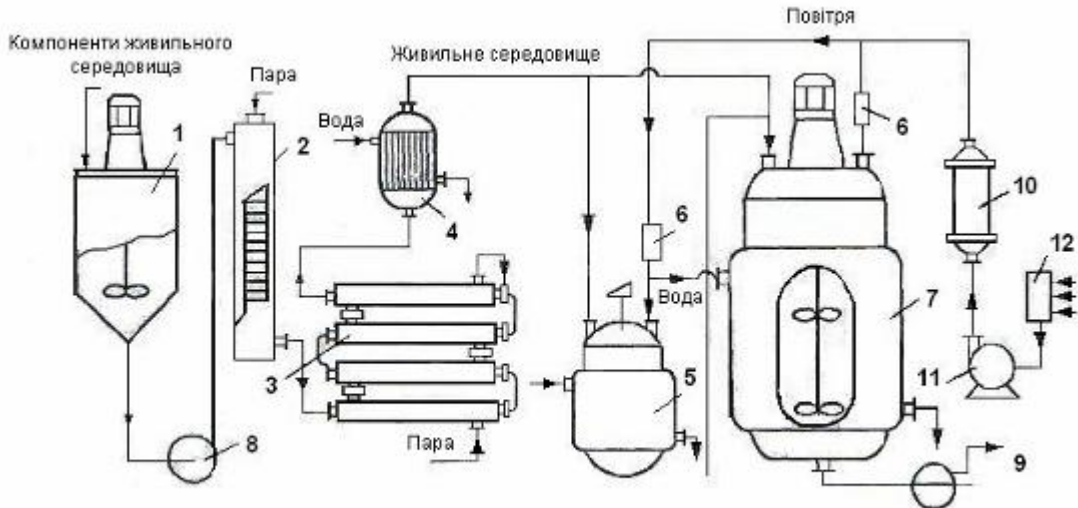


Рисунок 9. Принципова технологічна схема глибинного культивування мікроорганізмів (А.А. Світцов, 1986):

1 – змішувач живильного середовища; 2 – стерилізатор у безперервному потоці живильного середовища; 3, 4 – теплообмінники; 5 – інокулятор; 6, 10, 12 – фільтри для очищення повітря; 7 – ферментатор; 8, 9 – насоси; 11 – компресор

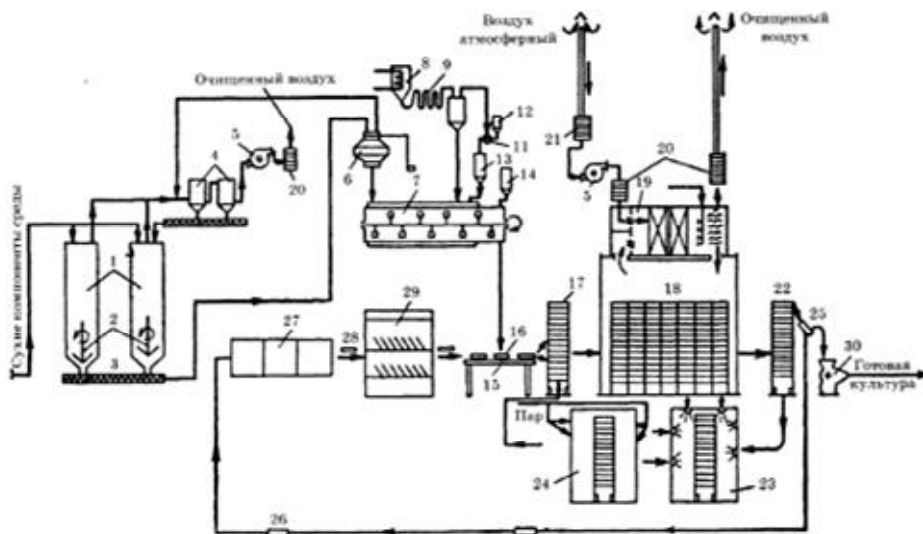


Рисунок 10. Принципова схема отримання культури мікроорганізму поверхневим способом на твердому середовищі: 1 – бункери; 2 – пристрої для перемішування; 3 – шнек; 4 – циклони для очистки повітря відводу; 5 – вентилятор; 6 – автоматичний дозатор висівок; 7 – стерилізатор сипучих компонентів; 8 – стерилізатор для води; 9 – теплообмінник; 10 – мірник стерильної води; 11 – дозатор; 12 – мірник для концентрованої кислоти; 13 – мірник для розчину соляної кислоти; 14 – ємність для засівної культури; 15 – стіл для завантаження; 16 – кювета; 17 – пересувна етажерка для переміщення кювет; 18 – зрошувальна камера; 19 – кондиціонер; 20 – фільтри тонкого очищення повітря; 21 – фільтри попереднього очищення повітря; 22 – етажерка із готовою культурою; 23 – камера для миття етажерок; 24 – камера для стерилізації етажерок; 25 – кювета на розвантаженні; 26 – забруднена кювета; 27 – миття кювет; 28 – чиста кювета; 29 – камера для стерилізації кювет; 30 – подрібнювач для готової культури

Список літератури

1. Векірчик К.М. Практикум з мікробіології: навч. посіб. / К. М. Векірчик. – К. : Либідь, 2001. – 144 с.
2. Фараджева Е. Д. Общая технология бродильных производств / Е. Д. Фараджева, В. А. Федоров. – М. : Колос, 2002. – 408 с.
3. Манаков М. Н. Теоретические основы технологии микробиологических производств / М. Н. Манаков, Д. Г. Победимский. – М. : Агропромиздат, 1990. – 272 с.
4. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии / В. В. Бирюков. – М. : Колос, 2004. – 296 с.
5. Виестур У. Э. Биотехнология: Биологические агенты, технология, аппаратура / У. Э. Виестур, И. А. Шмите, А. В. Жилевич. – Рига, 1987. – 263 с.
6. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева. – М. : Агропромиздат, 1987. – 335 с.
7. Сидоров Ю. І. Процеси і апарати мікробіологічної промисловості / Ю. І. Сидоров, Р. Й. Влязло, В. П. Новіков. – Львів : Вид-во Національного університету «Львівська політехніка», 2004. – 252 с.
8. Елинов Н. П. Основы биотехнологии. Для студентов институтов, аспирантов и практических работников / Н. П. Елинов. – С., 1995. – 600 с.
9. Беккер М. Е. Биотехнология / М. Е. Беккер, Г. К. Лиепиньш, Е. П. Райпулис. – М. : Агропромиздат, 1990. – 334 с.
10. Безбородов А. М. Биотехнология продуктов микробного синтеза / А. М. Безбородов. – М. : «Агропромиздат», 1991. – 320 с.

Навчальне видання

ПРОЦЕСИ І АПАРАТИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА

Методичні рекомендації

Укладачі: **Пастушенко** Андрій Сергійович

Храмов Микита Сергійович

Норинський Олексій Ігорович

Формат 60x84 1/16. Ум. Друк. Арк.. ____

Тираж ____ прим. Зам. № ____

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

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