

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

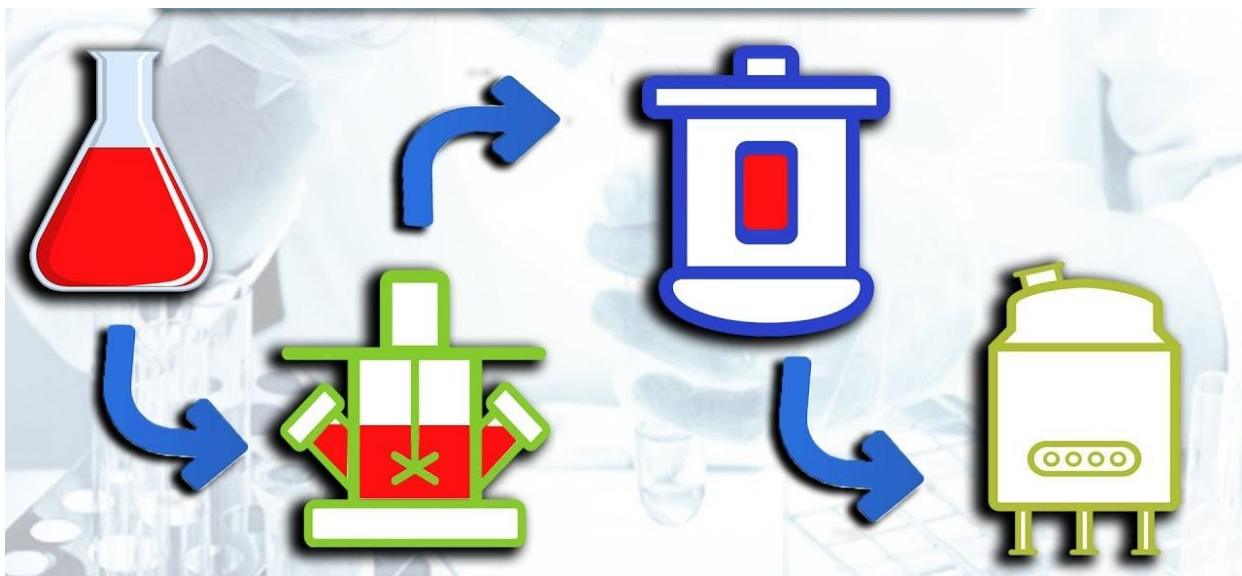
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології

Кафедра біотехнології та біоінженерії

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



Миколаїв
2024

УДК 606-021.58
П81

Рекомендовано до друку рішенням науково-методичної ради факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології від 27.03.2024 р., протокол № 3

Укладач:

О. І. Юлевич – доцент кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету, канд. техн. наук, доцент

Рецензенти:

С. С. Крамаренко – доктор. біол. наук, професор, професор кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету

О. І. Петрова – канд. с.-г. наук, доцент, завідувачка кафедри технології переробки продукції тваринництва та харчових технологій Миколаївського національного аграрного університету

П81 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.

У курсі викладено класичні та сучасні методи і прийоми біотехнологічних робіт з мікроорганізмами-продуцентами, що використовуються у промисловій біотехнології. Описано методи отримання чистих і накопичувальних культур, культивування аеробних та анаеробних мікроорганізмів, вивчення фізіолого-біохімічних властивостей мікроорганізмів-продуцентів промислово важливих речовин, дослідження особливостей росту мікроорганізмів в періодичній і безперервній культурі. Розглянуто процеси промислового отримання біологічно-активних речовин, продуктів бродильного та молочнокислого виробництва. Показано можливості і переваги використання на виробництві результатів практичного поєднання фундаментальних та прикладних досліджень у промисловій біотехнології.

УДК 606-021.58

ЗМІСТ

1.	Загальні відомості щодо напрямів біотехнології	4
2.	Біооб'єкти та методи їх вдосконалення	12
3.	Стадії біотехнологічного виробництва	29
4.	Підготовка та зберігання продуцентів	36
5.	Особливості культивування мікроорганізмів	43
6.	Виробничий етап біотехнологічного процесу	51
7.	Типи ферменційних процесів	60
8.	Завершальний етап біотехнологічного виробництва	69
9.	Виробництво мікробіального білка	81
10.	Отримання амінокислот	91
11.	Мікробіологічний синтез вітамінів	101
12.	Виробництво лимонної та оцтової кислоти	108
13.	Виробництво антибіотиків	117
14.	Біотехнологічні особливості отримання молочнокислих продуктів	123
15.	Біотехнологія продуктів з сировини рослинного походження.	131
16.	Імобілізація ферментів та клітин	140
17.	Застосування іммобілізованих ферментів і клітин	151
	Список використаних джерел	158

ЛЕКЦІЯ 1

Загальні відомості щодо напрямів біотехнології

План

1. Визначення біотехнології
2. Мета та завдання біотехнології
3. Біотехнологічні основи високих технологій
4. Кольорова класифікація біотехнологій

Біотехнологія належить до міждисциплінарних галузей. Вона виникла на базі біологічних, хімічних і технічних наук. Увібравши результати досліджень вищеназваних наук, біотехнологія стала символом розвитку суспільства.

Сучасне визначення «біотехнологія» – це сукупність промислових методів, які використовують живі організми, клітини, тканини, продукти їх метаболізму та біологічні процеси для виробництва цінних для народного господарства продуктів.

У біотехнології використовуються як *загальні, так й специфічні методи.*

До *специфічних* належать: глибинне культивування біооб'єктів у періодичному, напівбезперервному або безперервному режимах; вирощування клітин рослинних та тваринних тканин в особливих умовах. Наприклад, вирощування бактерій та грибів у спеціальних ферментерах для отримання антибіотиків, ферментів, органічних кислот, деяких вітамінів; вирощування клітин людини для отримання інтерферону білка.

Інші методи, що використовуються в біотехнології, є *загальними* з методами мікробіології, біохімії, біоінженерії, органічної хімії та ін.

Особливо слід виділити методи клітинної та генної інженерії, коли в експериментальних умовах вдається створювати клітини із свідомо відомими властивостями. Ці методи стали основою сучасної біотехнології.

Біотехнологія як наука може розглядатися у двох тимчасових та сутнісних вимірах: традиційному, класичному та сучасному. У традиційному, класичному сенсі біотехнологію можна визначити як науку про методи та технології виробництва, транспортування, зберігання та переробки сільськогосподарської та іншої продукції з використанням звичайних, (природних та селекційних) рослин, тварин та мікроорганізмів, у природних та штучних умовах.

Найновіша біотехнологія (біоінженерія) – це наука про генно-інженерні та клітинні методи та технології створення та використання генетично трансформованих (модифікованих) рослин, тварин та мікроорганізмів з метою інтенсифікації виробництва та отримання нових видів продуктів різного призначення.

Вищим досягненням новітньої біотехнології є генетична трансформація, перенесення чужорідних (природних чи штучно створених) донорських генів у

клітини-реципієнти рослин, тварин та мікроорганізмів, отримання трансгенних організмів із новими чи посиленими властивостями та ознаками.

Мета біотехнологічних досліджень – підвищення ефективності виробництва та пошук біологічних систем, за допомогою яких можна отримати цільовий продукт. Тобто центральною проблемою біотехнології залишається інтенсифікація біологічних процесів як за рахунок підвищення потенціалу біологічних агентів та їх систем, так і за рахунок удосконалення обладнання, застосування біокатализаторів (іммобілізованих ферментів та клітин) у медицині, харчовій промисловості, сільському господарстві та охороні та відновленні навколишнього середовища.

Завдання біотехнології

Першочерговими завданнями, що стоять перед біотехнологією, є дослідження в галузі розробки та одержання:

- нових біологічно активних речовин та лікарських препаратів для медицини (інтерферонів, інсуліну, гормону росту людини, моноклональних антитіл і т. і.), що підвищують якість життя людей і дозволяють здійснювати ранню діагностику та лікування тяжких захворювань – серцево-судинних, злоякісних, спадкових, інфекційних, у тому числі вірусних;
- мікробіологічних засобів захисту рослин від хвороб та шкідників;
- бактеріальних добрив та регуляторів росту рослин, підвищення родючості ґрунтів;
- нових, із заданими властивостями, високопродуктивних та стійких до несприятливих факторів зовнішнього середовища сортів та гібридів сільськогосподарських рослин, отриманих методами генетичної та клітинної інженерії;
- цінних кормових добавок та біологічно активних речовин (кормового білка, амінокислот, ферментів, вітамінів, ветеринарних препаратів та ін.), необхідних для підвищення продуктивності тваринництва;
- нових методів біоінженерії для ефективної профілактики, діагностики та терапії основних хвороб сільськогосподарських тварин;
- нових технологій отримання господарсько-цінних продуктів для використання у харчовій, хімічній, мікробіологічній та інших галузях промисловості;
- технологій глибокої та ефективної переробки сільськогосподарських, промислових та побутових відходів;
- використання стічних вод та газоповітряних викидів для отримання біогазу та високоякісних добрив;
- виробництва дешевих та ефективних енергоносіїв (біопалива).

Створені на основі теоретичного матеріалу багатьох наук біотехнологічні розробки позитивно впливають на подальший розвиток різних промислових галузей.

Біотехнологія здатна зробити вагомий внесок у комплексне вирішення проблем, що виникають у різних галузях промисловості й сільського господарства, охорони здоров'я та науки. Упровадження в господарську практику ефективних біотехнологічних процесів на основі

екологічно безпечних маловідходних технологій зазвичай дає високі економічні результати.

В наш час, загалом, біотехнологія розвивається за такими основними напрямками:

- біотехнологія та медицина (включаючи отримання лікарських препаратів, засобів діагностики та реактивів);
- біотехнологія харчових продуктів;
- біотехнологія у сільському господарстві (отримання засобів захисту рослин, стимуляторів урожайності, виведення високопродуктивних порід у тваринництві, ефективна вакцинація);
- біосинтез препаратів та продуктів для промислового та побутового використання;
- біотехнологія захисту та відновлення навколишнього середовища (вилуговування та концентрування металів, деградацію токсичних відходів та збільшення видобутку викопної сировини);
- біоенергетика;
- біогеотехнологія.

В наш час розроблені способи отримання понад 1000 найменувань продуктів біотехнологічними способами. Всі галузі, в яких може бути використана біотехнологія, перерахувати практично неможливо.

Розуміння молекулярних основ біологічних процесів дає можливість значно скоротити витрати на розробку та підготовку виробництва певного продукту, а також підвищити його якість. Наприклад, сільськогосподарські біотехнологічні компанії, що створюють стійкі до комах сорти рослин, можуть вимірювати кількість захисного білка в клітинній культурі та не витрачати ресурси на вирощування самих рослин; фармакологічні компанії можуть використовувати клітинні культури та мікрочіпи для перевірки безпеки та ефективності препаратів, а також для виявлення можливих побічних ефектів на ранніх стадіях одержання лікарських засобів.

Генетично модифіковані тварини, в організмах яких відбуваються процеси, що відображають фізіологію різних людських захворювань, забезпечують вчених цілком адекватними моделями для перевірки дії тієї чи іншої речовини на організм. Це також дозволяє компаніям виявляти найбільш безпечні та ефективні препарати на ранніх стадіях розробки.

Застосування біотехнологічних прийомів може підвищити прибутковість виробництва за рахунок скорочення процесу отримання продукту. Все це свідчить про важливе значення біотехнології та широкі можливості її застосування в різних галузях народного господарства.

Найпріоритетніші напрями біотехнології

1. Підвищення безпеки біотехнологічного виробництва для людини та навколишнього середовища. Потрібно створення таких робочих систем, які функціонуватимуть лише за строго контрольованих умов.

2. Зниження частки відходів виробничої діяльності. Відходами виробництва називаються його побічні продукти, які можуть використовуватися людиною чи іншими компонентами біосфери і застосування

яких нерентабельне чи пов'язане з якимось ризиком. Такі відходи накопичуються у межах виробничих приміщень (територій) чи викидаються у довкілля.

3. Зниження енергетичних витрат за виробництво продукту, тобто використання енергозберігаючих технологій. Принципове вирішення цієї проблеми можливе насамперед за рахунок використання поновлюваних джерел енергії.

4. Розробка нових препаратів для медицини. В даний час ведуться активні дослідження в галузі медицини: створюються різні типи нових препаратів – цільові та індивідуальні.

Біотехнологічні основи високих технологій

Існує декілька типів біотехнологій: технології низького та високого рівня, екстенсивні та інтенсивні, безвідходні, безпечні, ресурсо- та енергозберігаючі, трудомісткі, наукомісткі, проривні. Сучасні біотехнології різних напрямів та різних рівнів нерозривно пов'язані між собою в єдину науково-виробничу систему.

Технології низького рівня – це технології традиційні, певною мірою застарілі. До них належать технології біологічної очистки стічних вод, отримання біопалива, деякі види мікробіологічного синтезу. Вони характеризуються низькою наукоємністю, тобто базуються на використанні робочих систем, отриманих методами традиційної селекції. Такі технології широко використовуються у традиційному сільськогосподарському виробництві, зокрема у рослинництві. Технології низького рівня з мінімальними витратами матеріальних ресурсів, енергії та людської праці називають *екстенсивними* (наприклад, підвищення родючості ґрунтів шляхом вивезення на поля гною та торфу, заорювання пожнивних залишків та/або сидератів – спеціально вирощених бобових рослин).

Найефективнішими є *інтенсивні технології низького рівня*, і в першу чергу, технології впровадження нових сортів рослин, порід тварин і штамів мікроорганізмів. Якість сортів (порід, штамів) визначається їх підвищеною продуктивністю при збільшенні витрат людської праці, сировинних та енергетичних ресурсів, дедалі активнішому впровадженні засобів механізації, автоматизації та хімізації.

Проривні, принципово нові технології можуть бути небезпечними для людини та навколишнього середовища, оскільки наслідки їх застосування непередбачувані. Впровадження проривних технологій, як правило, супроводжується появою нових видів продуктів та нових видів відходів. Будь-який новий харчовий чи промисловий продукт повинен проходити всебічну перевірку на алергенність, канцерогенність та мутагенність, на сумісність з іншими продуктами, на безпеку для довкілля тощо.

На основі проривних технологій створюються *біотехнології високого рівня* (або високі біотехнології). На противагу технологіям низького рівня високі біотехнології характеризуються високою наукомісткістю, тобто використанням систем, отриманих найсучаснішими методами генетики,

мікробіології, цитології, екології, молекулярної біології. Високі біотехнології також поділяють на екстенсивні та інтенсивні.

Екстенсивні високі біотехнології характеризуються відносно низькими витратами сировинних та енергетичних ресурсів. До технологій подібного типу відноситься більшість мікробіологічних виробництв, технологічних процесів з підготовки та переробки промислової сировини, а також частина виробництва на основі тканинно-клітинних культур. Ці технології частково інтенсифікуються з допомогою комп'ютеризації виробництва.

Інтенсивні високі біотехнології (на противагу екстенсивним) реалізуються із залученням фахівців найвищої кваліфікації, з використанням унікального обладнання та найсучасніших матеріалів. Ці біотехнології застосовують у медицині, а також для створення організмів із заздалегідь заданими властивостями. Слід зазначити, що інтенсифікація високих технологій, на відміну від інтенсифікації технологій низького рівня, полягає у підвищенні якості ресурсного та інформаційного забезпечення.

Технології різних рівнів нерозривно пов'язані між собою: з одного боку, високі технології базуються на технологіях низького рівня, для їх здійснення потрібний певний ресурсний, енергетичний та інформаційний фундамент, з іншого – досягнення високих технологій використовуються на нижчих рівнях біотехнологічних виробництв.

Високі технології є найбільшим досягненням людського розуму. Однак за низкою параметрів вони не тільки не перевершують технології низького рівня, але навіть поступаються їм. Зокрема, високі технології вимагають все більших вкладень усіх видів ресурсів, вони не вирішують проблеми отримання екологічно чистої продукції, а саме біотехнологічне виробництво може становити загрозу для людини та довкілля.

Кольорова класифікація біотехнологій. Оскільки біотехнологія використовується в різних галузях промисловості і зачіпає багато сфер життя людини, загальнопоширеною та зручною у використанні є міжнародна класифікація біотехнологій за кольорами відповідно до об'єктів діяльності:

- «червона» біотехнологія – (медична біотехнологія, біофармацевтика), пов'язана із забезпеченням здоров'я людини та потенційною корекцією її геному, а також із виробництвом біофармацевтичних препаратів (протеїнів, ферментів, антитіл). Виробництво біотехнологічними методами діагностиків та лікарських препаратів з використанням технологій клітинної та генетичної інженерії.

- «зелена» біотехнологія – використання біотехнологічних процесів та методів у лісовій, целюлозно-паперовій промисловості, а також у сільському господарстві та рибництві (сільськогосподарська біотехнологія, агробіотехнологія, також іноді включає екологічну біотехнологію, біоенергетику), спрямована на розробку та створення генетично модифікованих (ГМ) рослин, стійких до біотичних та абіотичних стресів, визначає сучасні методи ведення сільського та лісового господарства. Розробка біотехнологічних методів та препаратів для боротьби зі шкідниками та збудниками хвороб

культурних рослин та свійських тварин, створення біодобрив, підвищення продуктивності рослин із використанням методів генетичної інженерії.

Зелена біотехнологія застосовується у сільському господарстві та продовольстві, але також інвестує в інші галузі. За допомогою зелених технологій дослідники сподіваються вирішити проблеми сільського господарства, забезпечуючи виробництво продуктів харчування, енергії та біоматеріалів, зберігаючи при цьому довкілля.

- «біла» біотехнологія – (промислова біотехнологія, біоінженерія, також іноді включає молекулярну та клітинну промислову біотехнологію), поєднує виробництво біопалива, біотехнології у хімічній та нафтопереробній промисловості. До неї входять виробництво продуктів, що раніше вироблялися хімічною промисловістю, індустриальне використання біотехнологічних процесів для виробництва спирту, вітамінів, амінокислот та ін. Вона об'єднує виробництво біопалива, біотехнології у харчовій, хімічній та нафтопереробній промисловості.

- «сіра» біотехнологія – (класична ферментація і технології біопроцесів, технічна, промислова біотехнологія, також включає екологічну біотехнологію, пов'язана з природоохоронною діяльністю). «Сіра» біотехнологія займається розробкою технологій та препаратів для захисту навколишнього середовища з використанням біологічних агентів та біологічних процесів. Включає процеси біоремедіації ґрунтів (процес використання бактерій та рослин для очищення ґрунтів від небезпечних та потенційно небезпечних речовин), очищення стоків та газоповітряних викидів, утилізації промислових відходів, деградації токсикантів.

- «синя» біотехнологія (аквабіотехнологія) – пов'язана з використанням морських організмів та сировинних ресурсів. «Синя» (морська) біотехнологія переважно орієнтована на ефективне застосування ресурсів Світового океану, морської біоти для отримання харчових, технічних, біологічно активних та лікарських речовин.

- «жовта» біотехнологія (харчова біотехнологія) дозволила замінити традиційні хімічні методи виробництва харчових добавок мікробним синтезом, за допомогою якого отримують ароматизатори й посилювачі смаку (глутамат), замінники вуглеводів (сахарози), глюкозо-фруктозні сиропи, ферментні препарати для підвищення поживної цінності харчових продуктів, барвники, органічні кислоти (молочну, лимонну, яблучну, глюконову, ітаконову, фумарову), амінокислоти (лізин, аспарагінову кислоту), харчові консерванти (бензойну кислоту) та загусники, вітаміни тощо. Сьогодні тривають дослідження з використання біомаси одноклітинних організмів (БОО), мета яких – виготовлення харчових добавок (зокрема білка одноклітинних). Досить успішно розвивається виробництво грибних білків (мікро- та макроміцетів), білків рослинних організмів (водоростей, соєвих білків та ін.).

- «коричнева» біотехнологія (біотехнологія пустель та посушливих зон). Проведення фундаментальних та прикладних досліджень у галузі вивчення систем регуляції та управління адаптаційними процесами пустельних рослин, а

також вплив зовнішніх факторів на процеси для розробки методів експрес-діагностики стійкості рослин.

Проведення наукових досліджень щодо вирощування пустельних посухо- та солестійких видів рослин, оптимізація умов культивування рослин *in vitro*. Прискорене розмноження перспективних видів культур стійких до посухи. Збереження цінного генетичного матеріалу *in vitro*. Одержання нового генетичного матеріалу на основі біологічних та хімічних методів.

- «фіолетова» біотехнологія (патенти, публікації, відкриття, права на інтелектуальну власність). Враховуючи потенціал розвитку біотехнології для довкілля та зокрема корисність цієї технології у сфері охорони здоров'я, боротьбі з епідеміями та епідеміологічними хворобами, у сфері боротьби з подоланням голоду у світі, патентна система повинна бути засобом для сприяння дослідженням та застосуванню таких процесів, відповідно до Рекомендацій ФАО (*Food and Agriculture Organization*, ФАО – організація ООН, основним завданням якої є боротьба з голодом).

У всьому світі налічується 1750 окремих генних банків, 130 з яких зберігають більше 10 000 зразків кожен, загальна кількість колекційних зразків, що зберігаються в генбанках світу досягла 7,4 мільйона. З яких 25-30% є оригінальними, інші ж являють собою дублетні (клоновані) зразки. Наприклад, на сьогодні, в генбанках генетична різноманітність культури пшениці і рису представлена повністю.

- «золота» біотехнологія (нанобіотехнологія, біоінформатика). *Нанобіотехнологія* – це розділ, присвячений вивченню впливу наночастинок на живі системи, а також розробці способів моделювання та практичного застосування біологічних наноструктур, наноявищ та нанопроцесів в експериментальній біології, медицині, екології, сільському господарстві та інших галузях економіки.

Біоінформатика – це галузь науки, що здійснює дослідження з біохімії, молекулярної біології та біотехнології за допомогою обчислювальної, комп'ютерної техніки. Біоінформатика – це шлях від гена до ліків чи біопрепарату через структуру макромолекули. Якщо є геном, його можна розмітити і знайти межі гена не за допомогою клонування окремих генів, а за допомогою певних комп'ютерних програм. Якщо є послідовність білка, можна перейти до просторової структури та функції. Якщо отримано нову послідовність від ДНК до білка, її можна порівняти з існуючими послідовностями в банках даних. Якщо існують гомологи – можна, з певним ступенем точності, передбачити структуру та функцію білка.

- «чорна» біотехнологія (біотероризм, біологічна зброя, біозлочини, протиурожайні дії). Можливість застосування біологічної зброї в терористичних цілях або в цілях ведення «прихованої біологічної війни» визначається унікальним поєднанням властивостей цього виду зброї, можливостями її застосування не лише проти людини, а й проти тварин та рослин, що становлять основу для одержання продуктів харчування людини.

Інтенсивний розвиток біотехнології, генетичної та клітинної інженерії протягом останніх десятиліть суттєво змінив погляди на можливість отримання

нових видів біологічної зброї, що й зумовлює її особливу загрозу світовій стабільності, а може й існуванню людства. Стратегія використання біологічної зброї полягає в тому, що вона може бути застосована безпосередньо під час воєнних дій та терористами. Вона може бути використана як проти армії, так і цивільного населення.

Такий поділ біотехнології по кольорах є досить умовним, оскільки на практиці не завжди відображає специфіку її галузей. До того ж існують біотехнологічні дослідження, що поєднують суміжні напрями, класифікація, що використовується в різних країнах, також має свої особливості. Так, часто до «білої» біотехнології відносять лише промислову біотехнологію, яка використовує рекомбінантні продуценти, а класичні ферментаційні та інші біопроцеси – до «сірої» біотехнології. Тобто «сіра» та «біла» біотехнології не просто означають екологічну та промислову біотехнології відповідно, а робиться акцент на тому, що «біла» біотехнологія – це все, що базується на дослідженнях генів, а «сіра» – це все біотехнології, пов'язані з ферментами та класичними біопроцесами.

Іноді до «зеленої» біотехнології відносять екологічну біотехнологію та такі гілки біотехнології, як геомікробіологія, отримання біопалива, біодобрив. В галузі зеленої, сільськогосподарської біотехнології предметом діяльності може бути рослинництво, тваринництво, ветеринарія.

Відповідно до прийнятої класифікації біотехнологічних напрямів понад 60% світового виробництва належить до продукції «червоної» біотехнології (біофармацевтичні препарати та біомедицина), 12% – до «зеленої» (агрохарчова продукція), решта – біоматеріали промислового призначення («біла» біотехнологія).

Завдяки сучасним біотехнологіям у світі постійно зростає кількість нових продуктів і послуг у галузях фармацевтики, сільського господарства, харчових добавок, виробництва енергії, очищення стічних вод і навколишнього середовища та ін.

ЛЕКЦІЯ 2

Біооб'єкти та методи їх вдосконалення

План

1. Характеристика біооб'єктів, що застосовують у біотехнологічному виробництві
2. Морфологічні особливості біопродуцентів
3. Прокаріотичні організми, що використовуються в біотехнології
4. Еукаріотичні організми, що використовуються в біотехнології
5. Вдосконалення біооб'єктів методами мутагенезу, селекції, клітинної та генної інженерії
6. Вдосконалення біооб'єктів методами клітинної інженерії

У більшості випадків найбільш ефективною, стабільною та зручною формою для проведення біотехнологічних процесів є цілісні організми, внаслідок чого в біотехнології широко використовуються мікробіологічні процеси. Звичайно, це не виключає використання і вищих організмів (зокрема культур рослинних і тваринних клітин).

Жива клітина характеризується унікальною організаційною структурою, скорегованістю процесів, точністю результатів, економічністю та раціональністю, чим перевершує будь-який завод. Тому біотехнологія використовує мікро- та макроорганізми (біооб'єкти), які у процесі життєдіяльності виробляють природнім шляхом необхідні нам речовини – вітаміни, ферменти, амінокислоти, органічні кислоти, спирти, антибіотики.

Характер біологічної системи (мікроорганізми, клітинні лінії комах, рослин та ссавців, багатоклітинні організми) винятково важливі для біотехнологічного процесу. У багатьох випадках саме генетично модифікована біологічна одиниця, що самовідтворюється (мікроорганізм, вірус, рослина або тварина) є кінцевим комерційним продуктом.

Біооб'єкт – це специфічний обов'язковий елемент біотехнологічного виробництва. Ті з біооб'єктів, що завдяки власним функціям здійснюють біосинтез цільового продукту, називаються продуцентами. Біооб'єктами-*продуцентами* в біотехнології можуть бути як самі організми (рослини, тварини, мікроорганізми), так і їхні клітини, тканини, а також структурні компоненти: біомолекули, органели й продукти метаболізму.

У сучасному біотехнологічному виробництві серед відомих біооб'єктів домінують мікробні клітини прокаріотів й еукаріотів. Ці клітини здатні продукувати первинні (моно- й дисахариди, амінокислоти, азотисті основи, ферменти, коферменти, тощо) та вторинні метаболіти (антибіотики, алкалоїди, вітаміни, органічні кислоти та інші біологічно активні речовини). Їхня функція дуже важлива в складному ланцюзі біотехнологічного процесу.

Мікроорганізми як об'єкти біотехнології належать до трьох надцарств: без'ядерні (акаріоти), доядерні (прокаріоти), ядерні (еукаріоти), та п'яти царств: віруси, бактерії (еубактерії, ціанобактерії, архебактерії), рослини, тварини, гриби.

У біотехнологічних процесах найчастіше використовують бактерії, найпростіші, мікроскопічні водорості, гриби, віруси, бактеріофаги. Світ мікроорганізмів характеризується великою різноманітністю форм, яким властиві малі розміри, що становлять від десятих часток до десятків, сотень мікрометрів. Більшість з них одноклітинні, але зустрічаються й багатоклітинні, у яких відсутня диференціація на органи й тканини. Природне середовище існування мікроорганізмів – це ґрунт, вода, повітря та організми людини, тварин, рослин.

Науці відомо понад 100 тисяч різних видів мікроорганізмів, але людина для своїх потреб використовує не більше 150 видів, до яких належать кілька тисяч *штамів* (штам – чисті культури мікроорганізмів одного і того ж виду, виділені з різних природних середовищ або з одного середовища, але у різний час. Штами одного виду мають однакові властивості, але відрізняються за окремими ознаками.). Провідна роль мікроорганізмів як об'єктів-продуцентів у біотехнології забезпечується завдяки таким властивостям:

- малі розміри (морфологічні особливості);
- активність (висока швидкість росту на живильних середовищах);
- простота генома;
- «гнучкість» обміну речовин;
- добра адаптаційна здатність до умов зовнішнього середовища.

У промисловій біотехнології застосовують 3 види *штамів*: 1) природні штами, покращені природним та штучним відбором (при виробництві мікробної біомаси); 2) штами, одержані в результаті індукованого мутагенезу; 3) генно-інженерні штами (мають найвищу генетичну нестабільність).

Промислові штами повинні задовольняти такі вимоги:

1. Нешкідливість для споживача та обслуговуючого персоналу.
2. Висока швидкість накопичення біомаси та цільового продукту (БАР) при економічному споживанні живильного середовища.
3. Спрямована біосинтетична активність при мінімальному утворенні побічних продуктів.
4. Генетичні однорідність та стабільність щодо субстратів та умов культивування.
5. Відсутність токсичних речовин у цільовому продукті та промислових стоках.
6. Стійкість до сторонньої мікрофлори.
7. Здатність рости на дешевих та доступних субстратах, відходах харчової та хімічної промисловості за високої щільності клітин.

Тільки за сукупністю цих та інших властивостей можна оцінити корисність та рентабельність продуцента. У багатьох біотехнологічних процесах використовується обмежена кількість мікроорганізмів, які класифікуються як GRAS («*Generally Recognized As Safe*» зазвичай вважаються

безпечними). До таких мікроорганізмів відносять в першу чергу кишкову паличку (*Escherichia coli*), сінну паличку (*Bacillus subtilis*) та пекарські дріжджі (*Saccharomyces cerevisiae*), а також бактерії *Bac. amyloliquefaciens*, інші види бацил та лактобацил, види *Streptomyces*. Сюди також відносять види грибів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* і дріжджів *Saccharomyces* та ін.

Мікробіологічна промисловість сьогодні використовує тисячі штамів із сотень видів мікроорганізмів, які первинно були виділені з природних джерел на підставі їх корисних властивостей, а потім (здебільшого) покращені за допомогою різних методів. У зв'язку з розширенням виробництва та асортименту продукції до мікробіологічної промисловості залучаються все нові і нові представники світу мікробів.

Бактерії біохімічно універсальні тому, що можуть засвоювати найрізноманітніші поживні речовини і навіть здатні вибирати найкращі органічні сполуки із суміші, тому можуть пристосовуватися до різноманітних умов існування. Наприклад, *Pseudomonas multivorans* як джерело вуглецю може використовувати 90 речовин, у тому числі вуглеводи та їх похідні, жирні кислоти, спирти, амінокислоти і навіть циклічні вуглеводні (фенол). Залежно від ставлення до O_2 бактерії прийнято розподіляти на облигатні (обов'язковий) аероби, факультативні (необов'язковий) анаероби, аеротолерантні анаероби. Більшість продуцентів у мікробній біотехнології є облигатними аеробами, тому культивування їх протікає при постійному припливі O_2 , деякі продуценти ростуть за низького вмісту O_2 (2-10%), їх називають мікроаерофілами, а умови, в яких їх культивують, – мікроаеробними. До факультативних анаеробів належать деякі представники роду *Bacillus*, *Escherichia*, до аеротолерантних анаеробів – метаноутворюючі бактерії. Більшість бактерій культивують на складних органічних середовищах, що містять 20 факторів росту (вітаміни, амінокислоти, пурини, піримідини). Продуценти, які потребують факторів росту, називають ауксотрофами, штамми, які не виявляють цієї потреби, – прототрофами. Молочнокислі бактерії можна зарахувати до ауксотрофів. Багато продуцентів можуть рости на синтетичних середовищах, що містять лише одну органічну речовину в якості джерела вуглецю. Деякі продуценти використовують як джерело енергії метан, метанол, метиловані аміни. У мікробній біотехнології широко використовується здатність низки бактерій здійснювати життєдіяльність внаслідок окислення молекулярного водню, сірководню, амонію, нітратів, солей двовалентного заліза та деяких інших неорганічних сполук. Для багатьох продуцентів характерний лабільний метаболізм, що виявляється у здатності використовувати велику кількість різних сполук вуглецю, азоту та інших елементів, а також перемикання з одного типу живлення на інший.

Морфологічні особливості біопродуцентів.

Прокаріоти – це доядерні одноклітинні організми, які не мають сформованого ядра, оскільки в них ядерний матеріал не відділений від цитоплазми ядерною оболонкою. Серед прокаріотичних організмів поширені мікроформи, до яких відносяться бактерії та ціанобактерії (синьо-зелені водорості). Незважаючи на малі розміри, досить просту будову спадкового

матеріалу, обмежену кількість білкових молекул, ферментативних реакцій, прокаріоти своєю функціональною активністю не поступаються клітинам багатоклітинних еукаріотичних організмів, а тому мають значний практичний інтерес для біотехнологів.

Структурними елементами прокаріотичної клітини, які відрізняють її від еукаріотичної, є клітинна стінка, що побудована з муреїну (пептидоглікану) або целюлози, прості й складні цитоплазматичні мембранні утворення, рибосоми; різноманітні клітинні включення (глікоген, сірка, волютин, ліпідні краплі, гранульоза, полі- β -оксибутират та ін.); у таких клітинах немає мітохондрій, апарату Гольджі, ендоплазматичного ретикулуму, центріолей. Прокаріотична клітина не має ядерної мембрани. Ядерним еквівалентом виступає нуклеоїд – кільцева замкнена молекула ДНК, яка міститься в ущільненому шарі цитоплазми.

Серед структур бактеріальної клітини розрізняють: основні (обов'язкові) та неосновні (необов'язкові) структури. Основні – це клітинна стінка, цитоплазматична мембрана, цитоплазма з різними включеннями та нуклеоїд. Неосновні, які присутні не у всіх бактерій – джгутики, слизова капсула, пілі (фімбрії, ворсинки), фотосинтезуючі мембрани, мезосоми.

Еукаріотичні організми мають клітини із сформованим ядром та високоорганізованими органелами. До мікроорганізмів еукаріотів відносяться одноклітинні та багатоклітинні організми, зокрема найпростіші, гриби, водорості (крім синьо-зелених). Об'єктами біотехнології серед еукаріотів можуть бути також макроорганізми, серед яких нижчі (водорості, лишайники) та вищі рослини (папоротеподібні, покритонасінні), багатоклітинні тварини (черв'яки), гриби-макрOMICETI (печериця, глина, опеньки та ін.).

До *акаріотичних організмів* або наноорганізмів відносяться неклітинні форми життя, тобто *віруси, бактеріофаги*. В основі їх структури – нуклеїнові кислоти (ДНК або РНК) та білки, які ковалентне не зв'язані між собою.

Віруси – найдрібніші мікроорганізми, які не мають клітинної будови, містять тільки один тип нуклеїнових кислот: або молекулу РНК – *рибовіруси* (відрізняються від *ретровірусів* тим, що ретровіруси мають РНК геном, який реплікують через ДНК як проміжну ланку. Ретровіруси залежать від ферменту зворотної транскриптази для здійснення зворотної транскрипції свого геному з РНК в ДНК), або молекулу ДНК – *дезоксивіруси* (мають приблизно 10^3 нуклеотидів або пар нуклеотидів). Віруси належать до облігатних паразитів. Вони характеризуються дуже малими розмірами (їх діаметр дорівнює 20-300 нм). Нуклеїнові кислоти у вірусах мають різні форми, це може бути одноланцюгова або лінійна молекула, дволанцюгова кільцева чи лінійна молекула, або окремі фрагменти молекули нуклеїнової кислоти.

Молекули нуклеїнових кислот містяться в білковій оболонці, яка має назву капсид. Віруси не здатні до росту й бінарного поділу. Позаклітинна форма вірусу називається віріоном. Розмноження вірусу (репродукція) – це чітко організований цикл, у якому відбувається синтез нових молекул білків, а

також утворюється велика кількість копій вірусної ДНК (вірусних геномів), що зумовлює формування зрілих вірусних частинок. Саме після проникнення вірусів у клітини живого організму їх нуклеїнові кислоти швидко вбудовуються в ДНК клітин-хазяїна, примушуючи їх утворювати білки та нуклеїнові кислоти вірусних частинок, що пригнічує біосинтез здорових клітин.

Віруси паразитують практично на всіх організмах – бактеріях, грибах, рослинах і тваринах. Понад 75% усіх інфекційних захворювань припадає саме на вірусні хвороби.

Особлива група вірусів паразитує на бактеріях. Їх називають *бактеріофагами*.

Бактеріофаги використовують для діагностики, профілактики й лікування бактеріальних інфекцій: стафілокової, стрептокової, дизентерійної та ін. Механізм дії фагів характеризується явищем лізису, тобто порушення структури клітин бактерій.

Прокаріотичні організми, що використовуються в біотехнології

Бактерії (Eubacteria) – перші виявлені людиною живі мікроскопічні організми (їхній діаметр становить 0,2-10,0 мкм), що виникли приблизно 3,5 мільярдів років тому. Вони мають різну форму: кулясту (коки), паличкоподібну (бактерії, бацили), звивисту (вібріони, спірили, спірохети).

Бактерії мають не тільки ядерний еквівалент – нуклеоїд, але й додатковий периферійний ДНК-вмісний елемент – плазмід – маленьку кільцеву структуру, що складається з кількох генів, здатних забезпечити кодування певних ферментів клітини. Плазмід використовують у біотехнології як вектор (транспортний засіб) для перенесення генів у генно-інженерних технологіях.

Бактерії належать до так званих гетеротрофів, тобто живляться готовими органічними речовинами, розкладаючи їх на більш прості, одержують при цьому енергію для свого існування. Деякі з них використовують енергію, що утворюється внаслідок окиснення мінеральних речовин. Лише невелика група цих організмів (зелені та пурпурні сіркобактерії) мають у своєму складі бактеріохлорофіл і здатні синтезувати органічні речовини, поглинаючи сонячну енергію.

Одні групи бактерій – *аероби* – вимагають для свого існування обов'язкову наявність кисню, інші – *анаероби* – розвиваються без нього, причому кисень для них шкідливий. Є проміжні форми бактерій – факультативні аероби, які можуть розвиватися як при наявності, так і за відсутності кисню.

Бактерії, що живляться за рахунок мертвої органічної речовини, називаються *сапрофітами*, а ті, що існують за рахунок живих організмів – *паразитами*.

Бактерії забезпечують процеси азотфіксації, амоніфікації, нітрифікації, денітрифікації, бродіння, гниття тощо. Більшість бактерій – це корисні для людини й довкілля організми, але серед них чимало патогенних, які можуть викликати захворювання людей, тварин і рослин. До таких належать небезпечні інфекції: туберкульоз, холера, пневмонія, гонорея, дифтерія, сифіліс та ін. До речі, в біотехнологічних процесах можуть використовуватися не тільки корисні

види бактерій (азотфіксувальні, молочнокислі, оцтовокислі, пропіонові, метанотвірні, кишкова й сінна палички), але й патогенні.

Особливого значення як продуценти мають *архебактерії*, давні представники прокаріотів. *Архебактерії* були відкриті недавно (у 70 роки минулого століття). Від інших видів бактерій їх відрізняє стійкість до екстремальних умов. Малі розміри бактерій не дозволяють їм накопичувати в собі резерв продуктів метаболізму, ферментів, тому за певних умов вони виділяють їх назовні. Завдяки мікробному синтезу бактерії продукують ферменти, гормони, вітаміни (С, В₂, В₁₂, провітамін А – β -каротин), антибіотики, кормовий білок на різних субстратах, біогаз та інші корисні для людини продукти.

Вони живуть у середовищах з екстремальними умовами (високі концентрації неорганічних речовин, підвищені температури). Серед архебактерій галобактерії мають великий інтерес для біотехнології. Вони ростуть у середовищі, що містить 20-30% NaCl (концентрований розчин, Мертве море), живуть на сухій солоній рибі, шкіряних виробках, мають білки, нормальне функціонування яких відбувається лише за високих концентрацій NaCl. Це палички, коки, квадрати, що містять фотоактивні пігменти бактеріородопсин та галородопсин. Галородопсин здатний перетворювати електромагнітну енергію світла на хімічну енергію. Якщо пурпурові бактерії *Halobacterium* іммобілізувати на носії, то при освітленні можна отримувати електрику та знесолювати морську воду.

У майбутньому припускають за допомогою таких мікроперетворювачів енергії забезпечувати електрикою окремі житла у країнах із високою сонячною радіацією.

Метаногенні бактерії широко вивчаються в біотехнології як спосіб отримання додаткової енергії з субстрату, що відновлюється. Біологічний метаногенез був відомий у Китаї ще у II столітті до н. е. Нині у Китаї працює понад 7 млн. установок із виробництва біогазу. У 1911 році в м. Бірменгемі був побудований завод з анаеробного розкладання стічних вод. Газовий генератор перетворював метан на електрику, забезпечуючи життя цілого міста. Біомасу метаногенних бактерій можна застосовувати як концентрат вітаміну В₁₂ для сільськогосподарських тварин.

Сіркозалежні архебактерії та термоплазми також викликають великий інтерес біотехнологів. Вони живуть у гарячих і кислих водоймах, вулканічних ущелинах. Енергію одержують за рахунок окислення Н₂, S, Fe²⁺, сульфідів металів. Наприклад, *Thermoproteales* живуть при 108°C, (не нижче 80°C), є анаеробми, причому ферменти, синтезовані в їх клітинах, мають високу терморезистентність. Ферменти, які синтезуються термофілами, характеризуються підвищеною стійкістю до нагрівання, деяким окислювачам, детергентам, органічним розчинникам та іншим несприятливим факторам. У той самий час вони мало активні за нормальних температур. Так, протеази одного з представників термофільних мікроорганізмів при 20°C у 100 разів менш активні, ніж при 75°C. Останнє є дуже важливою властивістю для деяких промислових виробництв. Наприклад, широке застосування у генетичної

інженерії для здійснення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) знайшов фермент *Tag*-полімераза з термофільної бактерії *Thermus aquaticus*. Основна перевага термофільних анаеробних археобактерій полягає у наступному: 1. скорочення термінів культивування; 2. можливість обійтися без аерації; 3. зменшення ймовірності зараження.

Ціанобактерії, або синьо-зелені водорості (*Cyanea*) – це автотрофні прокаріоти, що посідають проміжну позицію між бактеріями та рослинами. Їх основним пігментом є хлорофіл а крім того вони також містять каротиноїди. У системі фототрофних мікроорганізмів вони відіграють особливу роль, оскільки здатні до фотосинтезу із виділенням кисню, на відміну від звичайних бактерій.

Ціанобактерії використовують для виробництва біодобрив, так званих «зелених добрив», підсилювачів смаку, а також як джерело білка (наприклад, спіруліна) та ін.

Еукаріотичні організми, що використовуються в біотехнології

Гриби (Fungi) – це велика група еукаріотичних гетеротрофних безхлорофільних організмів. Вегетативне тіло грибів складається із системи розгалужених тонких ниток – гіфів, які утворюють грибницю (міцелій). За структурою міцелію гриби поділяють на вищі й нижчі. У вищих грибів міцелій багатоклітинний, а у нижчих – неклітинний, багатоядерний.

Гриби мають спільні риси як з рослинами, так і з тваринними організмами.

Наприклад, із тваринами їх поєднує наявність у клітинній стінці хітину, а також запасного вуглеводу глікогену, відсутність пластид, гетеротрофний спосіб живлення, потреба у вітамінах. Як і рослини, гриби здатні до необмеженого росту, мають такий самий характер живлення (шляхом всмоктування речовин), вони нерухомі, розмножуються спорами, мають вакуолі. У той же час лише грибам властива міцеліальна будова та, як наслідок, – абсорбційний спосіб харчування (осмотрофія). Для них відомі явища дикаріозису – роздільне знаходження двох ядер в одній клітині, що імітують диплоїдне ядро та здатні до одночасного поділу, а також і гетерокаріозису – знаходження різноякісних ядер в одній клітині. Гриби мають діаметр клітин у 3-5 разів більший, ніж бактерії, і більш стійкі до фагів.

До мікроскопічних грибів – мікроміцетів – відносяться дріжджі, цвілеві гриби (мукор, пеніцил, аспергіл та ін.). Макроскопічні гриби – макроміцети (зокрема базидіоміцети: глива, печериця, білий гриб, лисички та ін.) виступають продуцентами харчового білка. Дослідженнями останніх років було виявлено бактерицидну й протипухлинну активність вищих базидіоміцетів.

Дріжджі – вищі гриби, що втратили здатність утворювати міцелій і перетворилися в результаті на одноклітинні організми. Клітини дріжджів мають овальну, яйцеподібну та еліптичну форму, рідше зустрічаються циліндричні (паличкоподібні), грушоподібні та лимоноподібні дріжджі.

Мікроскопічні гриби використовують як сировину для виробництва амілолітичних, ліполітичних ферментів, вітамінів (β -каротину, вітамінів групи В), харчового білка, антибіотиків. Це активні продуценти ферментів для

виготовлення сирів, кисломолочної продукції. Наприклад, дріжджі широко застосовуються у виробництві етанолу, пива, вина, харчового та кормового білка.

Водорості (Algae) – це нижчі таломні рослини, первинним середовищем існування яких є вода. Здатні до фотосинтезу клітини водоростей, поглинаючи енергію видимого світла, перетворюють її в хімічну енергію фосфатних зв'язків високо енергетичної сполуки аденозінтрифосфату (АТФ). Унаслідок цього в них фіксуються такі речовини як карбон, нітроген, фосфор, котрі у свою чергу входять до складних молекул органічних сполук. Цей процес зумовлює накопичення біомаси цих організмів.

На основі водоростей виготовляють харчові добавки, кормовий білок, мікроелементи (йод, бром), ферменти, органічні кислоти, а також агар-агар – складний полісахарид, здатний до гелеутворення, який застосовують для ущільнення живильних середовищ у мікробіології. Водорості можуть бути джерелом отримання біомаси та біологічно активних речовин у системах життєзабезпечення космічних кораблів, їх можна використовувати для виробництва енергії (одержання гідрогену шляхом фотолізу води), а також як біофільтри в аеротенках для очищення стічної води тощо.

Лишайники (Lichenes) – це симбіотичні організми, у яких поєднуються гриб – гетеротрофний мікобіонт (переважно роду аскоміцетів, іноді базидіоміцетів) й автотрофний фікобіонт, зокрема водорості (частіше зелені, рідко ціанобактерії). Вони являють собою потенційні об'єкти-продуценти для біотехнології.

У біотехнології лишайники можна застосовувати для виробництва натуральних барвників, закріплювачів запахів у парфумах, як продукт харчування, – зокрема як джерело ліхенових кислот, що характерні бактерицидною активністю. Із тайгового лишайника виготовляють антисептичну речовину – уснінову кислоту.

Найпростіші (Protozoa) – це мікроскопічні одноклітинні тварини надцарства еукаріотів (*Eucariotae*), які проживають у воді, ґрунті або паразитують на тілі тварин.

Більшість найпростіших живе у водному середовищі.

Найпростіші входять до складу ґрунтових біоценозів, активних мулів (зооглею), що набули поширення в процесах біологічного очищення водоймищ, стічних вод. В активному мулі найпростіші виконують функції підтримання певної кількості мікроорганізмів. Живлячись бактеріями та плаваючими речовинами, вони також сприяють освітленню води. Ці організми можна використовувати як тест-індикатори якості очищення стоків.

У сільськогосподарській біотехнології з метою вермикультивування ґрунтових субстратів використовують позитивні властивості *кільчастих черв'яків (Annelida)*, здатних швидко нарощувати біомасу, продукувати біогумус, з якого потім виготовляють біогумат (витяжку з біогумусу, що містить комплекс біологічно активних речовин, зокрема фітогормонів). Одними з найбільш відомих представників є дощові черв'яки.

Дощовий черв'як (гнойовий) часто трапляється в купах гною чи компосту. Він переробляє органічну масу на високоефективне добриво (біогумус). Щоб поліпшити позитивні властивості таких організмів, учені вивели високопродуктивну породу, названу каліфорнійським черв'яком (*Eisenia foetida*).

Вищі рослини (Plantae). Вищі рослини від нижчих різняться наявністю органів (це корінь, стебло, лист) і розвинутих тканин. Як об'єкти біотехнології вищі рослини застосовуються в методах клітинної інженерії, для мікророзмноження рослин *in vitro*, мікрокультивування *in vitro*. У біотехнології використовують дуже важливу їхню здатність формувати цілий організм із однієї клітини. В основі цієї функції – явище *тотипотентності*, тобто властивість соматичних рослинних клітин повністю реалізувати власний генетичний потенціал розвитку.

Будь-який вид рослини за певних умов здатен утворювати недиференційовану масу клітин (*калус*), які подвоюються, особливо під впливом фітогормонів. Калусні клітини використовують у біотехнології для мікророзмноження рослин *in vitro*. Клітини рослин *in vitro* зберігають біосинтетичний потенціал і можуть виступати джерелом цінних продуктів клітинного метаболізму. З метою виготовлення сировини для лікарських засобів, барвників, ароматизаторів тощо окрім одержання калусів із експлантів (тобто культури тканин, вирощеної поза організмом) можливе також культивування клітин деяких рослин у суспензійних культурах.

Важливими об'єктами біотехнології були визнані протопласти рослинних клітин (вони позбавлені клітинних стінок). Найчастіше в біотехнологічних процесах використовують представників покритонасінних.

Робота з біооб'єктами рослинного походження дозволяє одержувати трансгенні організми, покращувати якість і підвищувати продуктивність рослин за допомогою методів генної інженерії; виводити нові сорти й гібриди сільськогосподарських та інших рослин методами селекції, використовувати культури ізольованих рослинних тканин для мікророзмноження та оздоровлення посадкового матеріалу, виготовляти цінні речовини рослинного походження.

Клітинні культури людини й тварин (Animalia). Як біологічні системи використовують культуру тканин певного організму. Шматок тканини (людини, ссавця) обробляють протеолітичними ферментами (трипсином), що розщеплюють білки міжклітинного матеріалу. Клітини, що вивільнилися, поміщають у поживне середовище, що містить амінокислоти, антибіотики, вітаміни, солі, глюкозу, фактори росту. За цих умов (розподіл клітин ссавців відбувається приблизно раз на добу) на стінці ємності з культурою утворюється клітинний моношар. Після цього клітини переносять у ємності зі свіжим поживним середовищем. Зазвичай вдається переносити (перевивати, субкультивувати) та підтримувати до 50-100 клітинних генерацій вихідної (первинної) клітинної культури, потім клітини починають втрачати здатність до поділу та гинуть.

Введення диференційованих клітин у культуру й формування з них постійних клітинних ліній, які продукують фізіологічно активні сполуки, викликало певні труднощі. По-перше, спостерігалось припинення розмноження тваринних клітин на штучному живильному середовищі, причому вони втрачали здатність до синтезу специфічного продукту; по-друге, клітини набували властивість злоякісних, а протягом тривалого культивування піддавались каріотипічній та фенотипічній мінливості. У зв'язку з цим, на сьогодні маємо небагато прикладів успішного застосування клітинних культур з біотехнологічною метою. На даний час у промисловому масштабі використовуються лімфобласти людини, які продукують інтерферон; клітини-гібридами, що утворюють моноклональні антитіла; моношарові клітинні культури різних тканин, що здатні репродукувати віруси. У біотехнології стійкі лінії використовують для великомасштабного виробництва вакцин та рекомбінантних білків, для розмноження вірусів та виявлення білків, що кодуються клонованими послідовностями ДНК.

Перспективним виявився напрям застосування клітинних культур для виготовлення цінних фізіологічно активних речовин: гормонів (статевих, росту, інсуліну); мукополісахаридів, колагену, кортикостероїдів, білків, ферментів, моноклональних антитіл, факторів росту, факторів згортання крові, гормоноподібних речовин. Наприклад, гібридами отримують шляхом злиття нормальних лімфоцитів та мієломних клітин. Ці клітини мають здатність до синтезу специфічних антитіл та до необмеженого росту в процесі культивування.

Останнім часом доволі успішно розвивається напрям застосування в біотехнології окремих частин тканин та органів людини, наприклад, шкіри для подальшого її вирощування в штучних умовах з наступною аутоотрансплантацією людині при лікуванні опіків. Перспективною виявилася технологія використання стовбурових клітин, що характеризуються поліпотентністю й можуть перетворюватися на будь-яку клітину організму; соматичних клітин та ізольованих клітини бластули в методах клонування й виведення трансгенних тварин тощо.

Вдосконалення біооб'єктів методами мутагенезу, селекції, клітинної та генної інженерії

Ефективність біотехнологічного процесу, перш за все, залежить від біосинтетичних властивостей біооб'єктів-продуцентів. Якщо організм, виділений з природного середовища не буде вдосконалений, то виробничий процес утворення цільового продукту або економічно недоцільний, або технічно важко здійснити.

Зміна біооб'єкта, що сприятлива для його використання у виробництві, має передаватися спадково і, відповідно, викликатися мутацією. На біохімічному рівні *мутація* – зміна первинної структури ДНК у конкретній її ділянці, що, зрештою, призводить до зміни фенотипу біооб'єкта. Змінюється біосинтетична здатність біооб'єкта: змінюється або набір його ферментів, або активність деяких із них. Мутації можуть бути неконтрольованими

(спонтанними) та контрольованими (індукованими). Перші відбуваються із частотою 1×10^5 - 1×10^7 на одну генерацію для різних організмів; це означає, що не спрямовано змінюється одна клітина зі 10^6 клітин. Частота індукованих мутацій зростає у десятки-тисячі разів. Спонтанні мутації зустрічаються, зазвичай, досить рідко. Чинники, що викликають мутації, відносять до розряду фізичних, хімічних чи біологічних і зветься *мутагенами*. Мутагени за дією поділяють на два класи – прямої (на нуклеїнові кислоти) та непрямой, або опосередкованої дії (переважно – через первинні метаболіти, або білки).

В якості *фізичних мутагенів* можуть бути підвищена або знижена температура, різноманітні випромінювання (ультрафіолетове, іонізуюче), ультразвук. При температурному впливі виникає так званий «температурний шок», що може призводити до істотних змін у різних клітинах – летальних та видимих мутацій.

Ультрафіолетові промені (УФП) мають більшу довжину хвиль, ніж іонізуючі випромінювання, і мають меншу енергію. УФП із довжиною хвилі 260 нм поглинаються ДНК, при цьому розриваються водневі зв'язки між комплементарними нитками. У клітинах, що мутували, УФП викликають в основному внутрішньогенні перебудови.

До *хімічних мутагенів* відносять: інгібітори синтезу нуклеїнових кислот (НК), аналоги азотистих основ, алкілюючі сполуки, окисники, відновники, вільні радикали, акридинові барвники, деякі антибіотики.

До *біологічних мутагенів* відносять віруси (фаги), живі вакцини, деякі біотоксини, що утворюються грибами, протозоа та гельмінтами. Так, зміни у хромосомах викликають цитомегаловірус, вірус простого герпесу, герпетиформний вірус, вірус Сендай, вірус саркоми Рауса та ін. З грибних токсинів-мутагенів – афлатоксин В.

Мутагени різних класів (фізичні, хімічні, біологічні) використовують у роботі з біооб'єктами. При цьому прагнуть отримати штами або з маркерними ознаками, важливими для розшифровки механізмів мутагенезу, або штами-суперпродуценти БАР, що істотно збільшують вихід кінцевого продукту порівняно з контролем.

При цілеспрямованому отриманні мутантів необхідний їх відбір, або селекція, значення якої винятково велике у виведенні різних порід тварин, багатьох сортів злакових, декоративних та інших рослин, в отриманні мікробів-суперпродуцентів БАР (ряду антибіотиків, амінокислот, вітамінів та інших речовин). Застосування селекційних методів дозволяє оцінити й спрямовано відібрати мутаційні лінії, необхідні для виробничого процесу отримання цільового продукту. Унаслідок селекційної роботи з мікрооб'єктами виникають модифіковані штами та клони мікроорганізмів.

Штамами називають різні чисті мікробні культури одного й того самого виду, виділені з різних джерел або навіть із одного джерела, але в різний час. Із штамів формуються види, однак властивості різних штамів не виходять за межі виду.

Клоном називають культуру мікроорганізмів, отриману із однієї клітини. Відібрані клони проходять перевірку (скринінг) та багатоступеневий відбір за необхідною ознакою (при цьому повторюють обробку мутагеном).

Селекційний етап удосконалення біооб'єкта, як правило, тривалий і складний. Для порівняння можна вказати на успіхи із селекцією мутантів пеніцилу, вихідний штам якого, виділений А. Флемінгом у 1940 р., продукував лише 50 одиниць антибіотика пеніциліну в 1 мл культуральної рідини. У 1951 р. шляхом розсіву природної популяції клітин, що вирости в глибинних умовах культивування *Penicillium chrysogenum*, було виділено штам NQ 1951 з активністю 100 ОД/мл. Його колонія і стала родоначальницею всіх виробничих штамів у різних країнах світу. Використовуючи селекцію та комбіновану дію різними мутагенами (переважно – УФП та алкілюючі агенти), вже на початку 60-х років вдалося передати у виробництво штам, що утворює пеніцилін у кількості 5000 ОД і більше в 1 мл культуральної рідини. В даний час використовуються штами, які продукують десятки тисяч одиниць антибіотика в 1 мл середовища. Виробничі штами (стосовно біотехнологічного виробництва) з такою високою продуктивністю (це відноситься не тільки до пеніциліну, а й до інших цільових продуктів) вкрай нестабільні внаслідок того, що численні штучні зміни в геномі клітин штаму самі по собі для життєздатності цих клітин позитивного значення не мають. Тому мутантні штами вимагають постійного контролю при зберіганні: популяцію клітин висівають на тверде середовище та отримані з окремих колоній культури перевіряють на продуктивність, при цьому *ревертанти* – культури зі зниженою активністю, відкидають. Реверсія пояснюється зворотними спонтанними мутаціями, що ведуть до повернення ділянки геному (конкретного фрагмента ДНК) до його початкового стану.

При селекції застосовують методи виведення нових форм організмів, що відрізняються за властивостями від вихідних батьківських організмів. Стосовно мікробів сформувалося чотири підходи, що використовуються в селекційній роботі:

1. Відбір природних штамів, що мають цінні ознаки, що виявляються в конкретних умовах їх існування.

2. Штучний відбір клонів мікроорганізмів з корисними для людини ознаками, що виникли на основі природної мінливості батьківських форм. Такого відбору вдаються тоді, коли контрольована ознака біологічно малоцінна для мікроба і тому важко створити умови вирощування культури, в яких виділяти потрібні варіанти вдається відносно легко.

3. Ступінчаста селекція – ефективний метод штучного відбору форм із застосуванням мутагенів. За допомогою мутагенів збільшують мінливість тест-культур, серед останніх відбирають найбільш перспективні; такий підхід, як правило, використовують багаторазово (ступінчасто), домагаючись суттєвого зростання контрольованого показника (активність, продуктивність та ін.).

Потенційні можливості мутагенезу (з наступною селекцією) обумовлені залежністю біосинтезу цільового продукту від багатьох метаболічних процесів в організмі продуцента. Наприклад, підвищена активність організму, що утворює цільовий продукт, очікується, якщо мутація призвела до *дуплікації*

(подвоєння) або *ампліфікації* (множення) структурних генів, включених у систему синтезу цільового продукту. Далі активність можна підвищити, якщо за рахунок різних типів мутацій будуть пригнічені функції репресорних генів, що регулюють синтез цільового продукту. Підвищити активність продуцента можна, змінивши (за рахунок мутацій) систему транспорту попередників цільового продукту у клітину. Нарешті, іноді різке збільшення кількості цільового продукту негативно впливає на життєздатність власного продуцента (так званий *суїцидний ефект*). Підвищення резистентності продуцента до утвореної ним речовини часто необхідно для отримання, наприклад, суперпродуцентів антибіотиків.

Крім дуплікації та ампліфікації структурних генів мутації можуть мати характер *делеції* – «стирання», тобто, «випадання» частини генетичного матеріалу. Мутації можуть бути обумовлені *транспозицією* (вставкою ділянки хромосоми у нове місце) або *інверсією* (зміною порядку розташування генів у хромосомі). При цьому геном мутантного організму зазнає змін, що ведуть в одних випадках до втрати мутантом певної ознаки, а в інших – до появи нової ознаки. Чимале значення для біотехнологічного виробництва може мати і так звані «точкові» мутації. В цьому випадку зміни відбуваються в межах лише одного гена. Наприклад, випадання або вставка однієї або кількох основ. До «точкових» мутацій відносяться *трансверсія* (коли відбувається заміна пурину на піримідин) і *транзиція* (заміна одного пурину на інший пурин або одного піримідину на інший піримідин). Заміни в одній парі нуклеотидів (мінімальні заміни) при передачі генетичного коду на стадії трансляції ведуть до появи в білку, що кодується, замість однієї амінокислоти інший. Це може різко змінити конформацію даного білка та, відповідно, його функціональну активність.

4. *Гібридизація* (процес отримання гібридів, в основі якого лежить об'єднання генетичного матеріалу різних клітин в одній клітині) – як метод виведення корисних форм мікроорганізмів. Тут є аналогія з способом схрещування у вищих еукаріотів.

З усього викладеного випливає, що сучасний біооб'єкт, що використовується в біотехнологічній промисловості, – це суперпродуцент, який відрізняється від вихідного природного штаму не за одним, а, як правило, за декількома показниками. Зберігання таких штамів-суперпродуцентів є серйозною самостійною проблемою. При всіх способах зберігання їх необхідно періодично пересіювати та перевіряти як на продуктивність, так і на інші важливі для виробництва властивості.

У разі застосування вищих рослин та тварин в якості біооб'єктів для отримання, наприклад, лікарських засобів можливості використання мутагенезу та селекції для їх удосконалення обмежені. Однак у принципі мутагенез та селекція тут не виключені. Особливо це стосується рослин, що утворюють вторинні метаболіти, які використовуються як лікарські речовини.

Вдосконалення біооб'єктів методами клітинної інженерії

Протягом багатьох років мутагенез та селекція успішно застосовувалися і широко застосовуватимуться при вдосконаленні біооб'єктів надалі. Проте поступово було виявлено суттєві обмеження у досягненні цілей, що ставляться

біотехнологами. І хоча головний шлях зняття таких обмежень пов'язаний із застосуванням методів генетичної інженерії, певні перспективи має і клітинна інженерія – обмін ділянками хромосом у прокаріотів або ділянками і навіть цілими хромосомами у еукаріотів. В результаті створюються неприродні біооб'єкти, серед яких можуть бути відібрані продуценти нових речовин або організми з цінними властивостями.

Клітинна інженерія – конструювання спеціальними методами клітин нового типу. Клітинна інженерія включає реконструкцію життєздатної клітини з окремих фрагментів різних клітин, об'єднання цілих клітин, що належать до різних видів (і навіть до різних царств – рослинам і тваринам), з утворенням клітини, що несе генетичний матеріал обох клітин, та інші операції. Клітинна інженерія використовується для рішення теоретичних проблем у біотехнології, для створення нових форм рослин і тварин, що володіють корисними ознаками.

Багатоядерні клітини (*полікаріони*), що створилися внаслідок злиття клітин двох різних типів (А і В), можуть бути у трьох комбінаціях – АА, ВВ, АВ. Полікаріони, що містять ядра лише одного клітинного типу (АА і ВВ), називаються *гомокаріонами*; полікаріони, до складу яких входять ядра обох батьківських типів (АВ), належать до *гетерокаріонів*. Злиття у гетерокаріонах ядер після злиття клітин викликає створення клітинного гібриду – *синкаріону*.

В останні роки дуже широко застосовують метод злиття *протопластів* (бактеріальні або рослинні клітини, повністю позбавлені клітинної стінки та оточені лише цитоплазматичною мембраною). Цей метод, очевидно, є універсальним способом введення генетичної інформації в клітини різного походження. Простота методу робить його доступним для селекції промислово важливих продуцентів. Метод відкриває нові можливості для одержання міжвидових і міжродинних гібридів і схрещування фенотипічно віддалених форм живого. Отримано позитивні результати злиття бактеріальних, дріжджових і рослинних клітин, міжвидові й міжродинні гібриди дріжджів. Вдалося одержати гібридні клітини в результаті злиття клітин організмів, що належать до різних царств: тваринного й рослинного.

Нормальні клітини в природних умовах у край рідко зливаються одна з іншою. Виняток становить процес запліднення, а також процес плазмогамії у вищих грибів, коли одноядерні гаплоїдні клітини зливаються, утворюючи двоядерні (дикаріони) організми. Такі клітини розмножуються мітотично, залишаючись двоядерними, і в результаті утворюють добре відомі плодові тіла.

Процесу злиття перешкоджає клітинна стінка. Таким чином, перший етап роботи пов'язаний із видаленням клітинної стінки і отриманням *протопластів*. У прокаріотів – еубактерій та актиноміцетів – багатоклітинних бактерій, клітинна стінка складається з жорсткого полімеру пептидоглікану, що підтримує форму клітини та забезпечує захист цитоплазматичної мембрани від перепаду осмотичного тиску між зовнішнім середовищем та цитоплазмою. Пептидоглікан може бути розщеплений за допомогою ферментів, з яких найвідомішим є лізоцим.

Якщо біооб'єкт належить до мікроскопічних (цвілевих та дріжджових) грибів, то для отримання протопластів використовують, як правило, не лізоцим,

а комплексний ферментний препарат, виділений із травного тракту виноградної равлика *Helix pomatia*.

Для видалення клітинної стінки при отриманні рослинних протопластів використовуються ферментні препарати трьох типів – целюлази, геміцелюлази та пектинази. Дія цих ферментів полягає у деструкції основних компонентів клітинної стінки, що забезпечують її механічну міцність. У рослинних клітинах цими компонентами є целюлоза, геміцелюлоза та пектинові речовини, які знаходяться у клітинній стінці у різних співвідношеннях. Тому комбінації ферментних препаратів, їх кількісні співвідношення та час обробки повинні емпірично підбиратися для кожного конкретного випадку.

Однак, при ферментативному порушенні клітинної стінки важливим є збереження цілісності плазматичної мембрани протопласта, а це зумовлено різницею величини осмотичного тиску в клітині та в середовищі. За таких умов ферментативна обробка клітинної стінки для отримання протопластів проводиться у «гіпертонічному» середовищі з 20%-ним розчином сахарози або 10%-ним розчином NaCl залежно від особливостей біооб'єкта.

На другому дуже складному і відповідальному етапі – злиття двох протопластів різного походження.

Для індукції злиття протопластів і клітин використовуються речовини різної природи: йони Ca^{2+} , поліетиленгліколь, лізолецитин, моноолеат гліцерину, вірус Сендай.

Перевага вірусу Сендай як агента, що сприяє злиттю клітин, у повній відсутності цитотоксичного ефекту. Вірус перед застосуванням інактивують, опромінюючи ультрафіолетовою лампою протягом 5 хвилин, при цьому він втрачає здатність до розмноження, але зберігає можливість зливати клітини.

Протопласти – основний об'єкт, яким оперує клітинна інженерія, також використовуються і в генетичній інженерії. При цьому обмін молекулами та фрагментами молекул ДНК у протопластів досягається легше, ніж при трансформації клітин з їх складнішою оболонкою.

Перспективи клітинної інженерії полягають насамперед у тому, що з її допомогою можливе отримання міжвидових та міжродових гібридних культур мікроорганізмів, а також гібридних клітин між віддаленими в еволюційному відношенні багатоклітинними організмами.

Методами клітинної інженерії були отримані біооб'єкти-продуценти багатьох гібридних β -лактамних антибіотиків, гібриди дріжджів, гібридами – продуценти моноклональних антитіл, організми-симбіонти (вищі рослини з азотфіксувальними ціанобактеріями).

Створення біооб'єктів методами генетичної інженерії

Генетична інженерія набагато конкретніша і точніша за клітинну за характеристикою використовуваних об'єктів і оперує в основному з різними за формою та розмірами фрагментами клітини. Мета прикладної генетичної інженерії полягає в конструюванні таких рекомбінантних молекул ДНК, які при впровадженні в генетичний апарат надавали б організму властивості, корисні для людини.

Генетичну інженерію можна представити як поєднання фрагментів ДНК

природного та синтетичного походження або їх комбінацію *in vitro* з подальшим введенням отриманих рекомбінантних структур у живу клітину для того, щоб введений фрагмент ДНК після включення його в хромосому або *реплікувався* (створював копії), або автономно *експресувався* (процес, при якому спадкова інформація генів використовується для синтезу функціонального продукту). Отже, генетичний матеріал, що вводиться, стає частиною геному клітини.

Для роботи необхідно мати:

- а) генетичний матеріал (клітину-хазяїна);
- б) транспортний пристрій – вектор, що переносить генетичний матеріал у клітину;
- в) набір специфічних ферментів – «інструментів» генної інженерії.

Принципи та методи генетичної інженерії відпрацьовані, насамперед, на мікроорганізмах; бактеріях – прокаріотах та дріжджах – еукаріотах.

Технологія рекомбінантних ДНК використовує такі методи:

- специфічне розщеплення ДНК рестриктазами, що прискорює виділення та маніпуляції з окремими генами;
- швидке *секвенування* (біохімічні методи встановлення послідовності нуклеотидних основ ДНК) всіх нуклеотидів в очищеному фрагменті ДНК, що дозволяє визначити межі гена та амінокислотну послідовність, що кодується ним;
- конструювання рекомбінантної ДНК;
- гібридизація нуклеїнових кислот, що дозволяє виявляти специфічні послідовності РНК або ДНК з більшою точністю та чутливістю, засновану на їх здатності зв'язувати комплементарні послідовності нуклеїнових кислот;
- клонування ДНК: ампліфікація *in vitro* за допомогою ланцюгової полімеразної реакції або введення фрагмента ДНК у бактеріальну клітину, яка після такої трансформації відтворює цей фрагмент у мільйонах копій;
- введення рекомбінантної ДНК у клітини чи організми.

Важливим етапом роботи є вибір вектора. Найчастіше їх конструюють на основі плазмід (за відсутності лізису клітини). Завдання вектора – донести обрану ДНК у клітину-рецепієнт, вбудувати її в геном, дозволити ідентифікацію трансформованих клітин, забезпечити стабільну експресію введеного гена. Щоб забезпечити проникнення вектора з чужорідним геном у клітину мікроорганізму залежно від її виду проводять спеціальну обробку матеріалу солями літію або кальцію. Унаслідок цього в клітинній стінці формуються отвори невеликого діаметра, через які проникають молекули вектора.

Вбудовування гена у вектор (плазмиду) здійснюється за допомогою набору специфічних ферментів – рестриктаз. Ген утримується у векторі спочатку за рахунок водневих зв'язків між комплементарними кінцями молекули ДНК, а потім закріплюється за допомогою ферментів-лігаз ковалентними зв'язками. Суспензія клітин мікроорганізму разом із вектором після інкубації засівається на ущільнене живильне середовище, а далі колонії, що при цьому утворюються, переносяться на агаровий косяк. Отримані клони перевіряють за допомогою *генів-маркерів* (ген, що дозволяє розрізняти гібридні

клітини для ефективної їх селекції) на вміст у їх клітинах вектора з геном, який відповідає за активність біосинтезу цільового продукту, а далі проводять відбір рекомбінантних продуцентів.

Маркерні гени можуть відповідати за стійкість до антибіотиків (канаміцину, тетрацикліну, неоміцину та ін.), гербіцидів (у рослин). Основний принцип роботи такого маркера – здатність трансформованих клітин рости на селективному поживному середовищі, з добавкою певних речовин, що інгібують ріст та поділ нетрансформованих, нормальних клітин. Або кодувати нейтральні для клітин білки, наявність яких у тканинах можна легко тестувати.

Найбільші практичні успіхи генетичної інженерії стосовно біотехнології лікарських засобів досягнуто нині у сфері створення штамів мікроорганізмів – продуцентів видоспецифічних для людини білків. Такі білки для мікробної клітини є чужорідними, а в організмі людини одні з них відіграють роль біорегуляторів (білкові гормони), інші – факторів вродженого імунітету (інтерферони тощо).

ЛЕКЦІЯ 3

Стадії біотехнологічного виробництва

План

1. Технологія приготування поживних середовищ для біосинтезу
2. Підтримання чистої культури та отримання засівної дози продуцента
3. Ферментація
4. Загальні принципи розподілу речовин
5. Одержання товарних форм препаратів

Продукти біотехнології отримують за індивідуальними технологіями, використовуючи для цього певні біологічні агенти, сировину, обладнання. При цьому кількість стадій виробництва та їх технологічні режими, можуть сильно варіювати. У той же час для всіх біотехнологічних виробництв існує типова схема.

До визначальних факторів біотехнологічного процесу відносять:

- Вид біотехнологічного процесу, що використовується;
- Субстрат з його біохімічними та біофізичними характеристиками;
- Апаратуру, включаючи систему контролю управління;
- Технологічний режим і відповідність вимогам ДСТУ.

Промисловий біотехнологічний процес, в якому для виробництва комерційних продуктів використовують клітинні системи або мікроорганізми, зазвичай включає три ключові стадії:

1. Підготовчу (обробка сировини, що використовується в якості джерела поживних речовин, і за необхідністю приготування поживних середовищ);

2. Біотехнологічну (ріст мікроорганізмів-мішеней у великому – зазвичай обсязі понад 1000 л – біореакторі (ферментація) з подальшим утворенням потрібного метаболіту, наприклад антибіотика, амінокислоти або білка (біотрансформація));

3. Отримання готової продукції (очищення цільового продукту від компонентів культурального середовища або від клітинної маси).

Підготовча стадія необхідна для приготування сировини, що використовується в біотехнологічному процесі. Залежно від цільового продукту передбачається:

- Приготування середовища, що включає необхідні компоненти живлення для організмів, та його стерилізація (для асептичних біотехнологічних процесів, при яких небажане попадання сторонньої мікрофлори);
- Підготовка і стерилізація газів (зазвичай повітря) шляхом очищення від пилу, вологи і присутніх у повітрі мікроорганізмів, включаючи спори;
- Підготовка посівного матеріалу, в тому числі культивування мікроорганізмів, ізолюваних клітин рослин або тварин;

- Підготовка біокатализатора – або ферменту у вільному або закріпленому на носії вигляді, або біомаси мікроорганізмів, вирощених до стану, в якому проявляється їх ферментативна активність;

- Попередня обробка сировини, якщо вона потрапляє у непридатному для безпосереднього використання у біотехнологічному процесі вигляді. Наприклад, при отриманні спирту пшеницю спочатку дроблять, а потім піддають ферментативному процесу «оцукрювання». Інший приклад – використання деревини для отримання дріжджів: її спочатку подрібнюють, а потім піддають нагріванню до 200°C в кислому середовищі. В результаті кислотного гідролізу відбувається перетворення деревини на розчин глюкози і лігнін. Розчин глюкози (гідролізат) якраз і використовують в біотехнологічному процесі для отримання кормових дріжджів.

Процес стерилізації є одним з найнеобхідніших заходів у практиці промислової біотехнології. Процедурі стерилізації підлягають мікробіологічні середовища, посуд, інструменти, деякі пристрої. Це робиться з метою недопущення розвитку сторонніх мікроорганізмів при роботі з досліджуваними культурами. *Стерилізація* (від лат. *sterilis* – безплідний) – це повне знешкодження матеріалу від вегетативних клітин мікроорганізмів та їх форм спокою (спор, цист та ін.). Ряд біотехнологічних виробництв і окремі стадії отримання продукції з використанням біотехнологічних прийомів вимагають забезпечення асептичних умов.

Під *асептичними умовами* розуміють заходи, режими, що перешкоджають попаданню контамінантів. Терміном «контамінанти» позначають сторонню мікрофлору, мікроорганізми-забруднювачі. Під підтриманням і створенням асептичних умов в технології слід розуміти:

- забезпечення умов отримання чистих культур в лабораторії та спеціалізованих відділеннях (термостатах, камерах тощо);
- стерилізація, герметизація обладнання і комунікацій;
- спеціальні прийоми при введенні добавок, при посіві і при відборі проб;
- стерилізація піногасників, поживних середовищ, повітря.

Процеси, використання яких на практиці сприяє досягненню і підтримці асептичних умов, умовно можна розділити на дві групи:

- процеси, що знищують сторонню мікрофлору;
- процеси, що видаляють мікроорганізми з матеріального потоку.

При виборі методу стерилізації слід враховувати чутливість мікроорганізмів до застосовуваних факторів, а також їх чисельність, видову приналежність, вміст у них вологи, фізіологічну форму (вегетативна, спори), вік клітин спор, значення рН, хімічний склад, фізичні властивості середовища та його об'єм.

Бактерицидна дія різноманітних методів стерилізації обумовлена пошкодженням біологічно важливих макромолекул клітини і, як наслідок, порушенням певних фізіологічних функцій. Так, загибель клітин при термообробці у вологому середовищі настає через денатурацію білків, і звільнення нуклеїнових кислот, інактивацію ферментів, пошкодження

цитоплазматичної мембрани. При впливі на клітину сухого жару загибель відбувається в результаті активних окислювальних процесів і порушення клітинних структур.

Для стерилізації використовують різні методи, які можна поділити на фізичні та хімічні. Можливість і доцільність застосування того чи іншого способу визначається особливостями матеріалу, що підлягає стерилізації, його фізичними і хімічними властивостями, метою дослідження. Найчастіше в практиці промислової біотехнології застосовується термічна стерилізація.

Фізичні методи стерилізації

Термічні методи (дії високих температур)

а) прожарюванням в полум'ї пальника стерилізують безпосередньо перед використанням платинові металеві частини мікробіологічної петлі, дрібні металеві інструменти. При цьому необхідно пам'ятати, що найвищою є температура у верхній та периферійних частинах полум'я пальника.

б) стерилізація сухим жаром (гарячим повітрям у сушильній шафі). Таким чином стерилізують, в основному, лабораторний посуд, який складають у спеціальні бікси або загортають у папір. Проводиться у спеціальних сухожарових шафах за різних режимів (300-1560°C). Перед стерилізацією пробірки і колби закривають корками. Ватно-марлеві корки не тільки захищають посуд та його вміст від попадання сторонніх мікроорганізмів, але на відміну від інших (гумових, алюмінієвих, пластмасових), забезпечують повітрообмін із зовнішнім середовищем. При стерилізації скляних піпеток їх верхні кінчики також закривають шматочками вати. При роботі з ними доцільно користуватися гумовими грушами, але зручніше використовувати спеціальні автоматичні піпетки з одноразовими змінними наконечниками.

Пробірки з корками завертають у папір по 10-15 шт., а чашки Петрі – по 1-3 шт. Кожну піпетку щільно обгортають папером, а корки на колбах накривають паперовими ковпачками. У такому вигляді посуд розміщують до сушильної шафи і стерилізують. При встановленні на сухожарових шафах температури, слід пам'ятати, що папір та ватно-марлеві пробки обуглюються при температурі понад 180°C.

в) стерилізація насиченою парою (вологим жаром) під тиском (автоклавування). Це найбільш надійний та поширений спосіб стерилізації. Проводять за допомогою спеціальних пристроїв – автоклавів, металевих резервуарів, що герметично закриваються і здатні витримувати високий тиск.

Принцип дії автоклава заснований на зростанні температури кипіння води при підвищенні тиску (при тиску в 1 атм температура кипіння води 99,1°C, а при тиску в 2 атм – 119,6°C). При звичайному атмосферному тиску вода закипає при температурі 100°C. При підвищенні тиску на 1 ат (98,0665 кПа) понад звичайного, кип'ятіння і пароутворення починається, коли температура досягає 120-120,5°C. Пара, що утворюється за цих умов, згубно діє на мікроорганізми протягом 30 хв. Пара при тиску, що перевищує звичайний на 2

атм (196,133 кПа), має температуру 134°C і вбиває мікроорганізми протягом 15-20 хв. Для спостереження за тиском автоклав обладнаний манометром.

В автоклавах стерилізують середовища, а також посуд і інструменти, які можуть бути зруйновані при дії більш високих температур. Більшість живильних середовищ для культивування мікроорганізмів стерилізують протягом 15 хв. при 1 атмосфері на манометрі автоклава, що відповідає 121°C.

Автоклав обов'язково має два манометри, на одному встановлюється необхідний для стерилізації тиск, інший показує поточний тиск у стерилізаційній камері. Як тільки стрілка манометра доходить встановленої позначки, автоматично відкривається паровипускний клапан і надлишок пари виходить із стерилізаційної камери.

В практиці промислової біотехнології стерилізація в автоклаві здійснюється при температурі в межах від 112°C до 134°C, тобто від 0,5 до 2,0 атм. Температура нижче 112°C не є надійною, а вище 134°C – не є необхідною. Показнику манометра, у фізичних атмосферах, відповідає певна температура (табл. 1).

Таблиця 1

Температура насиченої пари при різному тиску		
Тиск:		Температура, °C
нормальний, атм	надлишковий, атм	
1,0	-	110
1,0	0,5	112
1,0	0,75	116
1,0	1,0	121
1,0	1,5	126
1,0	2,0	134
1,0	2,5	138

Температура й тривалість автоклавування визначаються матеріалом, який стерилізується. Живильні середовища, які містять молоко, желатин, пивне сусло, дріжджовий автолізат, вітаміни, цукри стерилізують при 0,5 атм. протягом 15-30 хв. В основному живильні середовища стерилізуються при 1,0 атм. Але є субстрати, які характеризуються особливою термостабільністю (наприклад, ґрунт). Такі субстрати стерилізують при 2,0 атм. протягом 1-2 год. два дні підряд.

г) Для середовищ, компоненти яких розкладаються при температурі, вищій за 100°C (розчини вітамінів, амінокислот тощо), проводять поетапну дробову стерилізацію, яку можна здійснювати в автоклаві з відкритим паровипускним клапаном (стерилізація текучою парою). Принцип такої стерилізації полягає в тому, що середовище (чи його компоненти) прогривається без надлишкового тиску (при 100°C) кілька разів, а в періоди між прогріваннями дають можливість прорости життєздатним спорам. Обробку текучою парою проводять 3-4 рази протягом 20-40 хв.

Різновидом дрібної стерилізації є *тиндалізація*. Використовується для середовищ, компоненти яких денатуруються при 60°C. Матеріал, який

стерилізується, прогрівують на водяних банях та апаратах Коха 5-6 разів, із перервою для переходу спорових форм мікроорганізмів у вегетативні.

д) Одноразове прогрівання матеріалу при температурі нижче 100°C спрямоване на знищення лише вегетативних клітин мікроорганізмів, називають *пастеризацією*. Вона, як правило, не забезпечує стерильності.

В результаті пастеризації знищується до 90-95% мікрофлори. Ті ж клітини, які залишилися – ослаблені і розмножуються повільніше. Пастеризація широко використовується у харчовій промисловості для обробки продуктів, які швидко втрачають (змінюють) свої смакові і харчові властивості при розвитку в них мікроорганізмів: молоко, ягідні та фруктові соки, вина, пиво та ін. Пастеризацію проводять при 60-75°C протягом 15-30 хв. або при 80°C – 10-15 хв. (у деяких випадках матеріал нагрівають до 90°C) із наступним швидким охолодженням до температури нижче 10°C.

є) стерилізація кип'ятінням. Стерилізацію металевих інструментів, предметних скелець, гумових трубок та ін. проводять кип'ятінням. Спори деяких бактерій зберігають життєздатність при кип'ятінні. Рекомендується стерилізацію кип'ятінням проводити у 2%-ому розчині карбонату натрію (для пом'якшення води і збільшення температури кипіння) не менше 30 хв. Початком стерилізації вважають момент закипання води у стерилізаторі.

Стерилізація опроміненням та газами

При опроміненні найбільш пригніченими в клітині процесами є окисне фосфорилування, змінюються фізико-хімічні властивості нуклеопротейдів, відбуваються зміни в ДНК, порушуються транскрипція, трансляція, функції мембран, пригнічуються енергетичні процеси. Можливі всі види мутацій: геномні – кратні зміни гаплоїдного числа хромосом; хромосомні – структурні або чисельні зміни хромосом; генні або точкові – зміна молекулярної структури генів, в результаті синтезуються білки, що втратили свою біологічну активність.

За допомогою *газів* стерилізують обладнання та матеріали в тому випадку, коли іншими способами їх простерилізувати неможливо. Найчастіше для цього використовують окис етилену, а також формальдегід. Зважаючи на те, що окис етилену токсичний та вибухонебезпечний, процес стерилізації проводиться висококваліфікованим персоналом у спеціальних камерах та пристосованих для цього приміщеннях. Як стерилізуючі агенти використовують також неіонізуюче (інфрачервоне, ультрафіолетове), іонізуюче випромінювання (β-частки, рентгенівське випромінювання (X-промені), γ-промені – радіоактивні) та ультразвук.

Опроміненням стерилізують вироби медичного призначення, антибіотики, гормони, вітаміни, перев'язочний матеріал, одноразове пластмасове обладнання. Стерилізацію опроміненням проводять у виробничих умовах.

Опромінення *ультрафіолетовими* променями використовується, як правило, для обробки повітря в кімнатах, які потребують особливої чистоти,

наприклад в ламінарних боксах (бактерицидна дія ультрафіолетового випромінювання – використання бактерицидних ламп). Опромінення ультрафіолетовими променями (260 нанометрів) – найбільш часто використовується в лабораторіях для стерилізації приміщень, настільних боксів. При тривалому впливі ці промені викликають загибель всіх бактерій.

Бактерії гинуть дуже швидко, а спори грибів значно повільніше. Тому в боксах встановлюють бактерицидні лампи БУФ-15 або БУФ-30, які включаються на 30 хвилин за 1 годину до роботи. Крім того, рекомендується проводити профілактичне опромінення боксів протягом 2 годин.

Метод фільтрування за допомогою мембранних фільтрів

Стерилізація фільтруванням використовується для обробки живильних середовищ та розчинів, компоненти яких не витримують нагрівання, зокрема, розчини білків, сироватки, деякі вітаміни, леткі сполуки.

Метод полягає у пропусканні (фільтрації) розчинів через дрібнопористі фільтри.

Мікробні клітини затримуються на фільтрах механічно (так як вони більші, ніж діаметр пор фільтру) і шляхом адсорбції клітин на фільтруючому матеріалі. В залежності від матеріалу, із якого виготовлено фільтр, розрізняють мембранні (колоїдні), азбестові, фарфорові, скляні фільтри. Як правило, бактеріальні фільтри пропускають віруси і бактеріофаги. Фільтрування проводять за допомогою спеціальних приладів (фільтри Зейтца, свіча Шамберлана). Механізм роботи цих приладів принципово подібний. Верхній отвір стерильної колби покривається мікропористим фільтром, через який пропускається рідина, яку треба простерилізувати. Але пори фільтрів настільки малі, що ця рідина не здатна проходити крізь них самотійно, для цього необхідно створити різницю тисків ззовні колби та в середині. За допомогою спеціального насоса у колбі створюється вакуум і простерилізована рідина збирається у колбі.

Хімічні методи стерилізації: дезінфекція антисептиками

Хімічна стерилізація (дезінфекція) – це знищення мікроорганізмів та їх спор за допомогою хімічних речовин (антисептиків). Найчастіше дезінфекцію проводять для знищення патогенних форм мікроорганізмів у навколишньому середовищі.

З неорганічних сполук сильнодіючими є солі важких металів. Бактерицидну дію проявляють окислювачі Cl_2 , I_2 , H_2O_2 , KMnO_4 , H_2SO_4 , HCl , H_2S , CO_2 , SO_2 .

а. Галогени (хлор, йод) та їх похідні. Хлор та йод активні проти вегетативних та спорових форм мікроорганізмів.

б. Сполуки важких металів (ртуть, срібло, мідь). Так як сполуки ртуті високотоксичні, а срібла – затратні, їх використовують дуже рідко. Крім того, ці сполуки здійснюють переважно бактеріостатичну (затримують ріст і розвиток мікроорганізмів), а не бактерицидну дію (викликають загибель).

З *органічних сполук* отруйні для мікроорганізмів феноли, альдегіди, спирти, органічні кислоти (саліцилова, оцтова, бензойна, сорбінова), ефірні олії, смоли, барвники (генціанвіолет, фуксин, діамантова зелень).

а. Фенольні сполуки. Феноли здійснюють дезінфікуючий вплив як на вегетативні клітини, так і на спори, тоді як їх сполуки неефективні проти спор.

б. Спирти (етиловий та ізопропіловий). Їх дезінфікуючі властивості зростають прямо пропорційно концентрації, від 60% до 70%. При більш високих концентраціях їх бактерицидна дія різко знижується. Це пов'язано з тим, що вода прискорює хімічний процес денатурації білків (грає роль каталізатора). Також вода уповільнює випаровування спирту, чим збільшує час контакту дезінфікуючого засобу з поверхнею. Доказано, що це значно підвищує ефективність процесу дезінфекції. Концентрація нижча за 60% також знижує ефективність етанолу у якості дезінфікуючого засобу. Спирти не здійснюють летального впливу на спори бактерій і мають повільний дезінфікуючий ефект (декілька хвилин).

в. Формальдегід – максимальний стерилізаційний ефект досягається при вологості повітря 70% і температурі 22°C. При більш низькій температурі він втрачає свій дезінфікуючий ефект. Оксидом етилену обробляють термолабільні середовища та пластмасовий посуд. Оксид етилену літка сполука і виділяється з обробленого матеріалу при температурі 37°C.

г. Консерванти додають до середовищ та матеріалів, які підлягають тривалому зберіганню.

Ефективність дії антисептиків залежить від природи речовини, концентрації, біологічних особливостей мікроорганізмів, тривалості впливу, температури, рН та складу середовища. Більш чутливі до антисептиків вегетативні клітини, ніж спори.

Механізм дії антисептиків різний:

- пошкодження клітинної стінки і порушення мембрани;
- порушення обміну речовин в результаті взаємодії з компонентами клітини після проникнення в неї;
- вплив на білки, ферменти;
- розчинення ліпідів клітинних мембран;
- зміна рН середовища.

Окремо можна виділити *біологічну стерилізацію*, яку здатні здійснювати антибіотичні речовини та фітонциди.

У промисловості для стерилізації робочих апаратів часто використовують пар з високою температурою.

Використовувані для культивування середовища стерилізують в залежності від їх складу: стійкі до нагрівання – при високих температурах (нагрівання, пара), для нестійких компонентів може бути використано фільтрування.

Вимірювальні прилади найчастіше стерилізують хімічно, змиваючи залишки хімічних речовин стерильною водою.

ЛЕКЦІЯ 4

Підготовка та зберігання продуцентів

План

1. Трофічні потреби мікроорганізмів
2. Класифікація поживних середовищ
3. Особливості культивування мікроорганізмів

Трофічні потреби мікроорганізмів. Дослідження фізіологічної і біохімічної мінливості клітин мікроорганізмів-продуцентів відкриває можливості для управління мікробним біосинтезом, змін метаболізму в бажаний бік. Змінюючи умови культивування, можна вплинути на зміни складу біомаси і продуктів метаболізму. Лімітування і пригнічення росту призводять до уповільнення певних процесів біосинтезу, інколи можуть викликати прискорення інших процесів. На цьому заснований надсинтез бажаних продуктів. Для свого росту й розвитку мікроорганізми потребують необхідних поживних субстратів. У природних умовах усі необхідні поживні речовини вони отримують із довкілля (грунтового розчину, води).

В лабораторних умовах харчові потреби мікроорганізмів забезпечуються за рахунок поживних середовищ. Середовища необхідні для накопичення, виділення і збереження мікроорганізмів, а також для вирощування культур з метою дослідження їх обміну речовин або отримання цінних продуктів метаболізму. У лабораторних умовах мікроорганізми вирощують також при якісному аналізі мікрофлори різних об'єктів, при кількісному аналізі – для підрахунку життєздатних клітин. Живильні середовища повинні містити усі компоненти, необхідні для конструктивних та енергетичних процесів клітини – джерела елементів-органогенів – С, О, N, H, макроелементи (зольні елементи) – P, S, Mg, Ca, Fe, мікроелементи (Ni, Zn, Mn, B, Cu, Mo та ін.), за необхідності – фактори росту (деякі амінокислоти, вітаміни, жирні кислоти, нуклеотиди). Тільки невелика кількість елементів періодичної системи потрібна мікроорганізмам у відносно високих концентраціях (10^{-3} - 10^{-4} М). **Це десять головних біологічних елементів:** вуглець, кисень, водень, азот, сірка, фосфор, калій, магній, кальцій та залізо. Крім десяти головних біоелементів, мікроорганізмам необхідні мінорні біоелементи, джерелом яких, як правило, є водопровідна вода.

Поживні середовища повинні містити певну кількість води, тому що живильні речовини поступають до клітини лише у розчиненому вигляді на основі фізичних законів осмосу.

Різні групи мікроорганізмів відрізняються між собою за потребою в хімічних елементах та можливостях їх використання. Різноманітність обміну речовин мікроорганізмів проявляється перш за все у їх відношенні до джерел вуглецю та азоту.

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

У конструктивному метаболізмі головна роль належить вуглецю, оскільки всі сполуки, з яких побудовані живі організми – це вуглецеві сполуки. В залежності від джерела вуглецю, для конструктивного метаболізму, всі прокаріоти поділяють на дві групи – автотрофи та гетеротрофи.

Автотрофи (від гр. *autos* – сам, *trophe* – харчування) – здатні синтезувати органічні сполуки з неорганічних речовин (в основному CO_2 , неорганічний N та H_2O). В якості енергії для синтезу ці мікроорганізми використовують світлову енергію (фотосинтез), або енергію окисних реакцій (хемосинтез).

Гетеротрофи (від гр. *heteros* – інший) потребують відновлені сполуки вуглецю, які в залежності від фізіологічно-біохімічних властивостей організму можуть бути представлені різними органічними сполуками, наприклад спиртами, вуглеводами, вуглеводнями.

Хоча всі бактерії можуть засвоювати CO_2 , це дуже енергозатратний процес і багато з них віддають перевагу готовим органічним речовинам. Такої ж стратегії живлення – використання як джерела карбону органічних сполук, синтезованих іншими організмами, або гетеротрофності – дотримуються і тварини та гриби.

В залежності від того, яке джерело енергії можуть використовувати прокаріоти, їх поділяють на фототрофів (джерело енергії – світло) і хемотрофів (джерело енергії – окисно-відновні реакції). Організми, для яких джерелом (донором) електронів в енергетичному процесі є неорганічні речовини, запропоновано називати літотрофами, а ті, у яких донорами електронів виступають органічні речовини – органотрофами. Тоді, в залежності від джерела енергії й природи донора електронів, можливі чотири типи енергетичного метаболізму: хемолітотрофія, хемоорганотрофія, фотолітотрофія, фотоорганотрофія.

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

У класифікації типів живлення у мікроорганізмів використовують термінологію, запропоновану у 1946 р. на симпозіумі у Колд Спринг Харбор (табл. 2).

Розглядають типи живлення (трофії) щодо:

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

Таблиця 2

Класифікація організмів за типом живлення

Джерело енергії	Джерело електронів	Джерело вуглецю	Група мікроорганізмів
світло	неорганічні сполуки	CO ₂	фотолітоавтотрофи
світло	неорганічні сполуки	органічні сполуки	фотолітогетеротрофи
світло	органічні сполуки	CO ₂	фотоорганавтотрофи
світло	органічні сполуки	органічні сполуки	фотоорганогетеротрофи
хімічні реакції	неорганічні сполуки	CO ₂	хемолітоавтотрофи
хімічні реакції	неорганічні сполуки	органічні сполуки	хемолітогетеротрофи
хімічні реакції	органічні сполуки	CO ₂	хемоорганавтотрофи
хімічні реакції	органічні сполуки	органічні сполуки	хемоорганогетеротрофи

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

Деякі прокаріоти потребують певні сполуки із групи вітамінів, амінокислот або азотистих основ, які вони з тих чи інших причин не можуть синтезувати самі. Такі сполуки називають факторами росту, а мікроорганізми, що їх потребують – ауксотрофами, на відміну від прототрофів, які синтезують всі органічні сполуки з основного джерела вуглецю.

Азот – є одним із чотирьох основних елементів, із яких побудовані клітини. З розрахунку на сухі речовини, його вміст становить ~ 10%. У природі азот зустрічається в окисленій чи відновленій формах та у молекулярному вигляді. Переважна більшість прокаріот засвоює азот у відновленій формі (солі амонію, сечовина, органічні сполуки – амінокислоти та продукти неповного гідролізу). Багатьма прокаріотами може також використовуватись окислений азот. Для культивування мікроорганізмів, що фіксують молекулярний азот, використовують середовища, що не містять сполук азоту. До складу інших середовищ входять різні азотовмісні сполуки (нітрати або солі амонію, амінокислоти, білки).

Дослідження потреб прокаріот у поживних елементах показало, що всі вони потребують металів, які можуть використовуватись у вигляді катіонів неорганічних солей. Деякі з них (залізо, калій, кальцій, магній) необхідні у досить великих кількостях, інші (цинк, марганець, натрій, молібден, мідь, ванадій, нікель, кобальт) – у незначних. Роль металів зумовлена тим, що вони входять до складу ферментів, різноманітних внутрішньоклітинних транспортних систем, підтримують іонний склад клітин.

Таким чином, живильні середовища повинні містити всі необхідні компоненти для нормального розвитку мікроорганізмів, з урахуванням його фізіологічних особливостей. При цьому слід пам'ятати, що універсальних живильних середовищ не існує.

Більшість поживних середовищ, що широко використовуються, можна придбати у фірм виробників. Добре зарекомендували себе так звані сухі живильні середовища. Порошкоподібні середовища дешевші за рідкі, вони довше, ніж рідкі, зберігають свою стабільність при тривалому зберіганні в звичайних умовах, з ними менше проблем при транспортуванні. Виробники середовища показують склад та інструкцію приготування середовищ, що спрощує процедури їх приготування.

Добрі живильні середовища, крім забезпечення оптимального зростання продуцентів, повинні: мати хорошу розчинність компонентів, стабільність і стерильність і бути нетоксичними. Всі живильні середовища готуються на воді, і вона витрачається у найбільших кількостях. Тому до води висувають особливі вимоги. Під час підготовки води використовують подвійну дистиляцію, очищення на іонообмінних смолах з наступною дистиляцією або застосовують системи зворотного осмосу.

При промисловому культивуванні потрібно достатньо великі обсяги середовища, і його приготування може перетворитись на завдання досить важке для виконання. У такому разі готують так званий *маточний розчин*. Розчин середовища в 10 або 100 разів концентрованіший, ніж остаточний робочий розчин. Після цього маточний розчин розводять до необхідної концентрації компонентів перед застосуванням. При приготуванні таких маточних розчинів виникає проблема поганої розчинності деяких компонентів поживних середовищ і, насамперед фосфату кальцію, особливо в лужних розчинах. У зв'язку з цим при приготуванні середовищ розчини фосфатів не змішують з кальцієм доти, доки вони повністю не розчиняться. Якщо необхідно розчиняти тирозин або цистин (які розчиняються гірше за інші амінокислоти), то їх попередньо розчиняють у 0,1 н HCl, а після цього нейтралізують розчин.

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

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

При *класифікації поживних середовищ за консистенцією* поживні середовища поділяють на *щільні (тверді), напіврідкі і рідкі*. Напіврідкі та щільні середовища готуються з рідких, додаючи відповідно 0,3-0,7% та 1,5-2,0% агару. Останній представляє собою волокнистий матеріал, який добувають з морських водоростей. Складається він з полісахаридів (70-75%), білків (2-3%), основними складовими є високомолекулярні агароза та агаропептин. Агар розчиняється у воді при підвищеній температурі, а,

застигаючи, надає середовищу желеподібну консистенцію та стійкість до ферментних систем бактерій. Саме за ці властивості він набув широкого розповсюдження у мікробіологічній практиці. Для створення щільних середовищ використовують також желатин (10-15%), згорнуту сироватку крові.

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

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

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

Природні поживні середовища можуть містити компоненти тваринного (наприклад, кров, сироватка, жовч, молоко, яйця, м'язова тканина) або рослинного (наприклад, шматочки овочів і фруктів) походження.

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

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

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

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

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

Третя група – елективні середовища, на яких мікроорганізми певного виду ростуть швидше, більш інтенсивно, опережують у своєму розвитку інші

види бактерій. Наприклад, 1% лужна пептонна вода є елективним середовищем для холерних вібріонів, середовища Ру та Леффлера – для збудників дифтерії

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

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

Контроль токсичності поживних середовищ

Наявність токсичних компонентів у живильних середовищах щодо продуцентів неприпустима. Для усунення цього необхідно мати сертифікат якості на кожен партію живильного середовища та всіх компонентів, що використовуються при культивуванні та виробництві, не слід використовувати лікарські препарати та антибіотики, які можуть містити токсичні речовини.

При використанні великих партій середовищ, які готуються або модифікуються у лабораторії, необхідно додатково тестувати їх на токсичність.

Стабільність поживних середовищ та їх особливості

Багато компонентів живильних середовищ нестабільні та в процесі зберігання втрачають свою активність. Для того щоб усунути це використовують кілька прийомів: готують їх окремо перед використанням, тим самим скорочують термін зберігання або зберігають їх в умовах, що уповільнюють процес деградації (низька температура).

Так, ністатин, глютамін та ін. – лабільні компоненти живильного середовища. Тому їх готують у стерильному та концентрованому вигляді (маточний розчин х 100) та вносять у готове середовище перед застосуванням.

Сироватка, інсулін та інші гормони також нестабільні, їх зберігають окремо при мінус 20°C та вносять у розчин безпосередньо перед використанням.

При 37°C такі вітаміни як тіамін, рибофлавін і піридоксин протягом 7 діб втрачають активність на 50%, що необхідно враховувати при культивуванні продуцентів.

Контроль стерильності поживних середовищ

Цей контроль необхідно проводити на підготовчому етапі технологічного процесу. Контамінацію середовищ на бактерії чи гриби виявляють простими методами культивування. Зразки індикаторних середовищ інкубують при 37°C і 30°C протягом 14 діб і виявляють мікробний осад після фарбування за Грамом.

Контамінацію середовищ мікоплазмами здійснюють на спеціальних середовищах та ідентифікують їх мікроскопічно після субкультивування середовища на агарі або використовують набір барвників.

Для виявлення вірусів найефективнішою є методика полімеразної ланцюгової реакції.

Ще одним важливим етапом приготування поживних середовищ є оцінка їх властивостей росту. Перед покупкою поживних середовищ і сироватки необхідно випробувати їх здатність забезпечувати необхідне зростання клітин-продуцентів та утворення цільового продукту. При цьому необхідно враховувати, чи достатньо тривали випробування – кількість пересадок (пасажів), кількість вимірювань і коректність оцінки утворення цільового продукту.

І, нарешті, після підготовки та тестування поживних середовищ приступають до підготовки умов культивування. До них відноситься стерилізація та готовність до роботи біореактора, приміщень та допоміжної апаратури.

Нарощування маточних культур

У промисловій біотехнології «продуктивною силою» є штами-продуценти. На попередньому етапі підбирають штам-продуцент, що забезпечує отримання необхідного цільового продукту.

Одним із найважливіших етапів підбору продуцентів є розробка та адаптація їх до поживних середовищ та умов культивування. У біотехнології найчастіше використовують дешеві живильні середовища. У зв'язку з цим необхідно пам'ятати, що промислові продуценти повинні задовольняти низці суворих вимог.

Отримані цінні промислові штами-продуценти підтримуються у вигляді чистих культур в лабораторії. Для переведення чистої культури у промислове виробництво (зазвичай лабораторні культури зберігають на косяках живильного середовища, на агарі) необхідно наростити в достатній кількості маточну культуру. Ця культура безпосередньо переноситься в промислові реактори. На цьому етапі біотехнологія стикається з проблемою масштабування, тобто переходу від лабораторних масштабів до промислових, це не просте завдання і вирішується воно у кілька етапів.

На першому етапі нарощують продуценти в колбах невеликого об'єму, 1-2 л, після виходу культури на стаціонарну фазу нарощують у пляшках на 10-20 л і переводять у реактор.

На кожному етапі нарощування маточної культури контролюють інтенсивність її зростання.

Оцінюючи якість культур визначають:

1. Відсутність контамінантів.
2. Динаміку зростання культури на підготовленому середовищі.
3. Здатність культури утворювати цільовий продукт та відповідність його стандарту, прийнятому для цієї культури.

Підготовлена маточна культура має відповідати характеристиці отриманого лабораторного штаму.

Отримання маточної культури в достатній кількості дозволяє забезпечити промисловий запуск виробництва або перейти до процесу ферментації.

ЛЕКЦІЯ 5

Особливості культивування мікроорганізмів

План

1. Отримання чистих культур продуцентів
2. Ріст і розмноження культури продуцентів
3. Умови культивування продуцентів
4. Методи виділення накопичувальних культур мікроорганізмів
5. Тривале зберігання і підтримання в активному стані промислових штамів мікроорганізмів-продуцентів

Для підбору необхідних для культивування форм мікроорганізмів із заданими властивостями використовують штами з різноманітних джерел.

Найпоширенішими є природні екологічні ніші, отримання штамів-продуцентів відбувається наступним чином:

1) *Виділення мікроорганізмів з різноманітних еконіш* (природні штами, наприклад, з ґрунтів – вуглеводеньокиснюючі мікроорганізми в ґрунтах, забруднених нафтовими відходами, винні дріжджі на винограді, анаеробні целюлозрозкладаючі та метаноутворюючі мікроорганізми, удосконалені природним або штучним відбором). Підвищення продуктивності штамів за допомогою селекції та мутагенезу починається з пошуку природних форм, які володіють певними корисними властивостями (наприклад, синтез БАР, висока швидкість росту, здатність засвоювати дешеві середовища), і, в подальшому, створення на його основі промислових штамів.

2) *Отримання накопичувальних культур* – культивування отриманих штамів на спеціальних селективних середовищах (наприклад, для продуцентів протео- та ліполітичних ферментів – середовища, що містять білки та ліпіди). Перед виділенням чистої культури з різних об'єктів навколишнього середовища, в яких знаходиться безліч мікроорганізмів, спочатку отримують накопичувальні культури, проводячи культивування в елективних умовах – умовах, що сприяють розвитку однієї культури і обмежують розвиток супутніх мікроорганізмів.

Забезпечити елективні умови для мікроорганізмів можна тільки в тому випадку, якщо відомі особливості обміну речовин мікроорганізмів. Так як різні мікроорганізми використовують різні джерела живлення, то елективні умови легше всього забезпечити, підбираючи певний склад живильних середовищ. Можна створити елективні умови, забезпечуючи відповідну температуру, рН, освітлення та ін.

Накопичувальні культури складаються переважно з клітин мікроорганізмів одного виду. Для отримання накопичувальних культур використовують рідкі накопичувальні живильні середовища, різні методи обробки матеріалу, що містить суміш мікробів, а також враховують інші особливості мікроорганізмів.

3) *Отримання чистих культур*, що складаються із клітин одного виду (клони – сукупність генетично однорідних клітин, які походять від однієї клітини, штами – чисті культури мікроорганізмів, виділені з різних природних середовищ в різний час). Чистою культурою називають культуру мікроорганізмів одного виду, представлену потомством однієї клітини. Для виділення чистої культури використовують, як правило, щільні живильні середовища, на яких кожна клітина виростає у вигляді ізольованої колонії – нащадків мікроорганізмів, що утворилося з однієї клітини.

Чисті культури мікроорганізмів (дріжджів, мікроскопічних грибів, молочнокислих, оцтовокислих, пропіоновокислих та інших бактерій) володіють промислово цінними властивостями і потрібні для отримання різних продуктів і речовин, що знайшли застосування в харчовій промисловості та інших галузях народного господарства.

Для виділення чистих і накопичувальних культур з різних об'єктів в лабораторіях використовують методи посіву та пересіву. *Посівом* називається внесення частини досліджуваного матеріалу в стерильне живильне середовище, *пересівом* – перенесення частини вирослої на живильному середовищі культури мікроорганізмів на інше свіже живильне середовище.

Культитивування – вирощування мікроорганізмів на живильних середовищах. При культивуванні на живильних середовищах виростають культури мікроорганізмів.

Сукупність живильного середовища та мікроорганізмів, що ростуть у ньому називають *культуральною рідиною*, а сукупність вирослих мікроорганізмів – *культурою*. Культура може бути однорідною – чистою (складатись з клітин одного й того ж виду) та неоднорідною – змішаною (являти собою асоціацію клітин різних видів організмів).

В асоціаціях мікроорганізми перебувають у *симбіотичних або антагоністичних відносинах*. Поняття симбіоз означає, що організми дають один одному користь при спільному існуванні.

Існують різні *форми симбіотичних взаємовідносин*:

- метабіоз – співіснування, при якому один організм споживає продукти обміну іншого;
- сателізм – стимуляція життєдіяльності одного організму іншим;
- синергізм – посилення ферментативних функцій або поява нових властивостей, не властивих кожній окремій із змішаної культури.

Форми *антагоністичних відносин* такі:

- типовий антагонізм – продукти метаболізму одного організму згубні для іншого;
- конкуренція – боротьба між організмами за поживні речовини тощо;
- хижацтво – один вид організмів є джерелом живлення для іншого;

- паразитизм – один з організмів (паразит) живе на іншому (господарі) або всередині його і живиться за його рахунок.

Ріст культури – фізіологічний процес, в результаті якого збільшується біомаса – маса клітинної речовини даного мікроорганізму. *Розмноження* – це відтворення нових клітин шляхом брунькування. Споживаючи живильні речовини, клітина синтезує складні сполуки всього організму. Розмножуватися клітини можуть і за відсутності росту. У несприятливих умовах розмноження клітин припиняється, але ріст їх продовжується, вони досягають великих розмірів, витягуються у довжину, що є ненормальним явищем.

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

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

- G₁-фаза - проміжок часу від кінця М-фази до початку синтезу ДНК;

- S-фаза - період синтезу ДНК;

- G₂-фаза - проміжок часу від кінця S-фази до початку М-фази.

Сукупність G₁-, S- і G₂-фаз називається інтерфазою.

Тривалість клітинного циклу може становити від 0,5-2,0 год. (для мікробних і ембріональних клітин) до кількох десятків років (гепатоцити, нейрони). Відмінності у тривалості клітинного циклу для різних клітин зумовлені різною тривалістю G₁-фази.

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

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

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

Для успішного вирощування мікроорганізмів необхідно забезпечити оптимальні умови культивування, які залежать від їх фізіологічних особливостей. До таких умов відносять: склад поживного середовища, аерацію, температуру та інші специфічні фактори.

Інтервали температур, при яких можуть рости мікроорганізми суттєво відрізняються. Для оптимального розвитку мікроорганізмів необхідна температура, відповідна видовим потребам культури. Більшість видів бактерій активно розмножується при температурі 36-37°C, міцеліальні гриби – при 25-30°C. Це мезофільні мікроорганізми.

Холодолюбиві (психрофільні) мікроорганізми розвиваються при температурі в межах від 0 до 20°C. Для теплолюбивих (термофільних) мікроорганізмів оптимальна температура росту 45-65°C. При відхиленні температури від оптимальної розвиток мікроорганізмів затримується. Тому їх

вирощують у спеціальних термостатах – шафах з термоізоляцією, в яких підтримується постійна температура, відповідна потребам культур.

Температура у термостаті автоматично регулюється за допомогою спеціального обладнання – терморегулятора, який підтримує її на постійному рівні. Термостат – це металевий прилад із подвійними стінками, між якими знаходиться повітря або вода. В отворі верхньої стінки знаходиться термометр, який показує температуру в середині термостата, і терморегулятор. Роль терморегулятора полягає в тому, що при перевищенні встановленого рівня температури, обігрів автоматично виключається або зменшується.

Потреби у вільному кисні у мікроорганізмів неоднакові. Мікроорганізми аероби і факультативні анаероби вирощують при доступі кисню в звичайних умовах повітряного середовища.

Культивування анаеробів відбувається в безкисневих умовах, які створюються різними прийомами. Найбільш простий спосіб – механічний захист мікроорганізмів від повітря шляхом вирощування їх у високому шарі рідкого середовища (у пробірці до 10-15 мл). Для цього поверхню середовища заливають тонким шаром стерильного вазелінового масла або парафіну. Дифузія кисню з повітря в рідкі середовища зменшується при загущенні середовища агар-агаром (0,2-0,3%). При використанні щільних середовищ посів здійснюється в чашках Петрі під шаром агару.

Суворі анаеробні мікроорганізми вирощують в спеціальних апаратах – скляних вакуумних ексікаторах або анаеростатах.

За відношенням мікроорганізмів до кисню їх умовно розподіляють на:

- аероби – життєдіяльність яких відбувається за рахунок окислення речовин киснем повітря;
- анаероби – отримують кисень при анаеробному розщепленні складних органічних сполук. Атмосферний кисень при цьому смертельний;
- мікроаерофіли (факультативні аероби та анаероби) – потребують умов із зниженим рівнем кисню.

Терміни культивування. Відповідно до закономірностей росту більшість культур бактерій вирощують протягом 24-48 год. Мікроскопічні гриби культивують протягом тижня.

Методи виділення накопичувальних культур мікроорганізмів

До таких методів відносяться методи збагачення, метод нагрівання для виділення спороутворюючих бактерій, метод виділення рухомих форм бактерій (метод Шукевича) та ін. Методи, що застосовують у промисловій біотехнології є:

1) *Методи збагачення.* Їх часто застосовують для виділення чистих культур мікроорганізмів з матеріалів, у яких мало бажаних мікроорганізмів, але міститься велика кількість супутньої мікрофлори. Для збільшення чисельності потрібного виду мікроорганізмів спочатку роблять посів досліджуваного матеріалу в накопичувальні живильні середовища, які містять речовини, що стимулюють його ріст і пригнічують або затримують розмноження супутньої мікрофлори. Наприклад, при виділенні культур молочнокислих бактерій з ґрунту, сирого молока або рослин посіви роблять на стерильне знежирене

молоко, що містить 5% етилового спирту для пригнічення росту патогенних бактерій.

2) *Метод нагрівання.* Застосовують для виділення чистих культур спорових форм бактерій (бацил). У цьому випадку перед посівом досліджуваний матеріал прогрівають на водяній бані при температурі 75-85°C протягом 20-30 хв. Вегетативні форми гинуть під час прогрівання, а спори мікробів залишаються живими і при подальших висівах на щільне середовище проростають, формуючи колонії.

Тривале зберігання і підтримання в активному стані промислових штамів мікроорганізмів-продуцентів.

Необхідною умовою успішної роботи з мікроорганізмами є правильне підтримання їх в цілях збереження не тільки життєздатності клітин, але і таксономічних, а також будь-яких інших, важливих для дослідника властивостей. Мікроорганізми різних систематичних груп і навіть різні штами і варіанти одного виду відрізняються чутливістю до способу їх зберігання. Тому загального методу, однаково придатного для зберігання численних і різноманітних груп мікроорганізмів, поки не існує.

У великих колекціях різні групи мікроорганізмів зберігаються індивідуальними методами. Крім того, щоб виключити можливість втрати мікроорганізму, кожен штам зберігається не одним, а декількома способами.

Відомо, що при зберіганні мікроорганізмів в результаті їх популяційної мінливості, обумовленої гетерогенністю популяції, змінюються їх фізіолого-біохімічні особливості і, зокрема, знижується антибіотична або ферментативна активність. У процесі зберігання, так само як і при культивуванні бактерій у різних умовах, може відбуватися дисоціація, тобто розщеплення однорідної популяції бактерій на варіанти, що розрізняються генетичними, фізіолого-біохімічними та морфологічними властивостями. Тому в деяких випадках доцільно підбирати умови зберігання, оптимальні для певного варіанта, наприклад для варіанту, що володіє найбільшою біосинтетичною активністю.

До числа найбільш поширених способів зберігання мікроорганізмів відносяться періодичні пересівання на свіжі поживні середовища, збереження культур на живильному середовищі під вазеліновим маслом, зберігання клітин в ліофілізованому стані. Значно рідше мікроорганізми зберігають при низьких або наднизьких температурах, в дистильованій воді або 1%-му розчині хлористого натрію, а також на адсорбентах у висушеному стані. Вибір методу зберігання багато в чому залежить від цілей, для яких використовуються мікроорганізми, а також від наявного в розпорядженні дослідника обладнання.

Періодичні пересіви на живильні середовища

Цей спосіб був одним з перших прийомів тривалого збереження мікроорганізмів у лабораторних умовах і до теперішнього часу широко використовується в практиці мікробіологічних робіт. Аеробні мікроорганізми пересівають найчастіше на поверхню скошеного агаризованого середовища, мікроаерофіли – в напіврідке середовище, що містить 0,2-0,3% агару, анаероби – у товщу щільного середовища або в рідке середовище, дотримуючись принципів техніки Р. Хан-гейта. Культури пересівають на свіжі середовища в 2

пробірки (колби). Надалі мікроорганізми з однієї пробірки використовують для роботи, а культуру в другій пробірці залишають для зберігання і наступного пересіву.

Умови зберігання та допустимі строки періодичних пересівів деяких гетеротрофних мікроорганізмів

Частота пересіву на свіже середовище різних мікроорганізмів неоднакова і більшою мірою визначається їх властивостями. Багато мікроорганізмів можна пересівати один раз в 1-2 місяці, хоча інші, наприклад молочнокислі бактерії, потребують більш частих пересіву.

Зберігання культур в холодильнику при 4-6°C дозволяє збільшити час між пересівами.

Підтримання культур мікроорганізмів регулярними пересівами має ряд істотних недоліків. Основний з них – можлива втрата деяких морфологічних і фізіологічних ознак. Крім того, часті пересівання нерідко знижують біохімічну активність культур, підвищують небезпеку інфікування її сторонніми мікроорганізмами. При частих пересівах, особливо на рідкі середовища, велика ймовірність виникнення спонтанних мутантів і їх селекція.

Зберігання у ліофілізованому стані

Зберігання ліофільно висушених клітин – широко поширений метод тривалого збереження мікроорганізмів. *Ліофілізацією* називають процес висушування під вакуумом заморожених клітин. Ліофільно висушені клітини зберігають в ампулах, запаяних під вакуумом або в струмені стерильного газу (найчастіше азоту). Застосування цього методу дозволяє протягом 10-20 років і більше зберегти без помітних змін життєздатність, морфологічні, культуральні, фізіологічні властивості, а також біохімічну активність клітин.

Мікроорганізми, що підлягають ліофілізації, вирощують в оптимальних умовах до початку стаціонарної фази росту або закінчення формування форм. Потім клітини, або відповідно, спори суспендують у спеціальних рідинах, що одержали назву захисних середовищ. До складу захисних середовищ входять різні речовини, які захищають клітини від ушкоджень у період заморожування і висушування.

Нижче наведені рецепти деяких захисних середовищ, використовуваних при ліофілізації клітин різних мікроорганізмів:

- желатин – 1 г, сахароза – 10 г, вода дистильована – 100 мл;
- молоко знежирене – 100 мл, глюкоза – 7 г.

Для успішної ліофілізації щільність мікроорганізмів в захисному середовищі повинна бути як можна більш високою: 10^9 - 10^{10} клітин в 1 мл.

Отриману суспензію розливають в ампули з нейтрального скла по 0,5-1,0 мл, заморожують при температурі від -20 до -70°C, потім висушують і запаяють під вакуумом. Залишкова вологість ліофілізованих клітин коливається від 1 до 6% і визначається складом захисного середовища та режимом висушування. У різних лабораторіях режими заморожування та висушування помітно варіюють і багато в чому залежать від наявного обладнання. Ампули з ліофільно висушеними клітинами рекомендується

зберігати в темряві при температурі 4-6°C. Зберігання при більш високій температурі, яка перевищує 25-30°C, помітно знижує виживання клітин.

Для реактивації до ліофілізованих клітин додають по краплях стерильну дистильовану або водопровідну воду в кількості 0,5-1,0 мл.

Після регідратації (від 10 хв. до 2 год.) клітини висівають на більш багаті живильні середовища.

Ліофілізацію широко застосовують для тривалого зберігання різних мікроорганізмів. Тим не менше цей метод не можна вважати універсальним. Слід зазначити, що до ліофілізації більш стійкі грампозитивні, ніж грамнегативні бактерії. Дуже погано переносять її фототрофні та хемолітотрофні бактерії, мікоплазми, багато облігатних анаеробів. Виживання спор після ліофілізації помітно вище, ніж вегетативних клітин. Дріжджі з дрібними клітинами і аскоспорами роду *Pichia* і *Lipomyces* витримують ліофілізацію краще, ніж слабкоспорулюючі або неспорулюючі великі клітини дріжджів родів *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*.

Зберігання при низьких і наднизьких температурах

Зберігання мікроорганізмів у замороженому стані при низьких та наднизьких температурах у порівнянні з іншими методами характеризується найбільшою універсальністю. Однак цей метод вимагає спеціального обладнання і великої обережності в роботі з рідким азотом, тому використовується лише для збереження мікроорганізмів, що не витримують ліофілізацію.

Клітини заморожують в широкому діапазоні температур (від -10 до -196°C) і за різних швидкостях заморожування. Для захисту від шкідливої дії низьких температур клітини попередньо суспендують в розчинах кріопротекторів. Частіше за інших застосовують 10-20%-й розчин гліцерину, 7-10%-й розчин диметилсульфоксиду або 20%-й розчин сахарози. Суспензію клітин з високою щільністю (10^9 - 10^{10} клітин в 1 мл) розливають в ампули або флакони з кришкою, що загвинчується. Ампули запаюють і поміщають в холодильник з температурою -70°C (швидкість охолодження 1°C/с), а потім переносять в рідкий азот, де і зберігають при -196°C. Відтаювання заморожених клітин має бути як можна більш швидким. Тому ампули занурюють на 2 хв. у водяну баню з температурою 35-45°C.

Клітини з ампул висівають на багаті живильні середовища.

При температурі зберігання від -20 до -40°C добре виживають небагато мікроорганізмів; значно ефективніше зберігання при -70°C у твердій вуглекислоті і особливо в умовах наднизьких температур: при -196°C (рідкий азот) або при -210°C (газова фаза рідкого азоту).

Зберігання у гліцеролі

Одним з найбільш зручних методів є зберігання мікроорганізмів при низьких температурах (-20°C) у розчинах гліцеролу, який служить кріопротектором. Даний спосіб широко розповсюджений, проте не всі мікроорганізми витримують таку обробку. Тому вважається, що для клітин, що піддаються заморожуванню в гліцеролі, необхідні попередні експерименти по

визначенню ступеня їх життєздатності. Найбільшого поширення цей спосіб консервації мікроорганізмів отримав при зберіганні суспензій різних спор.

Для проведення експериментів по зберіганню готують 50%-й розчин гліцерола в дистильованій воді і стерилізують його при 1 атм протягом 30 хв. Клітини з вирослих культур (зазвичай з середини експоненційної фази росту), призначені для зберігання, змішують в пропорції 1:1 з 50%-м розчином гліцеролу, перемішують і ставлять у морозильник. Зберігати суспензії зручно в стерильних пробірках Еппендорфа, а для їх приготування використовувати автоматичні піпетки зі стерильними наконечниками і готувати суміші в ламінарному шафі. З клітин, що зберігаються, періодично (2-6 разів на рік) відбирають проби для перевірки на життєздатність. В залежності від результатів перевірки розраховують схеми консервації тієї чи іншої культури і періодичності їх пересіву.

Для культур мікроорганізмів з твердих середовищ перед змішуванням з гліцеролом готують суспензії в рідкому середовищі або в оптимальному для зберігання буферному розчині (перевіряється експериментально). Можна також суспендувати клітини з твердих середовищ безпосередньо в 25%-му стерильному розчині гліцеролу.

Зберігання в дистильованій воді або 1%-му розчині хлориду натрію

Цей метод не вимагає спеціального обладнання і доступний кожному експериментатору.

Мікроорганізми попередньо вирощують в оптимальних умовах, при необхідності центрифугують, після чого клітини суспендують в дистильованій воді або 1%-му розчині хлориду натрію. Успішному збереженню клітин сприяє висока щільність суспензії: не менше 10^8 - 10^9 клітин в 1 мл.

Суспензію розливають у стерильні пробірки або флакони і зберігають у холодильнику або при кімнатній температурі

ЛЕКЦІЯ 6

Виробничий етап біотехнологічного процесу

План

1. Загальні вимоги до виробничого етапу біотехнологічного процесу
2. Основні завдання, які необхідно вирішувати на виробничому етапі біотехнологічного процесу

Загальні вимоги до виробничого етапу біотехнологічного процесу

«Продуктивною силою» у будь-якому біотехнологічному процесі є біологічний об'єкт – культура клітин, тканинна культура, трансгенний організм, комплекс молекул (мембрани) або окремі молекули (антитіла в біосенсорах) і т.д. І, природно, ефективність, продуктивність і тривалість функціонування залежатиме від особливостей об'єкта та умов його культивування. Виробничий етап біотехнологічного процесу це спрямоване забезпечення умов ефективного і тривалого функціонування використовуваного об'єкта чи продуцентів.

Отже, *виробничий етап – це сукупність послідовних операцій від початку функціонування об'єкта і до завершення процесів росту, біосинтезу або біотрансформації, які можуть бути обумовлені вичерпанням поживних компонентів середовища, старінням або зміною характеристик об'єкта або іншими причинами.* Для цього в процесі виробництва необхідно контролювати десятки фізико-хімічних параметрів середовища культивування. Залежно від завдань виробництва кількість контрольованих параметрів може сильно варіювати:

- Величина рН і окислювально-відновлювальний потенціал
- Тиск, температура в біореакторі
- Рівень та маса середовища культивування
- Витрата рідини та газів
- Швидкість обертання мішалок та інших приладів, що обертаються.
- Концентрація катіонів та аніонів
- Концентрація солей у живильному середовищі
- Концентрація газів у повітрі

Усі необхідні параметри вимірюються автоматично та в динаміці. У разі відхилення від необхідних характеристик проводиться їх корекція: внесенням необхідних інгредієнтів чи навпаки їх видаленням.

Більш складним є *динамічний контроль* стану біологічних об'єктів у процесі виробництва. Багато цих параметрів є розрахунковими. Найчастіше оцінюють інтегральні характеристики біоб'єктів:

- Питома швидкість зростання культури
- Концентрація біомаси
- Концентрація ферментів або білків у культуральній рідині
- Концентрація цільового продукту у процесі виробництва
- Відсутність сторонньої мікрофлори
- Рівень та стан піни

Для контролю промислових процесів використовують комп'ютери та мікропроцесори. В ідеалі вся система контролю та управління виробництвом має бути автоматизована.

Тому основні завдання, які необхідно вирішувати біотехнологу на цьому етапі виробництва, зводяться до забезпечення максимально сприятливих умов функціонування біооб'єкта (максимальне отримання цільового продукту при мінімальних витратах).

При цьому необхідно розуміти, що це можливо лише тоді, коли досконало відома біологія біооб'єкта, його «вимоги» до умов середовища, його потенційні адаптивні можливості та генетичний потенціал.

Основні завдання, які необхідно вирішувати на виробничому етапі біотехнологічного процесу

Підтримка та контроль асептичних умов

Усі завдання, які доводиться вирішувати на виробничому етапі, можуть бути поділені на дві групи: загальні та приватні.

Основним завданням виробничого етапу є максимально ефективно отримання цільового продукту, а це можливо лише за умови оптимізації функціонування об'єкта, що використовується в біотехнології.

Так як культура клітин (природних штамів або генетично трансформованих) є найбільш поширеним сьогодні об'єктом біотехнології, то на прикладі культивування клітин розглянемо завдання виробничого етапу.

Одним із завдань виробничого етапу біотехнологічного виробництва є підтримання та контроль асептичних умов (стерильність). Забезпечення асептичних умов починається з підготовчого етапу – це стерилізація обладнання, стерилізація поживних середовищ та підтримання стерильності маточних культур.

Оскільки у процесі виробничого етапу здійснюється газообмін із середовищем, а в деяких випадках і культуральними середовищами, необхідно забезпечувати підтримання умов стерильності. Звичайно, це завдання вирішується по-різному в залежності від умов культивування та об'ємів біореакторів. Так, якщо в процесі культивування необхідно отримувати сотні тонн цільового продукту, то тоді зазвичай обмежуються високим ступенем «чистоти», але не 100% асептичності, що дуже важко за таких масштабів.

Вирішення проблеми асептики пов'язане з використанням попередньо очищеного від контамінантів повітря за допомогою спеціальних повітряних фільтрів та стерильністю використовуваних живильних середовищ у процесі культивування.

Накопичений досвід показав, що вирішення питань стерильності потребує жорсткого дотримання умов виробництва.

Контроль стерильності

Для забезпечення стерильності необхідно дотримуватися цілої низки технологічних умов. Найчистіші умови для роботи в межах виробничих ліній або лабораторії можуть бути забезпечені застосуванням ламінарних боксів (які забезпечують ламінарний потік стерильного повітря). Для забезпечення стерильності найважливішою умовою є дотримання дисципліни праці. Зокрема застосування стерилізаційного спецодягу, утримання небезпечного матеріалу в замкнутих об'ємах, правильне видалення використаного обладнання та дотримання таких умов роботи, за яких виключено промивання або розбризкування робочих рідин.

Контроль стерильності здійснюють проведенням мікробіологічних проб. Для цього середовище, що досліджують, розріджують, наприклад, у співвідношенні 1:100 і інкубують у стандартних умовах (37°C протягом 14 діб). Відсутність зростання бактерій свідчить про стерильність випробуваної проби. Якщо необхідно перевірити аналітичну мембрану на стерильність, її поміщають в умови, сприятливі для зростання бактерій і спостерігають за зростанням мікроорганізмів. Якщо зростання мікроорганізмів не виявляється, це свідчить про стерильність мембрани. Разом з тим, стандартні середовища культивування, які забезпечують зростання бактерій та грибів, не дозволяють виявити у пробах мікоплазм, їх наявність визначають спеціальними методами. Мікоплазми негативно впливають на культивування клітин. Найбільш чутливим методом виявлення мікоплазм є безпосереднє культивування. Для початкової інокуляції бульйону, що забезпечує високе накопичення мікоплазм, необхідно використовувати великі обсяги середовища (25 мл на 100 мл індикаторного середовища). Наявність мікоплазм ідентифікують мікроскопічно після субкультивування середовища на агарі або за допомогою флюорохромної техніки після спільного культивування бульйону з моношаром клітин тест-культур.

Наявність вірусів у середовищах або сироватці може бути виявлено спеціальним обладнанням та сучасними методами, наприклад, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Не рідше одного разу на рік необхідно проводити огляд використовуваної апаратури, якщо вона перебуває у постійному використанні.

Для цього використовують ДНК-діагностику, яка заснована на полімеразної ланцюгової реакції.

Забезпечення та контроль умов зростання культур

Наступним завданням виробничого етапу біотехнологічного виробництва є забезпечення та контроль за умовами зростання культур.

Найбільш значними факторами в процесі культивування є:

- контроль температурного режиму (термостатування);
- забезпечення масо- та газообміну;
- контроль якості живильного середовища – це зменшення поживних речовин та збільшення метаболітів, які можуть інгібувати подальше зростання культур;
- контроль стану продукту.

Однією із фундаментальних особливостей біологічних об'єктів є жорсткі вимоги до температури, тобто, невелике відхилення температури від оптимуму для даного об'єкта (всього на кілька градусів) призводить до різкої зміни функціональної активності об'єкта. У зв'язку з цим підтримання необхідного температурного режиму в процесі культивування або експлуатації біооб'єктів є найважливішим етапом у контролі промислового процесу.

Це завдання посилюється тим, що у процесі культивування постійно змінюється температура і доводиться здійснювати відведення тепла або (навпаки) підігрів середовища.

Так, в аеробних умовах відбувається тепловиділення, чим вище інтенсивність зростання, тим більша швидкість розігріву культурального середовища.

Найбільш простим способом відведення тепла є відведення оборотною водою через змійовики, водяні сорочки та інші пристрої. Для забезпечення контролю температури доводиться або використовувати воду з різною температурою, або регулювати швидкість обороту води.

Дещо простіше здійснювати контроль підвищення температури, тому що сьогодні існують різні системи підігріву як електричні, так і водяні. Контроль температури здійснюється автоматично.

Важливою фундаментальною властивістю біологічних об'єктів є гетерогенність, тобто неоднорідність. Сама клітина є структурованою системою біополімерів. Навіть у рідкому середовищі, в якому культують одноклітинні організми, система є гетерогенною, так у середовищі ми маємо рідкі, тверді та газоподібні компоненти. Більше того, у процесі життєдіяльності клітини утилізують частину компонентів із середовища та постійно виділяють екзометаболіти, тобто вони створюють гетерогенність хімічного та газового складу. Така гетерогенність неминуче призводитиме до зміни функціонування самого об'єкта або, іншими словами, сам об'єкт неминуче і постійно формує відхилення від оптимальних для нього умов функціонування. Цими особливостями можуть пояснюватися відсутність оптимальних умов функціонування біологічних об'єктів у природному середовищі. Завдання біотехнолога забезпечити максимальну продуктивність об'єкта у штучних умовах шляхом усунення факторів «самознищення» і, звісно, створюючи об'єкти із новими необхідними властивостями. Одним з підходів для усунення посилення гетерогенності культивованих систем є забезпечення газообміну та масообміну в процесі культивування.

Забезпечення газообміну та масообміну в процесі культивування

На жаль, забезпечення необхідного газо- та масообміну досягається лише особливостями перемішування культур, що завжди може оптимально вирішити це завдання. Перемішування – досить складне завдання, тому що при його вирішенні необхідно враховувати, що інтенсивне перемішування призводить до піноутворення, що є вкрай небажаним явищем. Використання піногасників створює проблеми через їхню побічну дію та дотримання стерильності. Особливу увагу слід звернути на стабілізацію густини піни. Показано, що

частка пінної фази у процесі масопередачі кисню досить велика. Ідеальним було б перетворення вмісту біореактора на гомогенну рухливу фазу.

Для зростання аеробних культур необхідно забезпечити надходження кисню до клітин у кількостях, необхідних для оптимального зростання даної культури. Це можливо при добрій розчинності кисню у воді. Інший шлях – це зміна парціального тиску кисню в газі (це досягається збільшенням загального тиску). Цей підхід використовується рідше, оскільки він пов'язаний із цілим рядом технічних складностей.

У тому випадку, якщо ми маємо справу з культивуванням анаеробів, яким не потрібно аерація, доводиться вирішувати завдання повного видалення кисню з середовища. Зменшення кисню може бути забезпечене введенням в реактор інертного газу або витіснення кисню вуглекислотою, яка виділяється в процесі метаболізму об'єкта, що культивується. Герметизація біореактора створює труднощі, оскільки утрудняється забезпечення перемішування і теплообміну.

Завдання газо- та масопереносу вирішуються експериментальним підбором конкретних умов для того чи іншого технологічного процесу. Для коректного управління газо- і масопереносом постійно здійснюється контроль складу середовища культивування, вмісту кисню та вуглекислого газу, і за необхідності, регулюється інтенсивність перемішування.

Склад та якість живильного середовища в процесі виробництва

Найважливішим фактором оптимального зростання клітинних культур є склад та якість живильного середовища. Склад та якість живильного середовища динамічно змінюється, що виражається у зменшенні вмісту поживних для клітин речовин та безперервному збільшенні продуктів життєдіяльності клітин (екзометаболітів). Більш того, компоненти, що входять до складу поживних середовищ, можуть змінюватися з різною швидкістю, що призводить не просто до збіднення складу, до зміни співвідношення між компонентами.

Контроль складу культурального середовища, мабуть, одне з найважчих завдань виробничого етапу біотехнологічного процесу.

Процес культивування ділять на періодичне культивування та безперервне культивування. При періодичному культивуванні до складу живильного середовища не вводять додаткові компоненти, а після завершення циклу культивування виділяють цільовий продукт. Такий спосіб культивування виправданий тоді, коли цільовий продукт накопичується у процесі культивування. Однак і при періодичному культивуванні на виробничому етапі здійснюється контроль складу середовища, що дозволяє оцінити швидкість процесу ферментації та визначити момент зупинки процесу.

У разі безперервного біотехнологічного процесу необхідно забезпечувати підтримку заданого стаціонарного стану середовища. Для цього використовують автоматичні системи реєстрації та подачі необхідних компонентів у біореактор. Управління комплексом цих процесів здійснюється комп'ютерними системами.

Найчастіше практично використовується напівбезперервний процес культивування. У середовищі культивування контролюють такі параметри як

температура, тиск, швидкість обертання мішалки, в'язкість середовища та вміст кисню.

Тиск у реакторах контролюють за допомогою мембранних манометрів, що дають пневматичний сигнал, який може бути перетворений на електричний.

Для визначення в'язкості середовища часто оцінюють потужність, яка споживається мішалкою за різної швидкості обертання. З цих даних розраховують в'язкість середовища.

Величину pH середовища визначають за допомогою pH-електродів (скляний мембранний електрод).

Концентрацію розчиненого у воді кисню визначають гальванічними (потенціометричними) або полярографічними (електрод Кларка) зондами. Ці зонди вимірюють не концентрацію, а парціальний тиск кисню.

У тому випадку, якщо виникає необхідність визначити вміст будь-яких специфічних речовин у середовищі (метаболітів та ін.), можуть використовуватися спеціально розроблені для цієї мети біосенсиори.

Так, для визначення вмісту глюкози в біореакторі був розроблено біосенсор на основі іммобілізованого конканаваліну А (білок з рослини мечевидної канавалії), який вибірково зв'язує цукор.

Контроль стану біооб'єкта у процесі виробництва

Найважливішим етапом контролю виробничого етапу є постійний контроль за станом біооб'єкта. Адже втрата виробничих якостей біооб'єктом рівноцінна виробничій катастрофі. А втрата якостей може статися з різних причин. Ось деякі з них: автоселекція та контамінація.

Якщо ферментер об'ємом 50 м^3 з коефіцієнтом заповнення 0,6 і тривалістю культивування 4-5 діб міститься від 10^{12} до 10^{15} клітин, то враховуючи звичайну частоту мутацій $1 \cdot 10^{-5}$ - $1 \cdot 10^{-7}$, то за одну генерацію може утворитися 10^5 - 10^7 форм. Залежно від форм мутацій у такій культурі може початися автоселекція та промисловий штам швидко буде втрачено.

Швидкі зміни властивостей продуцентів можуть відбутися і у разі контамінації. Так, якщо в «чисту» культуру потрапляє культура гриба або бактерій, що швидко росте, то вони досить швидко можуть інгібувати зростання продуцента.

Найбільш ефективним вважатимуться комплексний контроль стану біооб'єкта, тобто оцінка стану самого об'єкта та оцінка якості та кількості цільового продукту в процесі культивування.

При оцінці якості та кількості цільового продукту використовують різні методи визначення залежно від характеру продукту. Його характеристики повинні задовольняти прийнятим стандартам даного виробництва. Відхилення у кількісних та якісних характеристиках цільового продукту свідчить про зміну характеристик продуцентів.

При оцінці стану біооб'єктів необхідно враховувати те, що найшвидшими є експрес-методи оцінки.

На превеликий жаль, такі методи лише розробляються. А в даний час найчастіше використовують морфологічні методи та методи генетичного контролю, які мають свої особливості для кожного продуцента.

Зупиняючись на проблемах та труднощах у забезпеченні виробничого етапу біотехнологічного процесу, відзначимо, що найбільшою проблемою є недостатність знань про біологічні об'єкти, що використовуються як продуценти, і, насамперед, знань щодо розробки адаптаційної оптимізації культивування.

Адаптаційна оптимізація ґрунтується на знанні механізмів адаптації конкретного продуцента до умов культивування, складання прогнозу та перебігу біотехнологічного процесу, що має забезпечити корекцію параметрів середовища для забезпечення високої ефективності біотехнологічного процесу.

Вирішення цих проблем неможливе без фундаментальних знань процесів адаптації біооб'єктів. Складність біологічних систем, їхня висока динамічність та адаптивність ускладнює процеси контролю. Як приклад можна згадати, що в процесі зростання культура проходить ряд етапів – лаг-фаза, експоненційна фаза росту, стаціонарна фаза росту. Вимоги клітин до середовища на різних фазах росту неоднакові і тривалість фаз може змінюватись в залежності від умов культивування, а це своєю чергою впливає на вихід цільового продукту та рентабельність процесу. Отже, в процесі культивування необхідно не тільки стежити за брутто-характеристиками біологічних процесів, але постійно та ефективно контролювати поведінку реальної популяції клітин у реакторі та здійснювати оперативний контроль за цими процесами, що є досить складним завданням.

У деяких випадках умови біотехнологічного виробництва такі, що вимагають повної утилізації компонентів живильного середовища, оскільки вони можуть шкідливо впливати на цільовий продукт, не можуть бути скинуті в середу через токсичність або досить дорогі. Ця задача може бути вирішена різними способами: використанням системи дозрівання готового продукту або використанням спеціальної системи очищення середовища, що є технологічно важким завданням.

Виходячи зі складності керованих процесів, системи управління можуть бути у вигляді трьох рівнів.

Перший рівень складності управління пов'язаний з регулюванням параметрів біотехнологічного процесу з урахуванням принципу зворотного зв'язку, для його реалізації використовуються мікропроцесори. Мікропроцесори можуть встановлюватись безпосередньо на всіх етапах процесу.

Другий рівень складності розрахований на більш детальний аналіз параметрів біотехнологічного процесу, для його реалізації використовуються комп'ютери.

На третьому рівні складності аналізуються десятки та сотні змінних параметрів, вирішується велика кількість модельних рівнянь, приймаються рішення про управління процесами – все це реалізується системою комп'ютерів.

Ще однією проблемою у процесі виробничого етапу є особливості контролю залежно від показників цільового продукту.

Справа в тому, що у біотехнологічному виробництві можна отримувати цільовий продукт у вигляді біомаси клітин або у вигляді окремих метаболітів,

або екзометаболітів. Ці особливості видів цільових товарів накладають свої вимоги до контролю всього виробничого процесу.

У разі отримання метаболітів як цільових продуктів необхідно визначати стадії максимального вмісту потрібних метаболітів, забезпечувати, як правило, багатостадійний процес культивування, а кожна стадія характеризується своїми параметрами. Система культивування може дещо спрощуватися, якщо необхідні клітинні метаболіти виділяються у культуральне середовище у вигляді екзометаболітів. У такому разі їх легко виділити порівняно з метаболітами клітин, проте вони можуть виступати і як інгібітори клітинного росту.

Управління біотехнологічними процесами

Однією з переваг біотехнологічних процесів перед традиційними технологіями є те, що вони можуть бути віднесені до керованих процесів. Можливість управління біологічними об'єктами полягає в фундаментальній властивості всього живого – здатності пристосовуватися до умов існування, тобто, адаптуватися. Процес адаптації – не що інше, як процес такої динамічної перебудови метаболізму, при якому важливе збереження структурно-функціональних властивостей живого за умов харчування, температури та інших факторів середовища.

Регламентуючи умови здійснення біотехнологічного процесу, тобто змінюючи комплекс фізико-хімічних параметрів, ми можемо отримувати на виході (не знаючи всі особливості перебудови метаболізму біосистем) бажаний продукт. Або, іншими словами, регуляція біотехнологічного процесу ґрунтується на деяких принципах.

- контроль фізико-хімічних умов культивування або виробництва
- підбір, селекція, генетична модифікація біооб'єкта
- створення оптимальних умов для отримання максимальної продуктивності

Цілком очевидно, що управління біотехнологічними процесами можливо тільки у разі знання сукупності відомостей щодо біотехнологічного об'єкта, що використовується.

Поряд з цим необхідно знати поведінку біооб'єкта в конкретних умовах, часто вони унікальні і можуть призводити до проявів нетипових реакцій.

Так, реалізація біотехнологічних процесів може здійснюватися у періодичному чи безперервному режимах культивування.

При періодичному культивуванні одноклітинні культури проходять усі фази свого розвитку, тобто lag-фазу; експоненційну фазу – log, стаціонарну – const та фазу відмирання – let. Вихід цільового товару залежатиме від часу збору товару.

У тому випадку, якщо використовується безперервне культивування, то культура за таких умов, зазвичай, завжди перебуває у стаціонарній фазі чи близька до неї. Підтримуючи необхідні параметри біореактора на стаціонарному рівні, можна забезпечити регулювання продуктивності системи.

Отже, процес управління виробництвом зводиться до контролю та підтримки необхідного стаціонарного стану умов культивування. Для цього

використовують різні аналітичні прилади: сенсори для визначення провідних параметрів середовища, електроди, витратоміри тощо, які з'єднані в одну систему з дозаторами, мікропроцесорами та комп'ютерами.

Для управління процесами, зокрема ферментативними, використовують мікропроцесори. Мікропроцесор здатний виконувати до кількох мільйонів операцій на секунду.

Незважаючи на інтенсивні темпи розвитку систем керування і автоматизації, багато біотехнологічних процесів не можуть бути автоматизовані. Це пов'язано з низкою особливостей біологічних систем.

Біологічні системи є саморегулюючими та це може призводити до неконтрольованих змін у процесі культивування. З одного боку, це лежить в основі управління, а з іншого – біологічні системи змінюють свої параметри також у відповідь на неконтрольовані параметри середовища. Так, сезонні зміни впливають на продуктивність незалежно від контрольованих умов зростання. Одноклітинні об'єкти чутливі і до таких глобальних факторів як сонячна активність та інші геліофізичні фактори.

ЛЕКЦІЯ 7

Типи ферменційних процесів

План

1. Конструкція ферментера
2. Періодичний процес культивування. Фази росту культури
3. Безперервний процес культивування. Хемостатний та турбідостатний режими безперервного культивування.

Ферментація є визначальною стадією в біотехнологічних виробництвах, протягом якої мікроорганізми ростуть і розмножуються в біореакторах, забезпечуючи накопичення біомаси продуцента і біологічно цінних метаболітів у культуральній рідині.

Біореактор або ферментер – це замкнута або відкрита ємність, в якій за певних умов (тиск, температура, концентрація сухих речовин, рН середовища та ін.) протікають на клітинному або молекулярному рівні контрольованої реакції, здійснюваної за допомогою мікроорганізмів.

Розміри ємності можуть варіювати від 1 дм³ (експериментальний) до 500000 дм³ (для комерційного виробництва). Форма й використаний для конструкції матеріал також різняться, хоча найчастіше ферментери виготовляють у вигляді циліндрів з нержавіючої сталі (рис. 1).

Д. Вивідний отвір. Вміст ферментера перебуває під тиском, тому до нього приєднані манометр і захисний клапан.

Е. У верхній частині ферментера є отвір, через який додають середовище й посівний матеріал (мікроорганізми). Воно також забезпечує доступ для очищення ферментера.

Ж. Глушник – вертикальне ребро на внутрішній стінці ферментера – сприяє посиленню перемішування та гасить утворення вирів при обертанні культури. При цьому підвищується ефективність переносу кисню.

З. Охолоджуюча сорочка знижує температуру, яка підвищується в процесі росту культури завдяки виділенню тепла.

І. Вивідний отвір дозволяє відбирати проби в процесі ферментації, так що процес постійно контролюється. Культивування мікроорганізмів може здійснюватися у відкритій (безперервне культивування) чи закритій системах (періодичне культивування).

Система називається *закритою*, якщо жодна складова частина цієї системи після початку процесу в біореакторі не вводиться і не виводиться.

У періодичному процесі в ферментер спочатку подають всі поживні речовини і посівний матеріал. Процес йде відповідно до кривої росту мікроорганізмів з заключним уповільненням реакції, обумовленим недостатньою кількістю субстрату, накопиченням токсичних метаболітів, несприятливою зміною фізико-хімічних умов навколишнього середовища (рН, температура, парціальний тиск, кисень, в'язкість), загибеллю та лізисом мікроорганізмів.

Періодичний процес включає: а) стерилізацію середовищ, біореакторів та допоміжного обладнання; б) завантаження апарату живильним середовищем; в) внесення посівного матеріалу (клітин, спор); г) ріст культури, який може збігатися в часі з наступним етапом або передувати йому; д) синтез цільового продукту; е) відділення і очищення готового продукту. Мова йде про обмежені в часі послідовності етапів, по закінченні останнього етапу біореактор очищується і його готують до нового циклу.

У *простій гомогенній періодичній культурі* всі її частини знаходяться в однакових умовах. Різні фази росту такої культури відображають зміни в біомасі і в навколишньому середовищі. Етап росту культури включає кілька фаз. У *лаг-фазі* відбувається перепад концентрацій елементів живлення, особливо вуглецевого, від знижених – у накопичувальній культурі, з якої відбирається посівний матеріал, до високих – у свіжому середовищі. У ході *лаг-фазі* бактерії адаптуються до нового середовища існування, і максимальна швидкість росту не досягається. Виснажені клітини старого посівного матеріалу повинні перейти з стану росту при незначній концентрації живильних елементів до фази розмноження, яка визначається необхідними кількістю і станом рибосом, здатністю та умовами до реплікації хромосом, синтезу клітинної стінки і т. д. У цей період у клітинах бактерій можуть, наприклад, синтезуватися нові ферменти, необхідні для засвоєння тих живильних речовин, які присутні в новому середовищі.

Наступна фаза – *логарифмічна*, коли бактерії ростуть із максимальною швидкістю, число бактерій збільшується майже експоненційно, тобто крива росту являє собою майже пряму лінію. У цій фазі зведені до мінімуму всі лімітуючі та інгібуючі впливи (компоненти живильного середовища в надлишку, продукти обміну не накопичилися).

Ріст культур відбувається з максимально можливою швидкістю, генетично закладеною в клітинах. Якщо середовище за своїм початковим складом не оптимальне, то ріст буде обмежений невідповідним живленням або неоптимальним значенням рН і т. д. У цьому випадку ріст може бути описаний більш пологою експонентою або прямою. Ця фаза в лабораторних умовах не може бути тривалою, так як навіть не дуже щільна популяція незабаром почне відчувати нестачу в кисні через його швидке поглинання і слабку розчинність. Фаза уповільнення росту може бути дуже різноманітною і самою складною. Вона може бути повністю відсутньою на простих синтетичних середовищах, коли ріст відразу зупиняється через відсутність одного елемента живлення, особливо – джерел вуглецю та енергії. У ході цієї фази час подвоєння залишається постійним і має мінімальне значення. Згодом ріст колонії починає сповільнюватися, час подвоєння починає збільшуватися, і культура входить у *стаціонарну фазу*, швидкість росту популяції дорівнює нулю й різко зростає конкуренція за харчові ресурси. Утворення нових клітин уповільнюється і потім зовсім припиняється. Будь-яке збільшення числа клітин компенсується одночасною загибеллю інших клітин, тому сумарна чисельність живих клітин залишається постійною. Перехід до цієї фази визначається дією ряду факторів: виснаженням необхідних поживних речовин, нагромадженням токсичних продуктів розпаду, таких як спирт, а у випадку аеробних бактерій ще й обмеженням доступу кисню. Ріст бактерій уповільнюється також при зміні рН. На складних середовищах, що містять кілька джерел вуглецю, може відбуватися почергова їх утилізація та поступове уповільнення росту. При надлишку елементів живлення ріст сповільнюється через накопичення продуктів метаболізму. Токсичні продукти метаболізму у мікроорганізмів вельми різноманітні. Можливо одночасне отруєння та голодування. Відповідно з цим і стаціонарна фаза може містити самі різноякісні клітини: живі, й ті, що голодують, живі, але інгібовані, що відмирають унаслідок голодування або отруєння.

Стаціонарна фаза не характеризує культуру, так як у цей період стан клітин може бути найрізноманітнішим. Тільки експоненційна фаза певною мірою характеризує властивості культури.

Під час останньої фази – *фази уповільнення росту* – зростає швидкість загибелі клітин, і вона стає вищою, ніж швидкість розмноження. Згодом клітини взагалі припиняють відтворюватися.

Біотехнологічно цінні продукти синтезуються в експоненційній фазі (нуклеотиди, багато ферментів, вітаміни – так звані первинні метаболіти) або в стаціонарну фазу росту (антибіотики і т.і. – так звані вторинні метаболіти або ідіоліти). Первинні метаболіти – це продукти метаболізму, необхідні для росту і виживання клітин. Вторинні метаболіти – продукти метаболізму, які не

потрібні для росту та не істотні для виживання. Проте вони виконують корисні функції й часто захищають від дії інших конкуруючих мікроорганізмів або пригнічують їхній ріст.

Деякі з них токсичні для тварин, тому вони можуть використовуватися в якості хімічної зброї. У найбільш активні періоди росту найчастіше вони не утворюються, але починають вироблятися при сповільненні росту, коли стають доступними резервні матеріали. Вторинними метаболітами є деякі важливі антибіотики.

Таким чином, властивості клітин періодичної культури зазнають значних змін протягом усіх фаз росту, зумовлені безперервними змінами навколишнього середовища та швидкою реакцією на них клітин. Проте періодичні методи культивування мікроорганізмів широко використовуються в даний час в промисловій біотехнології і дослідницькій практиці. Техніка періодичної культури дозволяє отримати вихідні дані, та витратні коефіцієнти, і кінетичні характеристики культури, необхідні для переходу до проточних систем і масштабування процесу.

Під час культивування всі параметри безперервно змінюються. Розвиток керованих періодичних процесів призвело до створення *об'ємно-доливної* системи: в процесі культивування головні компоненти середовища додають по частинам, чим виключають субстратне інгібування. Рідкі компоненти з середовища не відводять. Широко застосовують *періодичне культивування з підживленням*: внесення поживного субстрату в реактор до введення в нього біооб'єкту, в процесі культивування в апарат додають поживні речовини через певні проміжки часу порціями або безперервно «по краплях». Іноді додатково вносять біооб'єкти.

Існує також *від'ємно-доливне культивування*, коли частина обсягу з біореактора час від часу вилучається при додаванні еквівалентного об'єму середовища. Це призводить до регулярного омолодження культури і до затримки переходу до фази відмирання. Такий режим культивування значною мірою уподібнюється безперервному процесу, тому називається також напівбезперервним культивуванням. При отриманні мікробних білкових препаратів часто застосовують безперервне культивування як більш економічне і легше контрольоване. Концентрація поживних речовин навколо клітини повинна знаходитись в межах допустимої області і не сприяє побічним реакціям, які можуть призвести до утворення осаду на стінках ферментера.

Відкриті системи працюють в безперервному потоці. Забезпечується безперервний приплив свіжого живильного середовища в біореактор і відтік з нього культуральної рідини з клітинами і продуктами їх життєдіяльності. В одиницю часу субстрату вводять не більше, ніж може переробити культура. Проводять безперервне культивування принаймні з однією лімітуючою різню концентрацією речовини. Регулювання здійснюють підтриманням концентрації біомаси або продукту на постійному рівні шляхом зміни концентрації субстрату (*турбідостат*) або застосування точно лімітованої концентрації поживних речовин з відповідною зміною концентрації клітин або продукту (*хемотрат*).

У *безперервних процесах* культура постійно підтримується в експоненційній фазі росту. Фундаментальним принципом безперервних процесів служить рівновага між приростом біомаси за рахунок поділу клітин і їх зменшенням у результаті розведення свіжим середовищем.

Метод проточного культивування увійшов до промислової біотехнології і базується на процесах хімічної технології. Принцип проточного культивування полягає в тому, що до біореактора, де розмножуються мікроорганізми, безперервно подається свіже живильне середовище і одночасно відбирається такий же обсяг культури. За таким принципом організовуються два різних процеси культивування: процес повного витіснення і процес повного змішування. У першому випадку біореактор для вирощування являє собою тубус, тубулярний ферментер, у який подається живильне середовище і посівний матеріал і відбирається культура. Перемішування не відбувається (рис. 2).

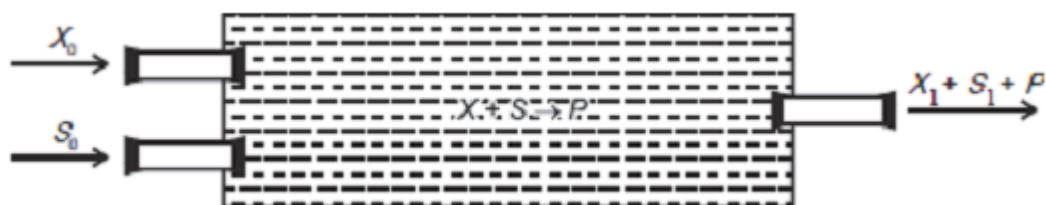


Рис.2. Схема тубулярного біореактору повного витіснення:

концентрація субстрату: S_0 – у середовищі, що подається до ферментеру; S_1 – у середовищі, що відбирається; S – у ферментері; щільність популяції: X_0 – популяції, що є посівним матеріалом, X – у ферментері, X_1 – у культурі, що відбирається; P – продукт.

Подібним чином можна культивувати мікроорганізми, що не потребують аерації. З одного кінця ферментера, куди подається середовище і культура, клітини знаходяться на початку стадії росту; в міру проходження клітинами фаз росту культура «старіє», вичерпується субстрат, накопичуються продукти метаболізму і перед витіканням культура перебуває в стані, аналогічному стаціонарній фазі росту періодичної культури. Таким чином, у ферментері відтворюється повна крива росту, але не в часі, а в просторі.

Фундаментальним принципом безперервних процесів служить рівновага між приростом біомаси за рахунок поділу клітин та їх спадом в результаті розбавлення свіжим середовищем:

$$\mu = D, \text{ де}$$

μ – питома швидкість росту клітин,

D – коефіцієнт розбавлення (швидкість убутку концентрації клітин).

Розрізняють хемостатний та турбідостатний режими безперервного культивування.

У процесі повного змішування ріст відбувається в ємності – ферментері при інтенсивному перемішуванні (рис. 3).

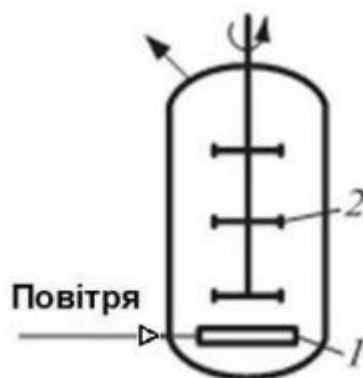


Рис. 3. Ферментер з комбінованим перемішуванням:

1 – барботер; 2 – 3-х ярусна турбінна мішалка.

Перемішування досягається продуванням повітря або роботою мішалки або тим і іншим способом одночасно. У всій масі культури умови повинні бути абсолютно однаковими. Цей метод культивування називається гомогенно-безперервним або гомогенно-проточним.

У ферментері створюються умови, відповідні одній точці кривої росту. При швидкому потоці середовища ці умови близькі до швидкого експоненціального росту, при повільному – наближаються до умов стаціонарної фази. При такому методі культивування може бути відтворена будь-яка періодична культура від початку уповільнення росту після експоненційної фази і до кінця стадії уповільнення. У сталому режимі швидкість потоку середовища дорівнює питомій швидкості росту культури. При цьому культура знаходиться в стійкому стані динамічної рівноваги і володіє здатністю адаптуватися до змін умов.

При *хемостатному режимі* культивування в біореактор з постійною контрольованою швидкістю подають живильне середу, один з компонентів якого надходить у кількості, що не є достатньою для забезпечення максимальної швидкості росту культури. У цьому випадку реактор з біооб'єктом набуває властивості саморегульованої системи, автоматично задовольняє рівності $\mu = D$. Якщо спочатку швидкість розбавлення і вимивання біомаси перевищує швидкість росту клітин, то настає розбавлення культури свіжим середовищем. Це веде до підвищення концентрації компонента, що обмежує ріст, внаслідок чого швидкість росту культури збільшується. Як тільки μ перевищить D , в реакторі починає концентруватися біомаса. Подальше збільшення популяції клітин все активніше призводить до зменшення концентрації живильних елементів у субстраті, його концентрація падає, що, у свою чергу, веде до гальмування росту культури. Таким чином, після серії згасаючих коливань швидкість росту культури стає рівною швидкості росту її розведення.

Біореактор, що працює в хемостатному режимі культивування, називається хемостат. Він включає: 1) пристрій для подачі живильного

середовища; 2) пристосування для відтоку культуральної рідини з клітинами; 3) систему контролю швидкості потоки.

Один з найпростіших варіантів хемостату містить насос, що постійно нагнітає живильне середовище в біореактор, і випускна трубу, по якій рідину з біореактора відбирають, якщо її рівень піднімається вище горловини. Альтернативний варіант – випускна труба входить в порожнину біореактора зверху і нижній обріз її горловини відповідає рівню, вище якого рідина не повинна підніматися. Якщо цей рівень перевищений, надлишок культурального середовища з клітинами відбирається насосом, приєднаним до випускної труби.

Турбідостатний режим культивування заснований на прямому контролі концентрації біомаси. Найбільш поширене вимірювання світлорозсіювання вмісту біореактора з допомогою фотоелементу. Сигнал від фотоелементу управляє швидкістю потоку рідини, що у свою чергу визначає швидкість росту культури. Підвищення концентрації клітин і відповідно світлорозсіювання автоматично призводять до прискорення потоку рідини, що розбавляє культуру, і, навпаки, спад біомаси компенсується уповільненням потоку.

Концентрація клітин може оцінюватися також за непрямими критеріями (по вимірюванню рН, убутку субстрату або накопичення продуктів життєдіяльності).

Безперервне культивування, здійснене в одному біореакторі, позначається як одностадійне. Багатостадійне культивування з послідовним або каскадним розташуванням реакторів дозволяє впровадити принцип диференційованих режимів у безперервні біотехнологічні процеси. Ці диференційовані режими не змінюють один одного в часі, а одночасно здійснюються в послідовно розташованих апаратах. Наприклад, у першому з біореакторів створюють оптимальні умови для росту культури, а в другому – для біосинтезу цільового продукту.

Процеси мікробного синтезу діляться на два типи: 1) процеси, пов'язані з ростом біомаси, що відбуваються паралельно зі швидкістю розмноження клітин, і 2) процеси, що відбуваються або прискорюються при уповільненні швидкості росту клітин.

Оптимізація обох типів процесів здійснюється різними шляхами в залежності від того, наскільки співпадають (або не співпадають) оптимізація швидкості росту зі швидкістю синтезу макромолекул тієї чи іншої природи.

Процес росту – це процес синтезу первинних метаболітів (амінокислот, органічних кислот, вітамінів, нуклеотидів, проміжних продуктів катаболізму) і їх збирання в основні клітинні макромолекули (білки, нуклеїнові кислоти, полімери, що утворюють клітинну стінку).

Ріст і синтез цих продуктів максимальний, коли клітина максимально забезпечена субстратом. У періодичній культурі це має місце в експоненціальній фазі росту. Таким чином, оптимізація процесу накопичення максимальної біомаси клітин у культурі та синтезу первинних продуктів обміну зводиться до оптимізації умов живлення і створенню умов збалансованого росту для культури. Накопичення продуктів обміну, що відбуваються в другій

фазі розвитку культури (кінець лінійної – стаціонарна фаза) – запасних сполук (поліфосфатів, поліцукрів, ліпідів) або вторинних продуктів обміну (антибіотиків, терпенів, стероїдів), має для промислової біотехнології велике значення.

Накопичення запасних сполук у клітинах має місце при незбалансованому рості внаслідок вичерпання із середовища певних елементів живлення і лімітування процесу синтезу основних макромолекул. Синтез вторинних продуктів обміну (ідіолітів) має місце у випадку уповільнення і зупинки росту клітин в кінці розвитку популяції (кінець стаціонарної фази – фаза відмирання), коли відбувається депресія ферментів, які каталізують реакції утворення даних сполук і репресованих на стадії збалансованого росту. Оптимізація процесу синтезу запасних сполук і вторинних метаболітів більш складна, оскільки вимагає спеціальних знань щодо закономірності утворення тих чи інших макромолекул і специфічних підходів у кожному конкретному випадку.

При лімітування росту мікроорганізмів окремими елементами мінерального живлення відбувається уповільнення швидкості росту клітин, що супроводжується значними змінами хімічного складу, головним чином, співвідношення основних і запасних макромолекул. Виявлення принципальних закономірностей цих змін відкриває широкі можливості для спрямованої зміни складу мікробної біомаси та цільового отримання конкретних продуктів мікробіологічного синтезу. Більше того, крім зміни спрямованості біохімічної програми синтезу основних і запасних сполук лімітування росту клітин тим чи іншим мінеральним елементом дозволяє додатково регулювати хімічну структуру окремих сполук, що входять до складу клітин.

Відправним моментом є зміна співвідношення C/N в живильному середовищі. Клітини, лімітовані по азоту і не здатні синтезувати основні сполуки (білки і нуклеїнові кислоти), споживаючи вуглець, спрямовують його на утворення різних безазотистих сполук вуглецевої і ліпідної природи. Якісний склад запасних сполук, синтезованих при лімітуванні росту мікроорганізмів по азоту на фоні збільшення вмісту вуглецю (збільшення відношення C/N), визначається специфікою фізіолого-біохімічних властивостей конкретних мікробних видів, а також штамів.

Завдання складання рівняння для розрахунку швидкості росту популяції може бути вирішено на основі аналізу механізму протікання у клітині процесів, основу яких складають послідовності ферментативних реакцій. Однак цей шлях є практично мало застосовуваним внаслідок того, що досліджених до теперішнього часу внутрішньоклітинних реакцій багато і немає можливості побудувати математичну модель з великою кількістю складних реакцій. Інший шлях вирішення поставленого завдання побудови моделі зводиться до аналізу лише деякого числа змінних, що характеризують розвиток популяції, або кінцевого числа узагальнених ферментативних реакцій, відповідальних за ці змінні. У зв'язку з цим, розробка математичної моделі кінетики зводиться до об'єднання груп процесів, що протікають в клітинах, аналізу впливу факторів середовища на протікання процесів та ідентифікації параметрів моделі.

В якості нижчого рівня при розробці кінетичної моделі зазвичай розглядають дослідження, пов'язані з аналізом внутрішньоклітинних процесів. При цьому достатня глибина розробки кінетичної моделі може бути реалізована при розгляді кінетики росту мікробних популяцій з урахуванням узагальнених ферментативних реакцій, вікової неоднорідності клітинної популяції і фізіолого-біохімічної структури популяції. На більш високому ієрархічному рівні розглядаються кінетичні моделі утилізації субстрату, росту клітин і утворення продукту.

ЛЕКЦІЯ 8

Завершальний етап біотехнологічного виробництва

План

1. Загальна характеристика завершального етапу
2. Концентрування та виділення цільового продукту

Загальна характеристика завершального етапу

Однією з головних завдань завершального етапу біотехнологічного виробництва є виділення та очищення цільового продукту. Завдання очищення цільового продукту ускладнюється тим, що біотехнологу доводиться мати справу з розведеними розчинами та складною сумішшю розчинних позаклітинних метаболітів, продуктів руйнування клітин та компонентів живильного середовища. При концентруванні цільового продукту в процесі виробництва відбувається інгібування росту продуцентів та їх загибель, а на завершальному етапі доводиться здійснювати концентрування цільового продукту. Залежно від типу цільового продукту (біомаса або окремі метаболіти – ферменти, гормони) використовують різні типи концентрування та виділення. Так як продукти в біотехнології мають біологічне походження (ферменти, гормони, вітаміни і т.і.), то в чистому вигляді вони можуть втрачати свою

активність. Для забезпечення її безпеки використовують різні способи стабілізації (сушіння, консервацію).

Так як у процесі виробництва біологічні об'єкти (продуценти) не в змозі повністю використовувати всі компоненти поживних середовищ, крім того, у процесі життєдіяльності вони утворюють велику кількість різноманітних сполук, крім цільового продукту, виникає проблема їх утилізації.

Метод очищення, що застосовується в кожному конкретному випадку визначається як локалізацією цільового продукту, його молекулярної масою, так й масштабом виробництва. Так, для виділення гормонів, інтерлейкінів та інших дорогих препаратів використовують хроматографічні методи, які не вигідно використовувати у промислових масштабах.

Отже, завершальний етап біотехнологічного виробництва включає: концентрування, виділення та очищення цільового продукту, його стабілізацію та фасування, а також утилізацію побічних продуктів.

Концентрування та виділення цільового продукту

Характеристика цільових продуктів

Як правило, цільовий продукт міститься в культуральному середовищі. У процесі культивування продуцентів склад культурального середовища досить сильно змінюється. У ньому присутні клітини-продуценти, екзометаболіти – речовини, що виділяються продуцентами в процесі росту, залишки поживних речовин, продукти руйнування продуцентів. Слід зазначити, що склад екзометаболітів може бути дуже різноманітним і залежить від клітин-продуцентів та особливостей їх культивування.

До складу екзометаболітів входять: білки, вуглеводи, ліпіди, ферменти, амінокислоти та вітаміни. Отже, культуральне середовище є сумішшю: клітин, фрагментів зруйнованих клітин, макромолекул і солей. Залежно від особливостей біотехнологічного процесу культуральне середовище відрізнятиметься за концентрацією клітин, метаболітів та інших компонентів, в'язкості та кольору, і це визначатиме вибір способу виділення цільового продукту. Однак у будь-якому випадку ми маємо справу з розбавленими водними розчинами чи суспензіями, що містять від 0,1 до 5 г/л речовин. Цим пояснюється необхідність проведення процедури концентрування цільового продукту.

Концентрування зводиться до зменшення вмісту води у зразках і, отже, збільшення вмісту цільового продукту.

Необхідно відзначити, що концентрування цільового продукту може розглядатися і як один із способів його виділення.

В даний час використовують різні способи концентрування і вибір способу залежить від особливостей цільового продукту. Наприклад, цільовим продуктом можуть бути біомаса клітин, екзометаболіти, ендометаболіти. Так як розмір компонентів є важливим критерієм у виборі способів концентрування та виділення цільового продукту, наведемо приклад умовної градації нерозчинних у воді частинок за розмірами.

1. Великі частки від 0,1 до 1 мм
2. Дрібні частки від 0,01 до 0,1 мм

3. Інфрадрібні частинки від 0,001 до 0,01 мм
4. Високомолекулярні речовини від 10 до 1000 нм
5. Низькомолекулярні речовини від 0,1 до 10 нм

Центрифугування (сепарування) та упарювання

Найбільш універсальним способом концентрування є упарювання (видалення води). При цьому видаляються молекули води та невелика кількість летких речовин. Необхідно враховувати, що при упарюванні температура середовища не повинна перевищувати критичної температури, при якій цільовий продукт втрачатиме свою активність або руйнуватиметься. Для усунення цього використовують вакуумні установки. Упарювання та подальше сушіння застосовується тоді, коли отримують білково-вітамінний концентрат.

Набагато частіше при концентруванні використовують такі способи як: седиментація, фільтрування, сепарування, центрифугування та флотація.

Використання зазначених способів забезпечує як концентрування, так і часткове очищення цільового продукту.

Так, для виділення великих та дрібних частинок доцільно використовувати седиментацію, сепарування або центрифугування. Всі ці способи засновані на осадження частинок у рідкому середовищі.

Седиментація – це осадження частинок у полі гравітаційних сил. На швидкість седиментації (осадження) впливають розміри частинок, в'язкість середовища. Чим більші розміри частинок, тим швидше вони осідають у природному гравітаційному полі.

Седиментація може використовуватися у разі первинного осадження клітинної маси і тільки в тому випадку, якщо клітини відносно великі та в'язкість розчину невелика. Так можна концентрувати клітини дріжджів. Однак у цьому випадку опади, що одержуються, досить пухкі і вимагають додаткового ущільнення і зневоднення. Для цього використовують центрифугування чи сепарування. При цьому швидкість осадження значно зростає за рахунок відцентрових сил. В даний час існує досить велика кількість промислових центрифуг та сепараторів, які забезпечують ефективне осадження цільового продукту, при цьому одержують пастоподібний продукт. У цьому випадку можна видалити від 60 до 75% рідкої фази, відділення рідкої фази від осаду, що утворився, здійснюють декантацією. Для цього використовують різні типи насосів чи спеціальні системи переливу. Ефективність осадження частинок у відцентровому полі залежить не тільки від маси частинок, що осаджуються, їх радіусу і швидкості обертання, а й від в'язкості середовища. В'язкість культурального середовища збільшується у тому випадку, якщо продуценти виділяють у середовище полісахариди або велику кількість білка. У такому випадку до центрифугування культуральне середовище додатково розводять водою і тільки після цього проводять центрифугування, що значно збільшує обсяг роботи і собівартість продукту.

Залежно від виділених речовин застосовують різні типи центрифуг, що відрізняються конструкціями роторів. У разі роботи з великими обсягами застосовують центрифуги безперервної дії або центрифуги шнекові.

У ряді випадків доцільно здійснювати процедуру, спрямовану на формування агрегатів компонентів (клітин чи молекул), що виділяються. При цьому спрощується процедура осадження центрифугуванням або сепаруванням, оскільки можна значно зменшити кількість обертів обертання ротора або час осадження.

Попередня обробка середовища для подальшого виділення цільового продукту може включати: теплову обробку, зміну величини рН, додавання осаду та ін.

Якщо агрегати формуються досить добре або вони формують великі комплекси, можна обійтися без центрифугування, замінивши його звичайним осадженням шляхом відстоювання. При відстоюванні на відміну від центрифугування, осад цільового продукту, що формується, досить пухкий, що ускладнює процес декантації. У такому випадку для видалення рідини використовують різні пристосування – вакуумні насоси або ділильні лійки. Остаточне формування щільного осаду здійснюють методами центрифугування або фільтрування, але попереднє відстоювання значно зменшує об'єм рідини, що центрифугується. Для цього використовують різні типи центрифуг.

Фільтрування та флотація

Особливості фільтрації

Великі асоціати можуть бути зібрані і методом фільтрації на спеціальних великих фільтрах – тканинних, сітчастих, волокнистих фільтрах або ситах. Умови фільтрації, як і центрифугування, залежать від характеристик продуктів і підбираються для кожного зразка індивідуально.

Якщо кількість матеріалу, що фільтрується, невелика, то його можна сконцентрувати на рамковому фільтрі-пресі. У цьому випадку осад періодично знімають із фільтра. У великомасштабному виробництві використовують безперервне фільтрування. Для цього застосовують ротаційні (барабанні) вакуум-фільтри. Осад накопичується на фільтрі і після цього знімається з фільтра спеціальним шнуром або ножом.

При фільтруванні невеликих обсягів рідини застосовують метод фільтрації, за якого безперервний паралельний фільтру потік рідини виносить масу, що накопичується на фільтрі. При цьому способом фільтрації вдається підвищити концентрацію цільового продукту в 10 і більше разів.

Фільтруючі властивості залежать від попередньої обробки суспензії та умов фільтрування. На швидкість фільтрування впливає величина рН. Попередня теплова обробка суспензії може значно знизити питомий опір осаду за рахунок коагуляції білків.

Як правило, фільтрування використовується у поєднанні з іншими методами концентрування.

Поряд з різними способами осадження можна використовувати такий спосіб концентрування цільового продукту як флотацію. Так, частки можуть вибірково прилипати до бульбашок повітря (у процесі аерації) і переходити в піну. Отже, піна збагачується цими частинками. Збираючи її, ми в такий спосіб отримуємо концентрат цих речовин.

Для забезпечення флотації розроблено різні флотатори – речовини, які усувають змочування молекул та забезпечують їх концентрування на поверхні рідини. При використанні флотації рідина відкачується насосом, а частинки, що флотували, концентрують центрифугуванням або сепаруванням. Це в десятки разів зменшує обсяг центрифугованої рідини.

Характеристика флокулянтів

Як зазначалося, культуральне середовище, у якому культивують продуценти, є складної дисперсної системою. Така складна гетерогенна система характеризується агрегаційною та седиментаційною стійкістю, що визначає в якій формі будуть знаходитися компоненти середовища, у вигляді окремих структур і молекул або у вигляді багатокомпонентних агрегатів.

Здатність окремих клітин та сполук формувати агрегати залежить від різних факторів:

- 1) розміри, форма, зарядні характеристики – генетичні особливості клітин;
- 2) фактори середовища – температура, в'язкість середовища, величина рН, концентрація цільового продукту, концентрація іонів у середовищі та ін;
- 3) наявність чинників, що впливають на регулювання колоїдно-хімічних властивостей дисперсних систем, тобто наявність коагулянтів чи флокулянтів (поверхнево-активних сполук).

Отже, під час підбору флокулянтів необхідно враховувати роль перелічених чинників у процесі флокуляції.

Флокулююча дія залежить від природи полімеру, що використовується як флокулянт, його молекулярної маси і заряду, умов введення реагенту в систему, характеристик культурального середовища.

Флокулянти сорбуються чи хімічно зв'язуються з поверхнею макромолекул. Високу флокулюючу властивість мають поліелектроліти, при цьому лінійні полімери мають кращі властивості, ніж клубкоподібні макромолекули. Ефекти флокуляції пояснюються утворенням полімерних містків між макромолекулами та флокулянтами.

В даний час розроблено велику кількість синтетичних флокулянтів. Більшість з них отримана полімеризацією та кополімеризацією вінілових мономерів (вінілацетат, вінілхлорид, акриламід, метакрилова кислота, вінілпіролідон та ін.)

Поряд із хімічними існують і природні флокулянти. Їх одержують шляхом хімічної модифікації природних полімерів – крохмалю, альгінату натрію, похідних целюлози.

Одна з головних вимог до флокулянтів – це відсутність токсичності. Природні флокулянти мають ряд переваг перед хімічними флокулянтами. Вони здатні до біодеградації, нетоксичні, та їх відносно легко отримати.

Слід зазначити, що застосування флокулянтів дозволяє інтенсифікувати процеси фільтраційного, сепараційного відділення біомаси від культуральної рідини. Так, використання хітозану в концентраціях 0,001-0,003 мг/л середовища в якості флокулянту дозволяє осадити більше 99% клітин – *Staphylococcus*

aureas, що забезпечує отримання позаклітинного білка, який застосовується у виробництві імунодіагностичних препаратів.

Використання флокулянтів може забезпечити селективне виділення ферментів із культурального середовища. У процесі культивування клітини можуть нагромаджувати ліпідні компоненти. Якщо ліпідів у клітині досить багато, такі клітини швидко флотують на поверхню водної фази в процесі центрифугування, їх можна зібрати з поверхні рідкої фази і таким чином отримати концентрат цільового продукту. Відомо, що сахароміцети (клітини дріжджів) здатні флотувати, що використовується для концентрування їхньої біомаси.

У тому випадку, якщо цільовий продукт представлений не великими і дрібними частинками, а інфрадрібними частинками та високомолекулярними речовинами, то система концентрування та очищення ускладнюється. Для вирішення цього завдання необхідно використовувати кілька стадій очищення.

На першій стадії видаляють цілі клітини та великі агрегати, концентрують необхідні макромолекули, і надалі використовують різні системи вилучення та очищення цільових продуктів, таких як екстракція, сорбція та хроматографія.

Методи екстракції

Якщо цільовим продуктом є метаболіти клітини, то їх з клітини витягують екстракцією. Як екстрагент найчастіше застосовують органічні розчинники. Так, зокрема, одержують антибіотики.

Багато антибіотиків добре розчиняються в органічних розчинниках та не розчиняються у воді. Для отримання антибіотиків зазвичай використовують багатостадійні екстракції.

На першій стадії з водної фази переводять сполуки в органічну фазу, потім із цієї фази переводять у нову фазу, при цьому забезпечується як концентрування, так і очищення цільового продукту.

При отриманні пеніциліну (1 л живильного середовища міститься 35 г антибіотика) видаляють біомасу міцелію фільтруванням. Оскільки рН пеніциліну знаходиться в діапазоні 2,5-3,1, то культуральне середовище доводять до рН 2,0-3,0, після чого проводять екстракцію органічними розчинниками. Для цього використовують протиточний розподіл у системі культуральне водне середовище-амілацетат (або бутилацетат) щодо 10:1 (v /v). При цьому в органічну фазу переходить практично весь пеніцилін. Для додаткової очистки проводять ще одну екстракцію води розчином фосфатного буфера (рН 5-7,5). Антибіотик отримують у вигляді натрієвої солі осадженням з водно-бутанолової суміші. За такою ж схемою виділяють еритроміцин; бадитрацин та ін. антибіотики.

Якщо потрібно виділити нативні білкові молекули (ферменти), то використовують водні системи, що не змішуються. Прикладом може служити система декстран-поліетиленгліколь (ПЕГ-6000).

Нині у промисловості застосовуються протиточні апарати (екстрактори) безперервної дії. Для утворення двох водних фаз використовують водяні розчини двох несумісних полімерів. Фази, що утворюються, містять не менше

75% води. З багатьох досліджених систем найкращою виявилася система ПЕГ-декстран. Для цієї системи коефіцієнт розподілу [$K = e(\text{ПЕГ-фаза})/(\text{декстранова фаза})$] для великої кількості ферментів лежить у діапазоні від 1,0 до 3,7. Для зміни коефіцієнта розподілу до системи вносять різноманітні солі. Отже, змінюючи склад, можна регулювати коефіцієнт розподілу.

Сорбція

При виділенні метаболітів застосовують і такий спосіб, як сорбцію. З сорбентів найбільш відомими є активоване деревне вугілля, силікагель, целюлоза. Один із головних критеріїв сорбентів – це велика питома поверхня. Як приклад можна навести активоване вугілля, у якого 1 г має поверхню від 600 до 1700 м², чим пояснюється його висока сорбційна здатність.

Сорбція використовується при виділенні аміноглюкозного антибіотика – стрептоміцину. Сорбційний метод можна використовувати у кількох різновидах. Так, сорбенти можуть використовуватися у вигляді хроматографічних колонок або вносити безпосередньо в культуральне середовище. При внесенні сорбенту він зв'язує речовини з середовища, після чого сорбент з речовиною може бути легко зібраний фільтрацією або центрифугуванням. Потім проводиться десорбція – відмивання метаболіту від сорбенту. Це зручний спосіб виділення та концентрування цільових продуктів, представлених високомолекулярними речовинами.

Найбільш поширений спосіб сорбції заснований на використанні іонообмінників, які є дисоціюючими іонними парами, при цьому один з іонів іммобілізований. Роль іонообмінників можуть виконувати розчинні полімери, що утворюють водні двофазні системи. Для цього використовують похідні поліетиленгліколю, які мають катіоно- або аніонообмінні властивості.

Молекулярні цільові продукти можуть бути осаджені з культурального середовища за допомогою різних реагентів – осадників. Такі безреагентні способи осадження як центрифугування або сепарування в даному випадку не підходять, так як маємо справу з частинками занадто малої маси. При використанні осадників виділені молекули формують досить великі агрегати, які відносно легко можуть бути осаджені традиційними методами осадження.

Білки з культурального середовища виділяють висолюванням, зміною рН до ізоелектричної точки, зниженням діелектричної проникності розчину, зниженням ступеня сольватації білкових молекул.

Методи осадження білків зводяться до таких змін умов, за яких порушується стійкість вихідної термодинамічної стабільності розчину білка, що супроводжується осадженням білка. До методів, що призводять до зменшення розчинності білка, належать: 1) додавання концентрованих розчинів солей (висолування); 2) зміна рН до такої величини, коли заряд молекули дорівнює нулю; 3) зниження діелектричної проникності середовища, що супроводжується посиленням електростатичних взаємодій між молекулами та випаданням їх в осад; 4) додавання неіонних полімерів, які знижують ступінь сольватації білків; 5) додавання солей багатозарядних іонів металів, що оборотно осаджують білки.

При висолюванні найчастіше використовують концентровані розчини солей. Традиційно найчастіше як висолюючий агент застосовується сульфат амонію, проте може бути замінений й на інші іони.

У тому випадку, якщо з культурального середовища необхідно осадити полісахариди (декстран, ксантан та ін.), це роблять з використанням етанолу або ацетону, а альгінати осаджують хлористим кальцієм, який формує гелі.

Хроматографічні методи виділення

При концентруванні та виділенні окремих молекул може використовуватися і хроматографічний метод поділу, який застосовується на етапах очищення.

Варіанти хроматографічних методів поділу дуже різноманітні: гель-фільтрація, іонообмінна хроматографія, афінна хроматографія та ін.

Гель-фільтрація застосовується для поділу сумішей, що розрізняються за молекулярною масою. Невеликі за розміром молекули здатні проникати в гель, тому вони повільніше проходять через колонку, тоді як великі молекули виходять з колонки першими. Отже, ефект поділу в цьому випадку заснований на різниці часу проходження через колонку речовин, що розділяються.

При іонообмінній хроматографії молекули зв'язуються із носієм за рахунок електростатичних взаємодій. Їй надалі здійснюють елюцію білків (або інших молекул) використовуючи буферні розчини зі зростаючою іонною силою. Першими із колонки виходять білки слабо пов'язані з сорбентами (у разі сорбенту часто використовується катіонообмінник – карбоксиметилцелюлоза).

Афінна хроматографія (хроматографія за спорідненістю) заснована на використанні високої специфічності зв'язування природних сполук, зокрема антитіло-антиген, фермент-субстрат, лектин-рецептор. Цей вид хроматографії використовується для виділення моноклональних антитіл чи окремих ферментів. Так, для виділення з клітин ферменту ДНК-полімерази (забезпечує синтез ДНК) методом афінної хроматографії готують носій (агарозу, сефарозу або інший) так, що до носія хімічно «прив'язують» інгібітор ДНК-полімерази. Пропускання багатокомпонентного розчину через таку колонку призводить до того, що з нерухомою фазою колонки високоспецифічно зв'яжуться тільки молекули ДНК-полімерази (вони специфічно зв'язуються з інгібітором ДНК-полімерази). Всі молекули, що залишилися, пройдуть через колонку вільно (вони не пов'язані з інгібітором). Після чого пов'язаний фермент (ДНК-полімераза) з колонкою елюють відповідним агентом та отримують чистий продукт. Після розробки технології отримання моноклональних антитіл афінна хроматографія почала інтенсивно розвиватися. В даний час можна отримати моноклональні антитіла до будь-якого білка. На основі моноклональних антитіл можна зробити хроматографічну колонку та виділити у чистому вигляді відповідний білок, до якого отримані антитіла.

Якщо у традиційних методах хроматографії поділ речовин здійснюється на стадії десорбції шляхом зміни рН, концентрації солей, то у разі афінної хроматографії поділ молекул здійснюється на стадії адсорбції – зв'язування з носієм. У цьому сенсі афінна хроматографія наближається до методу сорбції. З

цього впливає, що в афінній хроматографії необхідно проводити зв'язування до насичення зв'язуючого агента.

Застосування афінної хроматографії доцільно у разі роботи з дорогими та невеликими за обсягом зразками, тобто унікальними препаратами.

При концентруванні та виділенні низькомолекулярних речовин використовують мембранну фільтрацію чи ультрафільтрацію. В даний час ведуться інтенсивні розробки в мембранних технологіях, і цей спосіб є досить перспективним у біотехнології. Він заснований на фільтрації багатокомпонентних сумішей через полімерні мембрани зі спеціально створеним розміром пор. Використовуючи послідовно різні типи мембран з діаметром пір від 5 до 60 нм можна розподілити суміші на окремі компоненти. Враховуючи те, що полімери різняться за своїми розмірами, можна підібрати такі типи мембран, які дозволяють виділити той чи інший тип молекул.

При мембранній фільтрації може формуватися примембранний поляризаційний шар, який буде створювати опір масопереносу.

Для зняття цього опору вдаються до регуляції тиску приймача, що прискорює процес фільтрації.

Мембранна фільтрація знаходить застосування у технології очищення амінокислот, інтерферону, гормону росту та інших біологічно активних речовин

Всі способи концентрування та виділення цільових продуктів можуть бути поділені на дві групи: безреагентні (сепарування, центрифугування, фільтрація, хроматографія) та з використанням реагентів (коагуляція, флокуляція, флотація) – реагентні методи.

Безреагентні методи дозволяють забезпечити чистоту одержуваного цільового продукту. Однак ефективність та витрати на використання цих методів не завжди задовольняють виробників. Фільтрування часто має низьку продуктивність, що пов'язано з необхідністю очищення фільтрів від матеріалу, що фільтрує.

Реагентні методи знайшли досить широке застосування в різних галузях, де використовується концентрування та зневоднення середовищ, що пов'язано з високою ефективністю, простотою використовуваного обладнання. Однак це можливе лише за наявності високоефективних нетоксичних реагентів.

Підбір методів концентрування залежить від характеру конкретної задачі, найбільш ефективним є поєднання різних методів концентрування та виділення продукту.

Очищення цільового продукту

Хоча цільові продукти в біотехнології досить різноманітні: клітини, очищені молекули, біосенсори, вони представлені двома різновидами – біомасою клітин та виділеними метаболітами або екзометаболітами клітин. Для цільових продуктів використовуються різні технічні прийоми. Коли цільовим продуктом є клітини, то говорять про отримання біомаси клітин. У такому разі завдання зводиться до відділення клітин від культурального середовища. Клітини концентрують одним із зазначених способів (сепаруванням, центрифугуванням, фільтрацією та ін.), а культуральне середовище з його

вмістом у разі виділення екзометаболітів обробляється за вказаною схемою і з нього отримують цільові продукти у вигляді екзометаболітів. У тому випадку, якщо культуральна середовище не використовується, тоді вона є побічним продуктом.

Залежно від характеристики клітин використовують різноманітні технологічні режими очищення.

Вибір способу очищення клітинної біомаси залежить від характеристики клітин (розмір, маса, концентрація та ін.), характеристики культурального середовища (в'язкість, компоненти середовища та їх концентрації), області застосування цільового продукту (корм тварин, їжа людей, медицина або подальша переробка) та рентабельності.

Так, отримання хлібопекарських дріжджів – цукроміцетів на основі вуглеводнів концентрують флотацією (вони легко флотирують), після цього клітини збирають фільтруванням на барабанних вакуум-фільтрах. Біомасу, зібрану з фільтра, пресують і отримують здатну до зброджування живу біомасу клітин.

Якщо необхідно очистити біомасу дріжджів, яку вирощують на метанолі, то першим етапом очищення є сепарація. Так як клітини різняться між собою за масою і розміром, щоб отримати очищення на 80-90% необхідно користуватись двома-трьома ступенями сепарації.

Завдання очищення досить сильно ускладнюється, якщо необхідно виділити дрібні клітини бактерій чи їх спори. У таких випадках вміст реактора упарюють за умов, які забезпечують високу біологічну безпеку клітин (низька температура та вакуум).

Однак при цьому до складу цільового продукту входять супутні продукти, що містяться в культуральному середовищі. Необхідно відзначити, що сьогодні залишається актуальною розробка нових способів очищення біомаси клітин продуцентів.

Завдання отримання та очищення цільового продукту у вигляді окремих метаболітів значно складніше, ніж отримання біомаси.

При виділенні цільового продукту із культурального середовища (екзометаболіти) насамперед видаляють клітини-продуценти. Для цього використовують сепарування, фільтрацію чи флотацію. З очищеного культурального середовища витягують цільовий продукт. Залежно від його властивостей та характеристик використовують методи осадження (використовуючи для цього спирти, органічні розчинники або висолюючи, додаючи натрію сульфат або інші солі) або хроматографії. При отриманні метаболітів як цільовий продукт використовують кілька стадій очищення, що дозволяє отримати кінцевий продукт у чистому вигляді. Кількість стадій та способи очищення є індивідуальними для кожного продукту.

Так при отриманні амінокислот, цільовий продукт можна отримати тільки шляхом кристалізації з розчинів, які попередньо очищають, використовуючи хроматографію (катионобмінну з підбором рН середовища).

У разі отримання ферментів (які містяться в культуральному середовищі) найчастіше використовують екстракцію, осадження з розчину, вилуговування, переосадження та ліофілізацію.

Останнім часом частіше починає використовуватися ультрафільтрація через мембрани з необхідним розміром пір. Використовуючи серію послідовних фільтрацій через пори різного діаметра можна досягти високого ступеня чистоти цільового продукту.

В даний час розробляється новий метод виділення метаболітів з рідких середовищ, який заснований на комбінованому застосуванні розчинних полімерів з функціональними групами та мембранною фільтрацією. Суть цього підходу полягає в тому, що розчинний полімер оборотно зв'язується з низькомолекулярними компонентами розчину, які є цільовими продуктами (амінокислоти, антибіотики). Отриманий комплекс легко концентрується за допомогою мембранної фільтрації, а потім цільовий продукт звільняється від полімеру.

Досить часто як цільовий продукт використовують ендометаболіти, тобто, метаболіти клітини. Як приклад можна навести гормони, інтерферон та інші біологічно активні речовини, які одержують технологією рекомбінантних ДНК.

Першим етапом у виділенні метаболітів клітини є очищення клітин від середовища та руйнування клітинних оболонок (дезінтеграція біомаси). І тому використовуються різні методи: механічні, хімічні, ферментативні чи комбіновані. *Механічні методи* засновані на використанні гомогенізації, ультразвукової обробки, послідовного заморожування – відтаювання.

Хімічні методи передбачають використання різних розчинників, зокрема детергентів, а *ферментативні* – використання ферментів, що руйнують оболонку клітин. Після руйнування клітин виділяють необхідні метаболіти, використовуючи той самий арсенал методів, який використовують при виділенні екзометаболітів.

Однак за необхідністю отримання метаболітів фармакопейних препаратів, що відповідають за чистотою, використовують афінну хроматографію на основі моноклональних антитіл.

Промислове виробництво моноклональних антитіл (гібридомна технологія) дало потужний поштовх розвитку виробництва чистих препаратів, включаючи технологію рекомбінантних ДНК. Цей підхід дозволяє отримати в один етап чистий фармакопейний продукт.

Оскільки всі продукти біотехнологічного виробництва мають ряд особливостей і не стабільні, виникає необхідність стабілізації цільового продукту або зберігання його властивостей у часі.

Стабілізація та фасування цільового продукту

Як уже зазначалося, вимоги до цільового продукту залежать від сфери застосування. Так, якщо біомаса використовується в тваринництві як вітамінно-білкова добавка, то вона, як правило, висушується, фасується в мішки і поставляється замовнику.

Якщо цільові продукти використовуються як харчові добавки, то вони повинні проходити мікробіологічний контроль, оцінку специфічної поживної цінності та обґрунтування термінів зберігання. Для збільшення термінів зберігання, які визначаються часом безпеки основних властивостей продукту, розробляються методи стабілізації. Стабілізація цільового продукту має вирішувати кілька завдань:

- забезпечення стерильності;
- збереження стабільності;
- рентабельність та зручність при транспортуванні.

Найбільш поширеним способом стабілізації цільового продукту є його кристалізація та сушіння.

В даний час існує велика кількість різноманітних сушильних агрегатів, що дозволяє вибрати економічно обґрунтовану систему сушіння. У біотехнології найбільш широке застосування знаходять розпилювальні та вакуумні системи сушіння цільового продукту. Це пояснюється тим, що в біотехнології доводиться висушувати продукти з розбавлених розчинів та використовувати відносно низьку температуру розігріву.

Якщо цільовий продукт повинен зберігатися в розчині, то всі процеси його очищення проводять із суворим дотриманням асептичних умов і з включенням до його складу антиокислювачів, а в ряді випадків і консервантів. Однак їх використання має бути обґрунтованим та нешкідливим. Усі етапи, як і стадія стабілізації біотехнологічних процесів, виконуються відповідно до затверджених технологічних умов.

Ще одним способом стабілізації біологічних продуктів є процес заморожування. Однак для ряду білків була показана втрата активності після заморожування-відтавання. Було показано, що заморожування-розморожування веде до денатурації білків. Ще в 50-х роках ХХ століття було доведено, що існують речовини, які можуть забезпечити стабілізацію білків і тим самим зберегти їхню структуру після заморожування-відтавання. Ці речовини були названі кріопротекторами. Як кріопротектори використовують гліцерин, диметилсульфоксид, глюкозу, сахарозу, лактозу та ін.

Необхідно відзначити, що стабілізація біополімерів у водних розчинах залежить від структури води. Як приклад можна навести стабілізуючий ефект сульфату амонію. Сульфат амонію, який здійснював висолювання білків (формування осаду), забезпечував тривалу безпеку імуноглобулінів у вигляді паст при 4°C.

Стабілізація та консервування біотехнологічних продуктів поряд з перевагами має й низку недоліків:

- 1 – висока вартість утримання запасів заморожених продуктів;
- 2 – високий ризик втрати всього матеріалу при виході з ладу холодильних агрегатів;
- 3 – висока вартість транспортування у замороженому стані цих продуктів.

Ще одним підходом стабілізації біологічних продуктів є процедура заморожування-висушування.

Заморожування-висушування, або сублімаційне сушіння є одним із найбільш застосовуваних методів стабілізації фармацевтичних препаратів, діагностичних реагентів, які характеризуються низькою термостабільністю (тобто стійкістю до високої температури).

Цей спосіб стабілізації має ряд переваг перед заморожуванням-відтаванням:

1. Дозволяє забезпечити дуже низький вміст води та найвищу стабільність продукту.

2. Оскільки після сушіння продукт запечатують у контейнер у вакуумі або серед інертного газу, це зводить до мінімуму окислювальні процеси.

Поряд з цим не всі продукти можуть бути піддані сублімаційному сушінню, оскільки у ряді випадків у процесі охолодження утворюється поверхнева плівка, що гальмує процес сублімації.

Розглянемо кілька прикладів стабілізації біотехнологічних продуктів.

Інсулін зберігає свою активність при зберіганні у водному розчині ацетату натрію, тому немає необхідності його зберігання в замороженому стані. У той самий час гормон росту людини (ГРЛ) не стабільний у рідкому стані і для нього був розроблений спосіб заморожування-висушування. Для підвищення стабільності у розчині ГРЛ вводиться манітол 0,5% концентрації на 25 мМ сольовому розчині, заморожується і висушується з замороженого стану.

Отже, процедура стабілізації біологічних продуктів вимагає підбору особливих методів кожного продукту з урахуванням комплексу специфічних чинників. В даний час ведуться нові дослідження та розробки стабілізації та зберігання цільових продуктів.

Процес упаковки готової продукції має забезпечувати збереження стерильності, стабільності, надійності та зручності при транспортуванні.

ЛЕКЦІЯ 9

Виробництво мікробіального білка

План.

1. Продуценти для виробництва мікробіального білка
2. Субстрати для культивування мікроорганізмів для одержання білка
3. Принципова технологічна схема отримання кормової біомаси

Відповідно до норм харчування людина має щодня отримувати з їжею від 60 до 120 г повноцінного білка. Для підтримки життєвих функцій організму, побудови клітин та тканин необхідний постійний синтез різних білкових сполук. Якщо рослини та більшість мікроорганізмів здатні синтезувати всі амінокислоти з вуглекислого газу, води, аміаку та мінеральних солей, то людина і тварини не можуть синтезувати деякі амінокислоти (валін, лейцин, ізолейцин, лізин, метіонін, треонін, триптофан та фенілаланін). Ці амінокислоти

називаються незамінними. Вони мають надходити з їжею. Їх нестача викликає тяжкі захворювання людини та знижує продуктивність сільськогосподарських тварин.

Нині світовий дефіцит білка становить близько 15 млн.т. Найбільш перспективним є мікробіологічний синтез. Якщо для великої рогатої худоби потрібно 2 місяці для подвоєння білкової маси, для свиней – 1,5 місяці, для курчат – 1 місяць, то для бактерій та дріжджів – від 1 до 6 годин. Світове виробництво харчових білкових продуктів з допомогою мікробного синтезу становить понад 15 тис. т на рік.

Розглянемо приклад: час подвоєння кишкової палички становить 20 хв, тоді через 20 хв із однієї клітини утворюється дві дочірніх, через 40 хв – чотири «онуки», через 60 хв – вісім «правнучок», через 80 хв – 16 «праправнучок». Через 10 год 40 хв із однієї бактерії буде утворено понад 6 млрд. бактерій, що відповідає населенню Землі, а через 44 год із однієї бактерії масою $1 \cdot 10^{-12}$ г утворюється біомаса у кількості $6 \cdot 10^{24}$ г, що відповідає масі Землі.

Використання різних мікроорганізмів як джерела білка і вітамінів обумовлено такими *факторами*:

а) можливістю використання для культивування мікроорганізмів різноманітних хімічних сполук, зокрема відходів виробництв;

б) щодо нескладної технології виробництва мікроорганізмів, що може здійснюватися цілий рік; можливістю його автоматизації;

в) високим вмістом білка (до 60-70%) та вітамінів, а також вуглеводів, ліпідів у мікробіальних препаратах;

г) підвищеним вмістом незамінних амінокислот, порівняно з рослинними білками;

д) можливістю спрямованого генетичного впливу на хімічний склад мікроорганізмів з метою вдосконалення білкової та вітамінної цінності продукту.

Для отримання білків використовуються дріжджі, бактерії, водорості та міцеліальні гриби.

Перевагою дріжджів перед іншими мікроорганізмами є їхня технологічність: стійкість до інфекцій, легкість відокремлення від середовища завдяки великим розмірам клітин. Вони здатні накопичувати до 60% білка, багатого на лізин, треонін, валін і лейцин (цих амінокислот мало у рослинних кормах). Масова частка нуклеїнових кислот становить до 10%, що шкідливо діє на організм. В результаті їх гідролізу утворюється багато пуринових основ, що перетворюються потім на сечову кислоту та її солі, які є причиною сечокам'яної хвороби, остеохондрозу та інших захворювань. Оптимальна норма добавок дріжджової маси до корму сільськогосподарських тварин становить від 5 до 10% сухої речовини. Дріжджі застосовуються для харчових та кормових цілей.

Перевагами бактерій є висока швидкість росту та здатність синтезувати до 80% білка. Отриманий білок містить багато дефіцитних амінокислот: метіоніну та цистеїну. Недоліками є невеликі розміри клітин та низька їх концентрація в культуральному середовищі, що ускладнює процес виділення. У

деяких бактеріальних ліпідах можуть бути токсини. Масова частка нуклеїнових кислот до 16%. Використовуються лише для кормових цілей.

Перевагами водоростей є високий вміст повноцінного за амінокислотним складом білка, що накопичується в кількості 65%, легке виділення водоростей з культурального середовища, низький вміст нуклеїнових кислот – 4% (для порівняння – у вищих рослин 1-2%). Водорості використовуються для харчових та кормових цілей.

Мицеліальні гриби традиційно використовуються в якості харчового продукту в країнах Африки, в Індії, Індонезії, Китаї та ін.

У виробництві харчових продуктів розглядаються три основні *форми використання мікробного білка*:

- 1) цілісна маса (без руйнування клітинних стінок);
- 2) частково очищена біомаса (передбачається руйнування клітинних стінок та видалення небажаних компонентів);
- 3) виділені із біомаси білки (ізоляти).

ВООЗ (Всесвітня організація охорони здоров'я) зробила висновок, що білок мікроорганізмів можна використовувати в продуктах харчування, але допустима кількість нуклеїнових кислот, що вводяться разом із білком у діту дорослої людини, не повинна перевищувати 2 г на добу. Введення мікробіального білка не викликає негативних наслідків, але трапляється прояв алергічних реакцій, шлункові захворювання тощо.

Використання дріжджів для виробництва білка

Наприкінці 19 століття в Німеччині була розроблена технологія виробництва хлібопекарських дріжджів, під час першої світової війни дріжджі почали використовувати як харчову добавку у виробництві супів і ковбас, а також почала розвиватися технологія виробництва кормових дріжджів.

До цього часу культивування пивних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae (carlsbergensis)* залишається важливим резервом харчового білка та вітамінів.

Організм людини засвоює понад 90% всіх поживних речовин, які є у них. У складі цих дріжджів виявлено 14 вітамінів, особливо вони багаті на вітаміни групи В. При переробці біомаси в харчовий білок її ретельно очищують. Спочатку руйнують стінки дріжджових клітин шляхом механічної, лужної, кислотної або ферментативної обробки з подальшою екстракцією гомогенної дріжджової маси відповідним органічним розчинником. Потім лужним розчином розчиняють білки і білковий розчин відокремлюють від клітинної маси діалізом. Очищені від низькомолекулярних домішок білки осаджують і використовують як білкові добавки в різні харчові продукти – сосиски, ковбаси, паштети, м'ясні начинки. Також сухий білок можна текстурувати.

Деякі дріжджові клітини (родів *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*) як джерело вуглецю здатні використовувати нерозгалужені вуглеводні з числом від 10 до 30 вуглецевих атомів у молекулі. Вони переважно представлені рідкими фракціями вуглеводнів нафти з температурою кипіння від 200 до 320°C.

Спочатку проект виник у зв'язку з необхідності утилізувати парафіни, що залишаються у кількості від 10 до 15% після очищення газойлю. У

живильне середовище додають макро- та мікроелементи, вітаміни та амінокислоти. Висушена білкова маса гранулюється та використовується як білково-вітамінний концентрат у кормовиробництві.

Хорошим субстратом для вирощування кормових дріжджів родів *Torula*, *Kluveromyces* є молочна сироватка. В 1 т молочної сироватки міститься близько 10 кг білка та 50 кг лактози. Методом ультрафільтрації відокремлюють білки, а розчин лактози використовують для культивування дріжджів.

Як джерела вуглецю дріжджові клітини можуть використовувати і нижчі спирти – метанол і етанол, одержувані з природного газу або рослинних відходів. При цьому дріжджова маса містить більше білків (56-62 % від сухої маси) та менше шкідливих домішок (похідних бензолу, D-амінокислот, аномальних ліпідів, токсинів, канцерогенів), ніж кормові дріжджі, вирощені на парафінах нафти.

Для вирощування дріжджів на гідролізатах рослинної сировини використовуються *Candida arborea* і *Candida utilis*, вони застосовуються для харчових цілей і використовуються як білкові добавки до різних продуктів.

Наприклад, у США на основі *Candida utilis* виробляють торутеїн, який додають у продукти харчування, після чого вони вважаються дієтичними з високим вмістом протеїну.

Використання бактерій

Відомо більше 30 видів бактерій, які можуть бути застосовані як джерела повноцінного кормового білка. Джерелом вуглецю при культивуванні бактерій можуть бути природний і супутній газу, водень, і навіть спирти – метанол, етанол, пропанол.

Найчастіше на газових живильних середовищах вирощуються бактерії роду *Methylococcus*, які здатні утилізувати від 85 до 90% метану у спеціальних ферментерах. Однак виробництво кормового білка на газових середовищах є досить дорогим. Ширше застосовується технологія вирощування бактерій на метанолі, який легко одержують шляхом окислення метану. Найчастіше використовують бактерії родів *Methylomonas*, *Methylophilus*, *Pseudomonas*. Концерном ICI випускається кормовий препарат прутин. Цей препарат містить до 74% білків (від сухої речовини), до 5% ліпідів, 10% мінеральних речовин, від 10 до 13% нуклеїнових кислот.

До бактерій з високою інтенсивністю синтезу білків слід віднести водородокислюючі бактерії, що здатні накопичувати до 80% білка (з розрахунку на суху речовину). Для їх культивування в газовому середовищі має бути від 70 до 80% водню, від 20 до 30% кисню, від 3 до 5% вуглекислого газу. Виробництво може бути організоване поблизу хімічних підприємств.

Використання водоростей

Вже в 1521 р., після завоювання Мексики, іспанець Бернал Діаз дель Кастільйо повідомляв, що ацтеки вживають в їжу дивовижні пиріжки, схожі на сир. На озері Чад (Африка) тубільці племені канембу вживають для харчування клубки синьо-зелених водоростей.

Для отримання кормового білка використовують одноклітинні водорості *Chlorella* та *Scenedesmus*, синьо-зелені водорості (ціанобактерії) *Spirulina*

(*Spirullina platensis*, *Spirullina getleri*), що здатні синтезувати білки з вуглекислого газу, води та мінеральних речовин за рахунок енергії сонячного світла. Для свого розвитку водорості потребують певних режимів освітлення, температури та великих обсягів води. Зазвичай їх вирощують у природних умовах південних регіонів та басейнах відкритого типу (Мексика, Чад, Нігерія, Камерун, Італія, Японія, Ізраїль, Узбекистан та ін.). Водорості хлорела і сценедесмус потребують нейтрального середовища, їх клітини мають досить щільну целюлозну стінку, внаслідок чого гірше перетравлюються в організмі тварин, ніж спіруліна, яку вирощують у лужних озерах. З 1 га водної поверхні можна отримувати до 70 т сухої біомаси на рік, що перевищує вихід біомаси при вирощуванні пшениці, рису, сої, кукурудзи.

Вміст білків у клітинах хлорели та сценедесмусу становить близько 55% (у перерахунку на суху речовину), а у клітинах спіруліни – 65%. Водорості добре збалансовані за амінокислотним складом (крім метіотину), в них міститься багато поліненасичених жирних кислот та β -каротину.

При згодовуванні спіруліни тваринам не виявлено аномалій та патологічних ефектів, забезпечується норма швидкості росту. Білкова маса із клітин водоростей надходить у продаж у вигляді суспензії, сухого порошку або пастоподібного препарату. Процес відокремлення клітин водоростей від маси води – найбільш трудомістка стадія.

Використання грибів

Гриби роду *Rhizopus sp.* використовують для твердофазної ферментизації соєвих бобів. Через три дні міцелій гриба розростається і зв'язує боби в коржі, що містить до 40% білка. В Індонезії такий корж смажать і використовують у супах як заміник м'яса. Такий продукт називають «темпех».

Подібним чином у країнах Африки та Сходу ферментують різноманітні зернобобові культури.

Перевагою твердофазної ферментації є зниження енергетичних витрат, недолік – низька продуктивність. Різні міцеліальні гриби вирощують на крохмальних (зернових) матеріалах, шкiрці цитрусових, соломі, висівках, лушпинні. Використовують їх для збагачення білками кормів, або з отриманої біомаси виділяють ферменти.

Для одержання харчового продукту мікопротеїну культивують гриб *Fusarium graminearum*. Його вирощують на дешевому глюкозному сиропі, отриманому шляхом гідролізу пшеничного або кукурудзяного крохмалю. Мікопротеїн добре перетравлюється. Йому надають консистенцію та аромат м'яса, шинки, курей, риби. Продукт довго зберігає аромат і не дає усушки у процесі кулінарної підготовки. Промислово випускається у Великій Британії.

Грибі привертають увагу дослідників завдяки здатності утилізувати найрізноманітнішу за складом органічну сировину: мелясу, молочну сироватку, сік рослин та коренеплодів, лігнін- та целюлозовмісні тверді відходи харчової, деревообробної, гідролізної промисловості. Грибний міцелій багатий на білкові речовини, які за вмістом незамінних амінокислот найближче до білків сої. Разом з тим білок грибів багатий на лізин, основну амінокислоту, що бракує в білку зернових культур. Це дозволяє на основі зерна та грибної біомаси

складати збалансовані харчові та кормові суміші. Грибні білки мають досить високу біологічну цінність і добре засвоюються організмом.

Позитивним чинником є і волокниста будова вирощеної культури. Це дозволяє імітувати текстуру м'яса, а за допомогою різних добавок – його колір та запах. Зберігають грибний міцелій зазвичай у замороженому вигляді.

Як субстрат грибами використовуються глюкоза та інші поживні речовини, а загальним джерелом азоту служать аміак та амонійні солі. Після завершення стадії ферментації культуру піддають термообробці для зменшення вмісту рибонуклеїнової кислоти, а потім міцелій відокремлюють методом вакуумного фільтрування.

Субстрати для культивування мікроорганізмів для одержання білка

Як джерела речовини та енергії мікроорганізми використовують найрізноманітніші субстрати – нормальні парафіни та дистилати нафти, природний газ, спирти, рослинні гідролізати та відходи промислових підприємств.

Для вирощування мікроорганізмів з метою отримання білка добре мати багатий вуглецем, але дешевий субстрат. Цім вимогам цілком відповідають нормальні (нерозгалужені) парафіни нафти. Вихід біомаси може досягати при використанні до 100% від маси субстрату. Якість продукту залежить від рівня чистоти парафінів. При використанні парафінів достатнього ступеня очищення, отримана дріжджова маса може успішно застосовуватися як додаткове джерело білка в раціонах тварин

Одним із перспективних джерел вуглецю для культивування продуцентів білка високої якості вважається *метиловий спирт*. Його можна отримувати методом мікробного синтезу таких субстратах, як деревина, солома, міські відходи. Використання метанолу як субстрату утруднене через його хімічну структуру: молекула метанолу містить один атом вуглецю, тоді як синтез більшості органічних сполук здійснюється через двовуглецеві молекули. На метанолі як на єдиному джерелі вуглецю та енергії здатні рости близько 25 видів дріжджів, у тому числі *Pichiapolymorpha*, *Pichiaanomala*, *Yarrowialipolytica*. Найкращими продуцентами на цьому субстраті є бактерії, тому що вони можуть рости на метанолі з додаванням мінеральних солей. Процеси одержання білка на метанолі досить економічні. За даними концерну Ай-Сі-Ай (Великобританія), собівартість продукту, виробленого на метанолі, на 10-15% нижче, ніж при аналогічному виробництві, що базується на основі високоочищених n-парафінів. Високобілкові продукти з метанолу отримують фірми розвинених країн світу: Великобританії, Швеції, Німеччини, США, Італії. Продуцентами білка є бактерії роду *Methylomonas*. Вирощування на метанолі метилотрофних бактерій, таких як *Methylophilus methylotrophus*, вигідно, оскільки вони використовують одновуглецеві сполуки більш ефективно. При зростанні на метанолі бактерії дають більше біомаси, ніж дріжджі. Перша реакція окислення метанолу у дріжджів каталізується оксидазою, а у метилотрофних прокаріотів – дегідрогеназою. Ведуться генно-інженерні роботи з перенесення гена метанолдегідрогенази з бактерій у

дріжджі. Це дозволить поєднати технологічні переваги дріжджів з ефективністю зростання бактерій.

Використання *етанолу* як субстрату знімає проблему очищення біомаси від аномальних продуктів обміну з непарним числом атомів вуглецю. Вартість такого виробництва дещо вища. Біомасу на основі етанолу виробляють у Чехії, Іспанії, Німеччині, Японії, США.

У США, Японії, Канаді, ФРН, Великій Британії розроблено технологічні процеси отримання білка на *природному газі*. Вихід біомаси може становити 66% від маси субстрату. У розробленому у Великій Британії процесі використовується змішана культура: бактерії *Methylomonas*, що засвоюють метан, *Hypermicrobium* і *Pseudomonas*, що засвоюють метанол, і два види неметилотрофних бактерій. Культура характеризується високою швидкістю зростання та продуктивністю. Головні переваги метану (до речі, основного компонента природного газу) – доступність, відносно низька вартість, висока ефективність перетворення в біомасу метаноокислюючими мікроорганізмами, значний вміст у біомасі білка, збалансованого за амінокислотним складом. Бактерії, що ростуть на метані, добре переносять кисле середовище і високі температури, у зв'язку з чим стійкі до інфекцій.

Субстратом для мікробного синтезу може бути *мінеральний вуглець* – вуглекислий газ. Окислений вуглець з успіхом відновлюється мікроводоростями за допомогою сонячної енергії і водневоокисними бактеріями за допомогою водню. На корм худобі використовують суспензію водоростей. Для роботи установок для вирощування водоростей необхідні стабільні кліматичні умови – постійні температури повітря та інтенсивність сонячного світла.

Найбільш перспективним є одержання білка за допомогою водневоокисних бактерій, які розвиваються за рахунок окислення водню киснем повітря. Енергія, що вивільняється у цьому процесі, йде на засвоєння вуглекислого газу. Для отримання біомаси використовуються зазвичай бактерії роду *Hydrogenomonas*. Спочатку інтерес до них виник при розробці замкнених систем життєзабезпечення, а потім їх почали вивчати як продуценти високоякісного білка. В інституті мікробіології Геттінгенського університету (Німеччина) розроблено спосіб культивування водневоокисних бактерій, при якому можна отримувати 20 г сухої речовини на 1 літр суспензії клітин. Можливо, у майбутньому ці бактерії стануть основним джерелом харчових мікробних білків.

Винятково доступним і досить дешевим джерелом вуглеводів для мікробного білка є *рослинна біомаса*. Будь-яка рослина містить різноманітні цукри. Целюлоза – полісахарид, що складається з молекул глюкози. Геміцелюлоза складається із залишків арабінози, галактози, маннози, фруктози. Проблема в тому, що полісахариди деревини пов'язані жорсткими оксифенілпропановими ланками лігніну – полімеру, що майже не піддається руйнуванню. Тому гідроліз деревини відбувається лише у присутності каталізатора – мінеральної кислоти та при високих температурах. При цьому утворюються моносахариди – гексози і пентози. На рідкій фракції гідролізату, що містить цукор, вирощують дріжджі. При кислотному гідролізі деревини

утворюється ряд побічних продуктів (фурфурол, меланіни), а через високі температури може відбутися карамелізація цукрів. Ці речовини перешкоджають нормальному у росту дріжджів, їх відокремлюють від гідролізату і наскільки можна використовують. Як продуценти використовують штами *Candidascottii* та *C.tropicalis*.

На особливу увагу заслуговують способи прямої біоконверсії продуктів фотосинтезу та їх похідних у білок за допомогою грибів. Ці організми, завдяки наявності потужних ферментних систем, здатні утилізувати складні рослинні субстрати без попередньої обробки. Дослідження умов біоконверсії рослинних субстратів у мікробний білок активно ведуться у США, Канаді, Індії, Фінляндії, Швеції, Великій Британії та інших країнах світу. Однак у літературі відомості про широкомасштабне виробництво білків мікробного походження нечисленні. Найбільш відомим та доведеним до стадії промислової реалізації є процес «Ватерлоо», розроблений в університеті Ватерлоо в Канаді. Цей процес, заснований на вирощуванні целюлозоруйнівних грибів *Chaetomium cellulolyticum*, можна здійснювати як у глибинній культурі, так і поверхневим методом. Вміст білка у кінцевому продукті (висушеному грибному міцелії) становить 45%. Фінська фірма «Тампелла» розробила технологію та організувала виробництво білкового кормового продукту «Пекіло» на відходах целюлозно-паперового виробництва. Продукт містить до 60% протеїну з гарним амінокислотним профілем та значну кількість вітамінів групи В.

У більшості країн-виробників молока традиційним способом утилізації сироватки є згодовування її тваринам. Ступінь конверсії білка сироватки в білок тварини дуже невисока (для вироблення 1 кг тваринного білка необхідно 1700 кг сироватки). В останні 10-15 років із сироватки методом ультрафільтрації виділяють білки високої якості, на основі яких роблять замінники сухого знежиреного молока та інші продукти. Концентрати можна використовувати як харчові добавки та компоненти дитячого харчування. З сироватки виробляється і молочний цукор – лактоза, що застосовується у харчовій та медичній промисловості. При цьому обсяг промислової переробки сироватки становить 50-60% від її загального виробництва. Отже, очевидні великі втрати найціннішого молочного білка і лактози. Понад те, виникає проблема утилізації відходів, оскільки процес природного розкладання сироватки відбувається вкрай повільно. Лактоза молочної сироватки може бути джерелом енергії для багатьох видів мікроорганізмів, сировиною для продуктів мікробного синтезу (органічних кислот, ферментів, спиртів, вітамінів) і білкової біомаси. З усіх відомих мікроорганізмів найвищим коефіцієнтом конверсії сироватки в мікробний білок мають дріжджі. Здатність до асиміляції лактози є приблизно у 20% всіх відомих видів дріжджів. Набагато рідше зустрічаються дріжджі, що зброджують лактозу. Активний катаболізм лактози особливо характерний для дріжджів із роду *Kluyveromyces*. Ці дріжджі можна використовувати для одержання на молочній сироватці кормового білка, етанолу, препаратів β -глюкозидази.

Вперше дріжджі на молочній сироватці почали вирощувати у Німеччині. Як продуценти застосовували різні штами сахароміцетів. Розроблено способи

одержання мікробних продуктів, що засновані на використанні лактози як монокультурою, так і сумішшю дріжджів та бактерій. В даний час як продуценти використовують дріжджі родів *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis*. Молочна сироватка з дріжджами, що вирости в ній, за біологічною цінністю значно перевершує вихідну сировину і її можна використовувати як замітник молока.

Наведений перелік мікроорганізмів і процесів отримання одноклітинних білка не є вичерпним. Проте, потенціал цієї нової галузі виробництва використовується далеко не повністю. Крім того, ми ще не знаємо всіх можливостей діяльності мікроорганізмів як продуцентів білка, але в міру поглиблення наших знань вони будуть розширені.

Принципова технологічна схема отримання кормової біомаси

Чисту культуру мікроорганізмів в log-стадії переносять у малий посівний апарат (500 л) з живильним середовищем, рН якого доводиться аміачною водою або вапняним молоком до 5,5-5,8. Спочатку в апарат подають близько 40 л середовища, розріджують його в 4-4,5 рази стерильною водою і при інтенсивній аерації додають решту живильного середовища (80-100 л), рН середовища – 4,5-5,5.

З гойдалкових колб вносять мікробну суспензію об'ємом 1,5-2 л і здійснюють культивування до накопичення в середовищі 3,5-4,0 г клітин/л абсолютно сухих речовин (АСР). Зазвичай при цьому потрібно 15-18 год.

Суспензія з малого посівного апарату подається в апарат об'ємом 4-5 м³, попередньо заповнений живильним середовищем (200 л) і стерильною водою (1,2-1,5 м³), включається аерація і при постійному доливі (70-75 л/ч) живильного середовища та додавання аміачної води для підтримки заданого рН проводиться культивування 10-12 год.

Вирощування засівної культури проводиться у ферментаторі об'ємом 15-20 м³. Апарат на 10% за обсягом заповнюється стерильною або кип'яченою водою, туди ж вводиться близько 0,5 м³ живильного середовища та повністю перекачується весь вміст попереднього апарату (2,5-2,7 м³).

Вирощування посівного матеріалу без відбору суспензії триває 8-9 годин при інтенсивній аерації та постійному доливі живильного середовища (170-200 л/год) до накопичення в ферментер біомаси в кількості 4-5 г АСР/л.

Після цього засівну культуру починають відбирати на основне виробництво в кількості 1,3-1,7 м³/год при одночасному доливі живильного середовища.

Процес ферментації триває від 5 до 10 діб, а потім цикл приготування посівного матеріалу відновлюється.

До підготовчих стадій виробництва відноситься приготування розчинів поживних солей та мікроелементів, необхідних для нормального розвитку мікроорганізмів. Ця ділянка має власну технологічну схему.

Мінеральні компоненти групують у два розчини, які паралельно подаються до основного ферментатора: розчин всіх макроелементів (N, P, K), необхідна кількість яких становить 5-70 г/л; розчин мікроелементів (Mg, Mn, Fe, Zn та ін), концентрації яких не перевищують 5-10 мг/л.

Технологічні потоки з усіх підготовчих відділень (компримування повітря, зберігання та підготовка сировини, отримання засівної культури, приготування розчинів поживних солей та мікроелементів, технологічна вода, аміачна вода, стерильна культуральна рідина) надходять на головну стадію виробництва – стадію ферментації.

Основним апаратом у цьому відділенні є ферментатор – апарат повного змішування по рідкій фазі, що забезпечує ріст та розвиток популяцій мікроорганізмів у рідкій фазі; транспорт поживних речовин до клітин мікроорганізмів; відведення від мікробних клітин продуктів їхнього обміну; відведення із середовища тепла.

Потім йдуть інші етапи технологічної схеми отримання кормової біомаси:

- згущення суспензії мікроорганізмів. При цьому концентрація біомаси підвищується до 12-16 % АСР. Для цього використовують сепаратори, а також флокуляцію, коагуляцію, флотацію чи декантацію.

- термообробка суспензії. При нагріванні мікроорганізмів до температури 75-85°C протягом 10-40 хв відбувається загибель штаму-продуцента та практично всієї супутньої мікрофлори.

- концентрування суспензії. Проводять у відділенні випарювання до концентрації 23-25% АСР. Для цього використовується трикорпусна вакуум-випарна установка: I корпус – 90°C, II – 75 °C та III – 60°C.

- сушіння. У цьому відділенні відбувається утворення готового продукту з вологістю 10% (за масою). Для цього використовуються конвективні сушарки (розпилювальні, киплячого шару, стрічкові та барабанні).

- грануляція та сушіння. Зазвичай суха біомаса, що містить 8-10% (за масою) вологи є готовим продуктом і після упаковки направляється на склад до споживача. Якщо продукт необхідно отримати у вигляді гранул, то суха та волога (після випарювання) біомаса у співвідношенні 1:1 надходить у гранулятор. При цьому на вологу біомаса налипають сухі частинки і вся маса вологістю 45-50% рухається в апараті, формуючи гранули, які потім подаються в сушарку киплячого шару. Гранули підсушуються до залишкової вологості 8-10% (за масою) гарячим повітрям або топковими газами з температурою 260-300°C;

- фасування та упаковка готового продукту. Суха біомаса надходить у приймальний бункер і фасується у паперові мішки із клапаном масою 25-30 кг. Ці мішки укладаються на спеціальні піддони, які відвозять їх на склад чи відвантажують споживачеві.

ЛЕКЦІЯ 10

Отримання амінокислот

План

1. Способи отримання амінокислот
2. Механізми регуляції біосинтезу кінцевого продукту у бактерій
3. Продуценти, що застосовують для виробництва амінокислот, їх переваги та недоліки
4. Створення оптимальних умов вирощування високоактивної біомаси
5. Технологія отримання лізину
6. Виробництво триптофану

В даний час амінокислоти одержують такими *методами*:

- біологічним (застосування гідролізу субстратів, що містять білок);
- хімічним (тонкий органічний синтез);

- хіміко-ензиматичним (ензиматична трансформація хімічно синтезованих попередників амінокислот із утворенням біологічно активних L-ізомерів);
- мікробіологічним (отримання L-амінокислот).

Найдавніший спосіб отримання амінокислот – кислотний, лужний або ферментативний гідроліз субстратів, що містять **білок** (м'ясо, молоко і т.д.). За високої температури білок розщеплюється на відповідні амінокислоти або фрагменти, що складаються з кількох амінокислот. При цьому утворюється суміш амінокислот та пептидів. Вилучення з цієї суміші будь-якої певної амінокислоти – досить складне, але здійснення завдання.

Сама по собі сировина (м'ясо та білок молока – казеїн) – коштовний продукт, і цей метод застосовується, коли мають справу з «негідною» сировиною, тобто з відходами виробництва (такою сировиною є роги, копита, волосся, пір'я та пух, що складаються з кератину, в якому міститься дуже багато сірковмісної кислоти цистеїну, і у невеликих кількостях інших амінокислот).

Наступний спосіб отримання чистих амінокислот – **хімічний синтез**. Їх синтезують подібно до інших органічних кислот, це не складно. Однак у процесі хімічного синтезу виходить суміш D- і L-стереоізомерів (іноді виходить і більше ізомерів), а як відомо, в білках людини біологічно активні тільки L-стереоізомери амінокислот, тому існують труднощі розподілу цих ізомерів. Крім того, хімічне виробництво амінокислот, як правило, пов'язане з використанням дорогого обладнання та нерідко агресивних токсичних сполук в якості вихідної сировини. Процес протікає за високої температури, вимагає дорогих каталізаторів, як і будь-яке хімічне виробництво супроводжується утворенням побічних продуктів, забруднює довкілля, небезпечно і шкідливо для обслуговуючого персоналу.

Проте деякі амінокислоти одержують хімічним синтезом, наприклад, гліцин, а також D-, L-метіонін, D-ізомер якого малотоксичний, тому медичний препарат на основі метіоніну містить D- і L-форми, хоча за кордоном у медицині використовується препарат, що містить тільки L-форму метіоніну. Там рацемічну суміш метіоніну поділяють біоконверсією D-форми на L-форму під впливом спеціальних ферментів живих клітин мікроорганізмів.

Наступний спосіб отримання амінокислот – **хіміко-ензиматичний**. Як видно з назви, цей метод одержання амінокислот передбачає два етапи. Спочатку хімічним методом синтезується «попередник» – відповідна карбонова кислота, а потім карбонова кислота (зазвичай у присутності аміаку) перетворюється на відповідну амінокислоту. Ця біотрансформація (біоконверсія) здійснюється ферментами живих клітин. Причому отримані L-стереоізомери амінокислот необхідні для життєдіяльності цих клітин. Фактично цей метод наполовину біотехнологічний.

Таким методом одержують, наприклад, аспарагінову кислоту (на основі фумарової кислоти). Розчин фумарової кислоти пропускають через колонки, в яких іммобілізовані або ферменти або клітини мікроорганізмів з високою активністю аспартази, наприклад, *Escherichia coli* або *Serratia marcescens*; туди ж подається аміак та здійснюється біотрансформація.

В останні роки при виробництві амінокислот все ширше використовують біотрансформацію попередників амінокислот, за допомогою іммобілізованих ферментів або мікроорганізмів клітин, попередньо одержуваних хімічним шляхом. Застосування ферментів у виробництві амінокислот забезпечує стереоспецифічність процесів їхнього синтезу, що вигідно відрізняє біотехнологічні виробництва від хімічних.

Отримання L-лізину. Процес отримання лізину заснований на стереоспецифічному ферментативному гідролізі (конверсії) D-, L- α -аміно- ϵ -капролактаму, який спочатку одержують хімічним шляхом із циклогексену.

Рацемат використовують як субстрат, який під дією ферменту L- α -аміно- ϵ -капролактамідази (лактамаза) перетворюється на L-лізин, а частина, що не прореагувала (D-форма), переводиться при впливі рацемази в суміш антиподів.

Лактамазу знайдено у деяких видів дріжджів та бактерій, зокрема у *Candida laurentii*. При виробництві лізину у водний розчин D-, L- α -аміно- ϵ -капролактаму одночасно вводять джерела лактамази та рацемази, що містяться в дріжджових та бактеріальних клітинах. Процес здійснюється при температурі 30-50°C, рН 8,0-8,5 та оптимальному режимі аерації. На виході з реактора утворюється переважно один продукт – лізин, який виділяють із суміші, очищають та сушать. Описана технологія одержання лізину забезпечує вміст амінокислоти у реакційному середовищі понад 150 г/л. Крім того, створені мутанти, у яких цільовий продукт – лізин далі не залучається в обмін речовин, що збільшує вихід продукту.

Отримання триптофану. Хіміко-ферментативний спосіб отримання триптофану полягає у прямій конденсації індолу, аміаку та піровиноградної кислоти. Реакцію каталізує піридоксальзалежна триптофаназа. Фермент знайдено у бактерій *E. coli*, *Bacillus albei*, *Proteus rettgeri* та характеризується широкою субстратною специфічністю. Додавання триптофану індукуює утворення ферменту, а додавання індолу інгібує його синтез у бактерій, тому процес отримання триптофану ведуть при надлишку аміаку та пірувату. Вихід амінокислоти при реалізації хіміко-ензиматичного способу одержання триптофану становить 63 г/л.

Перелік цільових амінокислот, вироблених хіміко-ферментативним способом різноманітний (L-аспарагінова кислота, L-аланін, L-глутамін, L-лізин, L-тирозин, L-триптофан, L-цистеїн, L-фенілаланін, L-метіонін). Хіміко-ензиматичний спосіб у порівнянні з мікробіологічним більш специфічний, не вимагає процедури очищення амінокислот від побічних продуктів та стічних потоків. Однак за вартістю сировини та ферментативних препаратів він ще поступається мікробіологічним способом.

Аналогічним чином на основі коричневої кислоти отримують фенілаланін (L-стереоізомер), використовуючи для цього дріжджові клітини. Хіміко-ензиматично можна виробляти практично всі амінокислоти, проте через дорожнечі та складності отримання відповідних органічних кислот-попередників цей метод не завжди економічно вигідний і здебільшого поступається методу прямого мікробіологічного синтезу.

Четвертий спосіб одержання амінокислот – їх прямий **мікробіологічний синтез** – цілком заснований на використанні біооб'єктів (тобто є повністю біотехнологічним). Мікробіологічний метод отримання амінокислот, найпоширеніший в даний час, заснований на здатності мікроорганізмів синтезувати всі L-амінокислоти, а за певних умов – забезпечувати їх надсинтез. Біосинтез амінокислот у мікробних клітинах протікає за принципом так званих вільних амінокислот, чи «пула амінокислот», з якого у процесах конструктивного метаболізму синтезуються клітинні макромолекули.

Як біооб'єкти в ньому застосовуються штами-продуценти амінокислот. Цим методом амінокислоти найчастіше отримують на основі *Escherichia coli* (кишкова паличка), *Bacillus subtilis* (сінна паличка – ґрунтовий мікроорганізм) та *Corynebacterium glutamicum* (ґрунтовий мікроорганізм).

Всі ці мікроорганізми на сьогоднішній день добре вивчені. Відома повна нуклеотидна послідовність всього їхнього геному. Для кишкової палички розроблені різноманітні способи генетичного обміну, що дозволяють легко комбінувати різні гени та змінювати процес метаболізму. Найменшою мірою це стосується *Bacillus subtilis*, і ще меншою мірою *Corynebacterium glutamicum*.

Використання цих мікроорганізмів для отримання амінокислот засноване на їхній здатності самостійно синтезувати всі 20 амінокислот. Також вони є гетеротрофними бактеріями, які як джерело вуглецю використовують органічні сполуки (вуглеводи або якусь органічну кислоту), а всі інші компоненти отримують з неорганічних сполук.

Застосування мікроорганізмів гетеротрофів дозволяє суттєво скоротити за часом процес ферментації. Так, кишкова папочка в багатому поживному середовищі ділиться кожні 20-30 хв, коринебактерії – щогодини. У бідних середовищах – час регенерації вдвічі більший (1 год для кишкової палички, 1,5-2 год для коринебактерій та сінної палички).

Разом з тим, існують бактерії, так звані *ауксотрофні мутанти* – мікроорганізми, які, з одного боку, втратили здатність самостійно синтезувати необхідні для побудови всіх компонентів своєї клітини різні амінокислоти, а з іншого – набули здатності до надсинтезу цільової амінокислоти. Такі мутанти отримують або впливом різних мутагенів фізичної та хімічної природи на вихідну культуру мікроорганізму з наступною селекцією штаму за заданими ознаками, або методами генної інженерії.

Відомо, що клітини бактерій синтезують амінокислоти для задоволення власних потреб (синтез білка та інші метаболічні процеси); синтезується їх у клітинах бактерій певна кількість. У процесі еволюції (природного відбору) виживали ті форми, у яких метаболічні процеси протікали найбільш економно, і це забезпечувалося з допомогою механізмів регуляції цих процесів.

Відомо, що у **регуляції та управлінні метаболічними процесами** використовується принцип зворотного зв'язку. Існують два рівні (механізму) регуляції біосинтезу кінцевого (цільового) продукту – *ретроінгібування* та *репресія*. На першому рівні амінокислота, що утворюється в ланцюгу послідовних реакцій, інгібує активність одного з початкових ферментів власного синтезу. Якщо цього механізму недостатньо і кінцевий продукт

(амінокислота) все одно присутній у надлишку, то включається другий механізм регуляції і в результаті тисне (репресується) утворення всього комплексу ферментів відповідного біосинтетичного ланцюга. На прикладі біосинтезу амінокислоти треоніну можна показати, як реалізуються ці принципи в клітинах кишкової палички. Треонін, а також лізин та метіонін відносяться до сімейства аспарагінової кислоти. У клітинах бактерій спочатку синтезується аспарагінова кислота, а потім на її основі синтезуються треонін, метіонін та лізин (тому вони об'єднані в сімейство аспарагінової кислоти).

Синтез кожної з цих амінокислот здійснюється у кілька етапів із утворенням проміжних сполук. Кожен із цих етапів каталізується білком-ферментом, синтез якого контролюється (кодується) відповідним геном, у нуклеотидній послідовності якого записана структура цього білка.

Перша реакція синтезу цих амінокислот – перетворення аспарагінової кислоти на аспартил-фосфат під впливом ферменту аспартокінази (кінази – ферменти, що «навішують» фосфорну групу).

Наступний етап – перетворення аспартил-фосфату на напівальдегід аспарагінової кислоти (проміжна сполука). Цю реакцію каталізує фермент дегідрогеназа напівальдегіду аспарагінової кислоти. Ген, який контролює синтез цього ферменту, локалізується в іншій ділянці хромосоми і називається ASD. Під впливом ферменту гомосерин-дегідрогенази, що кодується геном треонін А-2, синтезується гомосерин, який є попередником для синтезу треоніну та метіоніну. В свою черга гомосерин під впливом ферменту гомосерин-кінази перетворюється на гомосерин-фосфат (ген, що кодує цю реакцію, – треонін В). І, нарешті, гомосерин-фосфат під впливом ферменту треонін-синтетази перетворюється на треонін. Ген, що кодує утворення цього ферменту, – треонін С. При додаванні в середовище пірувату з треоніну утворюється ізолейцин.

Всі структурні гени в хромосомі кишкової палички розташовані в певній послідовності в загальній регуляторній області, яка включає промотор (ділянка зв'язування РНК-полімерази, яка зчитує інформацію, в результаті чого утворюється інформаційна РНК, яка потім приєднується до рибосом і транслюється, при цьому утворюється кожен з вказаних білків-ферментів) і так званий атенуатор – регуляторний елемент, який сприймає сигнали зворотного зв'язку.

Необхідно підкреслити, що синтез треоніну відбувається одночасно зі зростанням біомаси і після зупинки її зростання синтез треоніну сповільнюється та поступово припиняється.

Регулюється біосинтез треоніну в клітинах кишкової палички наступним чином: коли треонін у клітинах бактерій накопичується в кількості більшій, ніж його потрібно для метаболічних процесів та синтезу білка, і з'являється у вільному стані, він пригнічує активність ферменту аспартокінази. Фермент аспартокіназа – алостеричний фермент (alios – інший), що має крім активного центру ще один, так званий алостеричний центр, який може взаємодіяти з низькомолекулярними ефекторами. І таким ефектором у цьому випадку є треонін. При приєднанні до алостеричного центру треонін змінює конформацію

аспартокінази, внаслідок чого активний центр стає недоступним субстрату, і фермент втрачає активність.

У свою чергу, пригнічення активності аспартокінази веде до припинення синтезу аспартил-фосфату і, відповідно, припиняється синтез усіх проміжних сполук шляху біосинтезу треоніну.

Коли одного механізму виявляється недостатньо і треонін продовжує накопичуватися у надлишку, у кишкової палички включається ще один механізм регуляції біосинтезу – репресія. При цьому, якщо треонін накопичується в надлишку, він перетворюється на ізолейцин, який, у свою чергу, також накопичується в надлишку. У той момент, коли треонін та ізолейцин накопичуються у надлишку *одночасно*, вони опосередковано взаємодіють з атенуатором та пригнічують транскрипцію, викликаючи її термінацію. І тут синтез всіх білків-ферментів даного синтетичного шляху припиняється.

У природних мікроорганізмів контроль за швидкістю біосинтезу амінокислот виключає їх надвиробництво, тому виділення амінокислот із клітини в середовище можливе лише у культур з порушеною системою регуляції. Наприкінці ХХ ст. було створено *штам-суперпродуцент треоніну*. Використання його в промислових масштабах дозволило збільшити синтез треоніну до 100 г/л, а час ферментації скоротився до однієї доби.

У промисловому виробництві лізину нині використовується *штам-суперпродуцент* коринебактерій (*Corynebacterium glutamicum*). Тривалість ферментації 2-3 діб. Рівень накопичення цільового продукту становить 50-100 г/л.

Коринебактерії є грампозитивними, більш давніми в еволюційному відношенні мікроорганізмами, що відрізняються від грамнегативної кишкової палички також тим, що у них дуже низька активність внутрішньоклітинних протеїназ, тому синтезовані клітиною білки-ферменти довго залишаються в активному стані.

У штаму *Corynebacterium glutamicum* існує лише один механізм регуляції біосинтезу за принципом зворотного зв'язку – спільне (узгоджене) ретроінгібування активності аспартокінази.

Це єдиний фермент, активність якого регулюється спільно треоніном та лізином. Коли треонін та лізин *одночасно* надмірно накопичуються в клітині, вони разом приєднуються до алостеричного центру; в результаті активність аспартокінази пригнічується, і цей біосинтетичний шлях блокується.

Отже, синтез лізину контролюється треоніном та лізином, а щоб отримати штам-суперпродуцент лізину, потрібно «прибрати» треонін, оскільки треонін і лізин, перебуваючи в надлишку, пригнічують активність аспартокінази. Тому необхідно блокувати синтез треоніну. Для цього необхідно отримати мутацію, яка блокує цей ген, але в цьому випадку в живильне середовище необхідно додавати чистий треонін (оскільки більшість продуцентів лізину не здатні синтезувати гомосерин або треонін – вони є «ауксотрофами» за цими амінокислотами).

Якщо блокувати в іншому місці ланцюг біосинтезу, то мутант потребуватиме метіоніну та треоніну. Якщо додати в середу треонін і метіонін в обмеженій кількості, то штам зростатиме доти, доки вони не будуть витрачені, але в клітинах цього штаму будуть присутні також ферменти, необхідні для синтезу лізину, які довго зберігаються в клітинах коринебактерій в активному стані. І штам почне синтезувати лізин, тобто, синтез лізину штамом *Corynebacterium glutamicum* буде здійснюватися, тільки коли вичерпано треонін. Експериментально підбирають таку кількість треоніну та метіоніну, яка при внесенні в живильне середовище забезпечила б максимальний синтез лізину. Як тільки треонін зникає з середовища та зростання біомаси припиняється, починається активний синтез лізину. Таким чином, цей процес має дві стадії розвитку: зростання біомаси та синтез лізину.

Біотехнологи при розробці мікробіологічної технології отримання амінокислот у процесі культивування продуцентів підбирають такі умови, за яких швидкість синтезу амінокислоти клітинами продуцента була б максимально високою і зберігалася максимально довго, а також утворення побічних продуктів біосинтезу зводилося до мінімуму. Максимально висока швидкість синтезу досягається під час **створення оптимальних умов вирощування високоактивної біомаси**. Для цього в ферментері підтримуються певні (оптимальні) концентрації джерел вуглецю, амонійного азоту, мінеральних солей, ростових факторів, рН і температура.

Всі процеси з високим рівнем накопичення амінокислоти (близько 50-100 г/л) ведуться при дробовій подачі субстратів – джерел вуглецю та азоту. Як джерела вуглецю при біосинтезі амінокислот використовують вуглеводи або органічні кислоти (наприклад, ацетат), а як джерело азоту, необхідного для побудови аміногрупи, – амонійні солі та аміак.

Незважаючи на те, що амінокислоти в цілому нейтральні, в процесі їхнього біосинтезу відбувається сильне закислення середовища внаслідок порушення іонного балансу культуральної рідини. Справа в тому, що мікроорганізми-продуценти перетворюють іони амонію NH_4^+ , присутні в живильних середовищах у формі амонійних солей (NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та ін.), в амінні групи амінокислоти. При цьому в середовищі залишаються незбалансованими зайві радикали Cl^- , SO_4^{2-} . Для підтримки в середовищі оптимальної концентрації іонів амонію та оптимальної величини рН біосинтез амінокислот ведуть при автоматичному рН-статуванні аміаком.

Оптимальну концентрацію джерел вуглецю в середовищі можна підтримувати, подаючи в ферментер розчин вуглеводів з тією швидкістю, яка відображає темпи споживання цукрів культурою продуцента. При промисловому виробництві амінокислот широко застосовують автоматичний режим подачі вуглеводів за сигналом від датчика рН. При цьому рН-статування ведуть не аміаком або аміачною водою, а сумішшю аміачної води та вуглеводів. При правильному виборі співвідношення між ними постійно підтримується концентрація як іонів амонію, так й джерел вуглецю.

Для ауксотрофів типу продуцента лізину надзвичайно важливим параметром є початкове дозування джерел ростових факторів (тих амінокислот,

які штам не може синтезувати самостійно). Їх надлишок призводить до пригнічення біосинтезу; при їх дефіциті концентрація клітин продуцента у ферментері буде недостатня для забезпечення високої швидкості накопичення амінокислоти. Тому у продуцентів, аналогічних продуценту лізину існує оптимальна концентрація ростових факторів. Ця величина не стала. Вона може варіювати в залежності від сировини, аераційних можливостей апаратури, температури культивування.

Процеси біосинтезу амінокислот є енергоємними, у зв'язку з чим ферментація при отриманні амінокислот обов'язково повинна проводитися в аеробних умовах за інтенсивної аерації та перемішування, що забезпечують швидкість розчинення кисню 3-7 г/(л год).

Після утворення у ферментері активної біомаси, що синтезує амінокислоту, необхідно створити умови, за яких клітини мікроорганізмів «працювали» якомога довше.

У процесі біосинтезу з різних причин вони втрачають життєздатність і для продовження активної ферментації застосовують різні методи. Зокрема для ауксотрофних продуцентів амінокислот (наприклад, продуцента лізину) тривалість біосинтезу та вихід цільової амінокислоти можуть бути збільшені, якщо по ходу ферментації в живильні середовища вносити підживлення, що містять джерела вуглецю в суміші з джерелами ростових факторів (білковими гідролізатами).

Синтез цільової амінокислоти може припинятися через вплив на продуцент токсичних метаболітів, що синтезуються самим же продуцентом. Прикладом може бути біосинтез фенілаланіну продуцентом *Bacillus subtilis*. Продуценти в процесі росту на середовищах з вуглеводами синтезують ацетоїн та бутандіол – речовини, необхідні клітинам для утворення спор. При цьому клітини починають лізувати, утворюють спори та припиняють виробляти фенілаланін.

Уникнути накопичення побічних домішок вдається, якщо ведуть процес ферментації, лімітуючи джерело вуглецю. Розчин цукру, який служить для цього продуцента джерелом вуглецю, подають у середовище з постійною швидкістю, але меншою, ніж його утилізація культурою. Внаслідок цього в культуральному середовищі підтримується дуже низька «фоновая» концентрація джерела вуглецю, і весь цукор, що подається, витрачається на синтез фенілаланіну. В результаті робочий цикл ферментації зростає в 1,5-2 рази, а частка домішок (не тільки ацетоїну, а й побічних амінокислот) знижується. При цьому вихід фенілаланіну і конверсія джерела вуглецю в цільову амінокислоту збільшується майже вдвічі.

Ефективність використання субстрату при біосинтезі цільової амінокислоти залежить також від продуктивності біомаси.

Якщо синтез амінокислоти роз'єднаний зі зростанням біомаси (як у продуцента лізину), то ефективність використання субстрату буде тим вищою, чим довше культура працюватиме після зупинки зростання. Якщо ж синтез йде паралельно зростанню (як у продуцента треоніну), то продуктивність біомаси можна збільшити, перерозподіливши потоки субстратів усередині клітини,

розширюючи потік попередників на біосинтез амінокислоти, одночасно звужуючи решту потоків. Однак не завжди цього вдається досягти за допомогою таких технологічних прийомів, як у прикладі з продуцентом фенілаланіну.

Для цієї мети найбільш дієвими є методи генетичної інженерії – введення в клітину мікроорганізму багатокопійних гібридних плазмід, що містять гени, що контролюють біосинтез амінокислоти, що призводить до збільшення кількості відповідних ферментів у клітині. У генно-інженерних продуцентів ферментативна система діє на кшталт «вакуумного насоса», що мобілізує всі ресурси клітини на утворення цільової амінокислоти на шкоду зростанню біомаси та синтезу інших клітинних компонентів.

При введенні гібридних плазмід побічні домішки, як правило, автоматично зникають, при цьому продуктивність біомаси та коефіцієнт використання субстрату суттєво зростають.

Технологія отримання лізину. Як джерела вуглецю для культивування продуцентів лізину використовують вторинну сировину: бурякову мелясу, молочну сироватку, гідролізати крохмалю, сульфідні луги. Джерелами азоту є сечовина та солі амонію. Крім того, в живильне середовище додають необхідні для життєдіяльності макро- та мікроелементи (P, Ca, Mg, Mn, Fe та ін); стимулятори росту, в якості яких виступають екстракти кукурудзи, дріжджів та солодових паростків, гідролізати висівки та дріжджів, вітаміни групи B. Ступінь аерації індивідуальна для виробництва кожного конкретного продуцента.

Лізін з'являється у культуральному середовищі починаючи з середини експоненційної фази зростання культури і досягає максимуму до її кінця. Тому на першій стадії технологічного процесу формують біомасу продуцента, яку вирощують у спеціальних посівних апаратах протягом доби (рН 7,0-7,2; температура 28-30°C), а потім подають у виробничий ферментер, заповнений живильним середовищем. Лізін починає надходити в культуральну рідину через 25-30 годин після початку ферментації. Важливий фактор, що забезпечує у культуральному середовищі високі концентрації амінокислоти, синтезованої всередині клітини, – проникність клітинних мембран. Проникність клітинної мембрани збільшують або за допомогою мутацій або шляхом зміни складу живильного середовища. В останньому випадку в культуральному середовищі створюють дефіцит біотину (1-5 мкл/л), додають пеніцилін (2-4 мкг/л), детергенти (твін-40 і твін-60) або похідні вищих жирних кислот (пальмітати, стеарати). Біотин контролює вміст фосфоліпідів у клітинній мембрані, а пеніцилін порушує біосинтез клітинних стінок бактерій, що підвищує виділення амінокислот у середу.

Після завершення процесу ферментації (через 55-72 год.) рідку фазу відокремлюють від культури клітин мікроорганізму фільтруванням і використовують для виділення з неї лізину.

Високоочищені препарати лізину отримують після фракціонування фільтрату культуральної рідини методом іонообмінної хроматографії на катіоніті. З цією метою лізін переводять у форму катіону. Для цього процесу

фільтрат обробляють соляною кислотою до рН 1,6-2,0. Володіючи двома позитивно зарядженими іоногенними групами, лізин міцно сорбується на смолі і елюється з неї у вигляді індивідуальної сполуки 0,5-5% розчином гідроксиду амонію після виходу всіх інших катіонів. Елюат концентрують у вакуумі при температурі 60°C, переводять у форму монохлоргідрату, після чого висушують і додатково чистять за допомогою перекристалізації. В результаті отримують препарати кристалічного лізину 97-98% чистоти, які використовують для підвищення поживної цінності харчових продуктів і в медичній промисловості.

Крім високоочищених препаратів лізину отримують інші види його товарної форми: рідкий концентрат лізину (РКЛ), сухий кормовий концентрат лізину (ККЛ) та висококонцентровані кормові препарати, що характеризуються відносно меншим ступенем очищення порівняно з першим препаратом.

Виробництво триптофану. Подібно до лізину триптофан утворюється в ході розгалуженого метаболічного шляху. Однак при використанні ауксотрофних мутантів, у яких блоковані реакції, що ведуть до синтезу фенілаланіну та тирозину в середовищі, надмірне накопичення триптофану в середовищі не спостерігається, що пояснюється особливістю регуляції біосинтезу триптофану у мікроорганізмів. Метаболічним попередником триптофану служить антранілова кислота, яка створюється з хоризмової кислоти під дією антранілатсинтетази. Триптофан інгібує антранілатсинтетазу, тому для обходу метаболічного контролю синтез ферменту індують ступінчастим введенням попередника – антранілової кислоти.

У зв'язку з цією особливістю промислове виробництво триптофану організовано переважно за двоступінчастою схемою.

Технологія одержання. На першому етапі хімічним способом синтезують антранілову кислоту, яку за допомогою ензиматичної системи мутантних штамів дріжджів *Candida utilis* переводять у триптофан.

Біомасу дріжджів вирощують при температурі 30°C в середовищі, що містить бурякову мелясу, сечовину та мінеральні компоненти. Через добу у ферментер вводять 5%-й спиртовий розчин антранілової кислоти і 50%-й розчин сечовини, а через 3-4 год після введення попередника додатково додають джерело вуглецю (25%-й розчин меляси). Антранілову кислоту та сечовину подають через кожні 6 год, а мелясу – через кожні 12 год. Процес двоступінчастої ферментації завершується через 144 год і забезпечує вміст триптофану в культуральному середовищі до 6 г/л.

Після сушіння культуральної рідини одержують кормовий концентрат триптофану (ККТ), який включає білки, вільний триптофан, вітаміни В1, В2 та РР. Високоочищені кристалічні препарати триптофану утворюються після додаткового очищення культуральної рідини методом іонообмінної хроматографії на колонці, заповненій катіонітом (сорбція при рН 1,0; елюація 5% розчином гідроксиду амонію в суміші з пропанолом-2). Елюати кристалізують; кристали відмивають та висушують. Кристалічний препарат містить до 99% триптофану.

Крім триптофану мікробіологічним способом з використанням попередників отримують гістидин, ізолейцин, метіонін, серії та треонін.

ЛЕКЦІЯ 11

Мікробіологічний синтез вітамінів

План

1. Мікробіологічний синтез ціанкобаламіну (вітаміну B₁₂)
2. Виробництво вітаміну B₂ (рибофлавін)
3. Виробництво вітаміну D (кальциферол)
4. Виробництво вітаміну C (аскорбінова кислота)

Вітаміни являють собою низькомолекулярні органічні сполуки, необхідні для життєдіяльності організму, синтез яких в організмі або обмежений, або відсутній. Не підлягає сумніву винятково висока біологічна активність вітамінів. Потреба для організму людини цілком достатня в дуже невеликих кількостях (від кількох мікрограмів до кількох десятків міліграмів на день).

Вітаміни, не будучи пластичним матеріалом або джерелом енергії, є активними біокаталізаторами різних метаболічних процесів в організмі. Майже

всі водорозчинні вітаміни, а також жиророзчинний вітамін К є коферментами чи кофакторами біохімічних реакцій. Вітаміни А, D, Е регулюють генетичний апарат клітини. Крім цього абсолютно кожному вітаміну властива своя, специфічна функція в організмі. Все це вказує на незамінність вітамінів для життєдіяльності організму. Відомо, що водорозчинні вітаміни в тканинах не накопичуються (за винятком вітаміну В₁₂), з чого випливає необхідність їхнього щоденного надходження до організму. Жиророзчинні вітаміни здатні накопичуватися в тканинах, тому їхня недостатність або дефіцит зустрічаються рідше. Для них не властива і коферментна функція (крім вітаміну К). Цікаво, що, виконуючи функцію індукторів синтезу білків, представники жиророзчинних вітамінів виявляють подібність до стероїдних гормонів, особливо це стосується вітаміну D. І, нарешті, всі жиророзчинні вітаміни є структурними компонентами клітинних мембран, проявляючи антиоксидантну дію.

Якщо говорити про виробництво основної частини вітамінної продукції, то провідне становище тут займають хімічні методи, але в ряді виробництв як їхній повноправний конкурент виступають біотехнологічні методи, використання яких більш цікаве у зв'язку з жорсткістю екологічних вимог до фармацевтичного виробництва. Крім того, при застосуванні біотехнологічних методів виникають можливості скорочення частини стадій хімічного синтезу за рахунок використання високоактивних штамів мікроорганізмів-продуцентів. Наприклад, виробництво вітамінів В₁₂, В₂, В₃ та D (ергостерину) здійснюється в одну стадію. Також мікроорганізми знайшли своє застосування у синтезі вітаміну С.

Мікробіологічний синтез ціанкобаламіну (вітаміну В₁₂)

Після 10 років досліджень, у яких брали участь понад 100 вчених, повний хімічний синтез вітаміну В₁₂ здійснено у 1973 р. Р. Вудвордтом і А. Ешенмозером. Хімічний синтез досить складний і має 70 етапів, тому на сьогодні основним способом одержання вітаміну В₁₂ є мікробіологічний синтез. Щорічно у світі виробляється понад 10-12 т цього вітаміну.

Здатність до синтезу вітаміну В₁₂ виявлена у багатьох мікроорганізмів: *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium*, *Protaminobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Xanthomonas*.

Для промислового виробництва кобаламіну використовують штами, що були оброблені мутагенними факторами (УФ-опромінення, етиленімін, нітрозометилуретан, нітрозогуанідин), а також штами, одержані методами генетичної інженерії. Штам *Rhodopseudomonas protamicus* одержано злиттям протопластів *Protaminobacter ruber* і *R. sheroideis*; є інформація про одержання рекомбінантного штаму *Pseudomonas denitrificans*, здатного синтезувати 100-300 мг/л вітаміну В₁₂.

На сьогодні у світі для одержання вітаміну В₁₂ найчастіше використовуються представники роду *Propionibacterium* і штами *Pseudomonas denitrificans*. Перевагою *Propionibacterium* є те, що бактерії цього роду

отримали статус безпечних для практичного застосування, оскільки не утворюють екзо-, ендотоксинів (висновок Адміністрації харчування і лікарських засобів США).

У Європі віддається перевага штаму *Pseudomonas denitrificans* як продуцента ціанкобаламіну. Так, цей штам використовується для промислового виробництва вітаміну В₁₂ компанією Aventis (ця компанія утворилася злиттям французької компанії Rhone-Poulenc Rorer і німецької Hoechst AG). Саме співробітниками цієї компанії отримано генно-інженерний штам *Pseudomonas denitrificans* – надсинтетик вітаміну В₁₂, який утворює до 300 мг/л ціанкобаламіну.

Перевагою штаму *Pseudomonas denitrificans* перед представниками роду *Propionibacterium* є його здатність до синтезу 5,6-ДМБ (5,6-диметилбензилімідазол), що виключає потребу у екзогенному внесенні у середовище культивування цього попередника біосинтезу ціанкобаламіну.

Біосинтез вітаміну В₁₂ пропіоновокислими бактеріями відбувається паралельно росту в анаеробних умовах. Вітамін накопичується у клітинах бактерій. Ці особливості враховано у процесі промислового виробництва ціанкобаламіну. Перевагою використання пропіоновокислих бактерій як продуцентів вітаміну В₁₂ є те, що вони синтезують справжній вітамін і переважно у біологічно активній коензимній формі.

Існує два способи одержання вітаміну В₁₂ з використанням бактерій роду *Propionibacterium*: анаеробний і анаеробно-аеробний.

Під час реалізації першого способу (в анаеробних умовах, під тиском азоту) у середовище на другій стадії ферментації (після 72 год.) вносять 5,6-ДМБ. Це зумовлено тим, що 5,6-ДМБ у клітинах пропіоновокислих бактерій синтезується за доступу кисню.

У процесі анаеробно-аеробного способу на першій стадії (72-80 год.) штам вирощують в анаеробних умовах (під невеликим тиском азоту і за слабого перемішування) до повної асиміляції вуглеводів. На другій стадії (80-88 год.) створюють аеробні умови (включають аерацію – 2 м³/год. і перемішування), що забезпечує синтез 5,6-ДМБ. Обидві стадії (анаеробну і аеробну) можна здійснювати в одному або різних ферментаторах.

Середовища для культивування пропіоновокислих бактерій і біосинтезу вітаміну В₁₂ зазвичай містять глюкозу чи інвертовану мелясу (10-100 г/л), кукурудзяний екстракт (до 100 г/л), невеликі кількості солей заліза, марганцю і магнію, а також кобальту (10-100 мг/л), джерело мінерального азоту – сірчаноокислий амоній. У середовище рекомендують вносити також пантотенову кислоту, яка стимулює синтез вітаміну В₁₂.

Виділення вітаміну В₁₂:

1. З метою підвищення ефективності вилучення вітаміну з клітин перед екстрагуванням клітини заморожують при температурі -4...-12°C і витримують упродовж 1 год. з наступним відтаюванням.

2. Клітини обробляють 0,5-3,0% розчином аніонного детергенту додецилсульфату натрію у лужному середовищі за рН 9-10 упродовж 30 хв. при кімнатній температурі з постійним перемішуванням.

3. Далі центрифугують, осад промивають 0,5% розчином додецилсульфату натрію, повторно центрифугують.

4. У супернатант додають 2% розчин KCN, перемішують і витримують у темноті упродовж 20 хв. KCN додають для переведення кобаламіну у ціанкобаламін.

5. Далі вітамін вилучають багатократним екстрагуванням невеликими порціями фенолхлороформної суміші (1:1). Із суміші вітамін переводять у воду з додаванням 1,5 об'ємів хлороформу і 0,75 об'єму бутанолу. Залишки хлороформу і етанолу видаляють обробленням етанолом. Беручи до уваги високу світлочутливість вітаміну B₁₂, всі операції технологічного процесу слід проводити у затемнених умовах (або при червоному світлі).

Одержання кристалічного вітаміну B₁₂.

Ціанкобаламін накопичується в клітинах бактерій, тому стадії операції з виділення вітаміну такі:

- сепарування клітин;
- екстрагування водою за рН 4,5-5,0 і при температурі 85-90°C за наявності стабілізатора (0,25 % розчину нітриту натрію) - упродовж 1 год. За таких умов вітамін B₁₂ переходить у розчин;
- водний розчин охолоджують, доводять рН до 6,8-7,0 50% розчином їдкого натру. Для коагуляції білків додають Al₂(SO₄)₃·18H₂O і безводний FeCl₃, після чого осад відділяють фільтруванням;
- розчин очищують із використанням іонообмінних смол СГ-1 (попередньо розчин вітаміну підкислюють до рН 2,5-2,7), після чого кобаламіни елюють розчином аміаку;
- розчин вітаміну додатково очищують органічними розчинниками, випарюють й очищують на колонці з Al₂O₃, після чого кобаламіни елюють водним ацетоном;
- до водно-ацетонового розчину вітаміну додають ацетон і витримують 24-48 год. при температурі 3-4°C. Кристали вітаміну відфільтровують, промивають безводним ацетоном висушують у вакуумі.

В одному з варіантів одержання кристалічного вітаміну B₁₂ після елюації кобаламінів з іонообмінної смоли СГ-1 в аміачний розчин вітаміну вносять активоване вугілля, десятикратний об'єм води і 0,9% NaCN до маси вугілля. Після двох годин перемішування масу підкислюють соляною кислотою, вугілля відфільтровують (з обов'язковим промиванням осаду) і десорбують із вугілля вітамін ізопропіловим спиртом. Ізопропіловий спирт упарюють і вітамін B₁₂ піддають додатковому резорциновому очищенню кристалізації.

Одержання вітаміну B₁₂ за допомогою Pseudomonas fluorescens.

Штам бактерій *Pseudomonas fluorescens* ВКМ У-2224Д – продуцент вітаміну B₁₂, який застосовується як антианемічний препарат у медицині та у виробництві кормових добавок для сільськогосподарських тварин та птиці. Росте при 28-32°C і рН 7-7,2 і постійному перемішуванні. Ріст культури відбувається паралельно з біосинтезом вітаміну B₁₂ в аеробних умовах. Продуктивність культури за 150 годин росту ферментації становить 130-150 мкг/мл.

При вирощуванні продуцента на середовищі з мелясою, неорганічними солями і стимуляторами вітаміноутворення концентрація вітаміну В₁₂ в культуральній рідині досягає величини 120-150 мкг / мл.

Штам *Pseudomonas fluorescens* ВКМ У-2224Д характеризується наступними ознаками: культурально-морфологічні ознаки: бактерії є грамнегативними рухомими паличками розміром 0,45-0,85×0,6×15 мкм, неспороутворюючі. На агаризованому середовищі утворюють округлі колонії 1-2 мм білого кольору. Клітини знаходяться в основному в скупченнях. Штам стійкий при пересівах на щільні середовища. Для підтримки штаму використовують агаризовані середовища з мелясою наступного складу, г/л: меляса – 100,0, амоній фосфорнокислий двозаміщений – 1,5, сірчанокислий амоній – 0,3, агар – 20, 0, рН - 7,0-7,2. Фізіолого-біохімічні ознаки: не гідролізує желатин, крохмаль, гідролізує лецитин. Як джерело вуглецю засвоює сахарозу, бетаїн, не засвоює глюкозу, асимілює глютамінову, пропіонову кислоти.

Ріст культури на рідких живильних середовищах відбувається паралельно з біосинтезом вітаміну В₁₂. Температурний оптимум росту 30°C, рН 7-7,2. На твердому живильному середовищі з мелясою утворюють біло-сірі блискучі колонії, до кінця 7 доби - з вираженим центром, розмір колоній 2-3 мм. Факультативний аероб.

Концентрація кобаламіну визначається на спектрофотометрі при довжині хвилі 361 нм.

Вітамін В₂ (рибофлавін)

Біосинтез флавінів здійснюється як рослинними, так і багатьма бактеріальними клітинами, а також цвілевими грибами та дріжджами. Завдяки саме мікробному біосинтезу рибофлавіну в шлунково-кишковому тракті жуйні тварини не потребують цього вітаміну. У людини флавінів, що синтезуються, недостатньо для попередження гіповітамінозу.

Вітамін В₂ добре розчинний у воді, стійкий у кислому середовищі, але легко руйнується в нейтральному та лужному середовищах, а також під дією УФ-опромінення. Для цього вітаміну характерне функціонування в коензимних формах: флавіномононуклеотид (ФМН) та флавіноаденіндинуклеотид (ФАД). Саме на прикладі виділення рибофлавіну в культуральну рідину було відкрите явище надсинтезу.

При промисловому отриманні рибофлавіну використовують культури дріжджоподібних грибів *Eremothecium ashbyii* та *Ashbya gossipii*, що синтезують до 3,8 та 6,4 г/л рибофлавіну відповідно. Однак серйозним недоліком цих культур є їхня нестабільність при зберіганні на твердих середовищах у всьому діапазоні температур – від кімнатної до температури ліофілізації, внаслідок чого вони втрачають здатність до надсинтезу рибофлавіну. Тому, для збереження активності штаму доводиться систематично проводити розсівання на тверді середовища, відбираючи колонії з високою активністю.

Зараз разом із вищевказаними культурами при промисловому одержанні рибофлавіну використовується мутантний штам продуцент *Bacillus subtilis* із порушеною регуляцією синтезу вітаміну В₂. Цей штам стійкий до найбільш сильного антиметаболіта рибофлавіну – його аміноаналогу розеофлавіну і має здатність до надсинтезу вітаміну В₂.

При культивуванні його на середовищі з мелясою та дріжджовим екстрактом у культуральній рідині накопичується 3,5-4,5 г/л рибофлавіну. При цьому час ферментації скоротився втричі.

Рибофлавін отримують і хімічним методом, використовуючи як біокатализатор сухі клітини бревібактерій. Причому, якщо біосинтез із нативними клітинами займає кілька діб, то при біосинтезі із суспензією сухих клітин час синтезу ФАД становить лише 15-17 год.

Вітаміни D

Важливих для людини форм вітаміну D дві: D₂ (ергокальциферол) та D₃ (холекальциферол). Перший потрапляє до нашого організму тільки з їжею, а другий ми не лише отримуємо з їжі, але можемо синтезувати самі під впливом сонця. Проходячи через печінку, обидві форми перетворюються на 25-гідроксивітамін D (скорочено він позначається 25(ОН)D). Фізіологічна активність обох вітамінів (D₂ та D₃) рівноцінна.

Вітаміни D – це група споріднених сполук, в основі яких знаходиться ергостерин, який виявлений у клітинних мембранах еукаріотів. Вміст ергостерину в дріжджових клітинах коливається від 0,2 до 11%. Трансформація ергостерину у вітамін D₂ відбувається під впливом ультрафіолетового опромінення. Ергостерин є вихідним продуктом для одержання вітамінів D, а також ряду стероїдних гормонів, харчових та лікарських препаратів.

У промисловості ергостерин одержують, використовуючи дріжджі *Sacch. cerevisiae*, *Sacch. carlsbergensis*, а також міцеліальні гриби.

Засів роблять великою кількістю інокулята. Культивування ведуть при високій температурі та сильній аерації в середовищі, що містить великий надлишок джерел вуглецю по відношенню до джерел азоту. Важлива умова синтезу ергостерину дріжджами – гарна аерація. В анаеробних умовах у клітинах дріжджів накопичується попередник ергостерину – сквален. Показано, що кисень індукуює синтез стеринів, активує епоксидазу сквалену – першого ферменту біосинтетичного шляху. Індукція синтезу ергостерину починається при 0,03% вмісту O₂ у газовій фазі і досягає максимуму при 2% концентрації.

Для біосинтезу стерину дріжджами важливо, щоб середовище містило великий надлишок вуглеводів і мало азоту. Дріжджі, багаті білком, зазвичай містять мало стеринів. Ці дані стосуються переважно пекарських дріжджів. У випадку дріжджів *Candida* високе співвідношення C/N в середовищі призводить до накопичення ліпідів, а не ергостерину.

У разі дії на дріжджі рентгенівського випромінювання вміст ергостерину збільшується в 2-3 рази, що пояснюється пригніченням процесу амінування і супроводжується підвищенням синтезу ліпідів. Опромінювання проводять ультрафіолетовими лампами з довжиною хвилі 280-300 нм (сухі дріжджі); за

більш короткохвильового і довгохвильового випромінювання підвищується вихід інших сполук стеринаної природи. При цьому на вихід вітаміну D₂ впливають тривалість опромінювання, температура, наявність домішок.

Для отримання кристалічного вітаміну D₂ дріжджі або міцелій грибів піддають гідролізу розчином соляної кислоти при 110°C. Гідролізовану масу обробляють спиртом при 75-78°C після охолодження до 10-15°C фільтрують. Фільтрат упарюють до вмісту в ньому 50% сухих речовин і використовують як концентрат вітамінів групи D. Вітамін D₂ одержують із маси, що залишилася після фільтрації. Масу промивають, сушать, подрібнюють і двічі обробляють при 78°C об'ємом спирту в три рази більшим за масу клітин.

Спиртові екстракти згущують до 70% вмісту сухих речовин. Таким чином одержують ліпідний концентрат. Його омилюють розчином NaOH, а стерини залишаються у неомиленій фракції. Кристали ергостерину випадають із розчину при 0°C. Очищення кристалів проводять шляхом перекристалізації, послідовним промиванням 69%-ним спиртом, сумішшю спирту та бензолу (80:20) та повторною перекристалізацією. Отримані кристали ергостерину сушать, розчиняють в ефірі, опромінюють УФ світлом, після чого ефір відгоняють, а розчин вітаміну концентрують і кристалізують. Для одержання масляного концентрату розчин вітаміну після фільтрації розбавляють олією до стандартного рівня. Цей препарат використовують у медичних цілях.

Аскорбінова кислота (вітамін С)

Аскорбінова кислота у світовому промисловому виробництві вітамінної продукції загалом займає найбільшу частку – близько 40 тис. т на рік. Її синтез був розроблений швейцарськими вченими А. Грюсснером та С. Рейхштейном у 1934 р. і використовується до теперішнього часу. Синтез аскорбінової кислоти є багатостадійним хімічним процесом, у якому лише одна стадія представлена біотрансформацією. Ця стадія трансформації d-сорбіту в L-сорбозу за участю ацетатних бактерій. Для отримання сорбози використовують глибинну ферментацію, коли культуру продуцента *Gluconobacter oxydans* вирощують у ферментерах періодичного режиму з мішалкою та барботером для посилення аерації та масообміну протягом 20-40 год з результатом виходу сорбози до 98% вихідної кількості сорбіту в середовищі. Для досягнення такого високого виходу цільового продукту в живильне середовище вносять кукурудзяний або дріжджовий екстракт у кількості близько 20%.

Після закінчення ферментації сорбозу виділяють із культуральної рідини. Крім оптимізації середовища, можна вдосконалювати і технологічну апаратуру. Наприклад, перехід від періодичного культивування продуцента *Gluconobacter oxydans* до безперервного в апараті колонного типу збільшує швидкість утворення сорбози у 1,7 разів.

В даний час широке використання біотехнологічних процесів дозволяє вдосконалювати синтез аскорбінової кислоти, скорочуючи багатоетапні та дорогі хімічні стадії. Наприклад, синтез вітаміну С здійснюють енолізацією його найважливішого проміжного продукту – 2-кето-L-гулонової кислоти, яку, у свою чергу, отримують методом двостадійного мікробіологічного синтезу, що

складається з окислення d-глюкози в 2,5-дикето- d -глюконову кислоту (2,5-ДКДГК) та біотрансформації останньої в 2-кетогулонову кислоту (2-КГК).

Основними продуктивними мікроорганізмами, що забезпечують процеси окислення d-глюкози у 2,5-ДКДГК та відновлення останньої до 2-КГК, є мутантні штами *Erwinia punctata* та *Corynebacterium sp.*, при використанні яких вихід цільового продукту становить близько 90% кількості глюкози.

Однак дана технологія має суттєві недоліки, тому що при спільному культивуванні продуцентів відбувається пригнічення синтезу 2-КГК. Тому культуральну рідину після вирощування продуцента 2,5-ДКДГК стерилізують, застосовуючи поверхнево-активні речовини (ПАР), що дозволяє значно скоротити втрати при отриманні гулонової кислоти.

Існує й інший біотехнологічний спосіб отримання гулонової кислоти, заснований на синтезі цього продукту штамом мікроорганізмів роду *Gluconobacter* із сорбозу, виробництво якої має високу рентабельність. Здатність до синтезу цільового продукту обумовлено наявністю цього мікроорганізму видоспецифічних дегідрогеназ.

ЛЕКЦІЯ 12

Виробництво лимонної та оцтової кислоти

План

1. Продуценти, що застосовують для виробництва лимонної кислоти
2. Способи промислового виробництва лимонної кислоти
3. Отримання оцтової кислоти
4. Способи біологічного синтезу оцтової кислоти

До початку двадцятих років минулого століття лимонну кислоту (ЛК) отримували з соку лимонів, таким чином задовольнялося близько трьох чвертей світової потреби в ній (вихід лимонної кислоти з однієї тонни лимонів становить 25 кг). Виробництво лимонної кислоти методом ферментації за участю грибів давно відомий (з 1893 р.) біотехнологічний процес. Як продукт ферментації лимонна кислота займає друге місце за об'ємом виробництва у світі

(400 тис. тонн на рік, що в грошовому еквіваленті становить близько 325 млн євро), поступаючись лише промислового спирту. Незважаючи на значний прогрес у сфері органічного синтезу, на сьогодні лимонну кислоту отримують мікробіологічним синтезом, а саме шляхом лимоннокислого бродіння солодких відходів цукрового виробництва – патоки (меляси), спричиненого плісневими грибами роду *Aspergillus niger*, тому виробництво часто розташовують спільно з виробництвом цукру.

Харчова промисловість традиційно є основним споживачем виробленої таким чином кислоти, оскільки продукти природного бродіння мають переваги порівняно з хімічно синтезованими та не містять токсичних для організму людини домішок. Лимонна кислота є широкоживаною нешкідливою харчовою добавкою (E330), крім того, її застосовують у медицині, кондитерській промисловості, друкарській справі тощо.

Властивістю продукувати ЛК володіють багато плісневих грибів *Aspergillus niger*, *A. wenti*, *A. clavatus*, *A. aureus*, *A. usamii*, *Penicillium luteum*, *P. glaucum*, *P. piriformii*, *Trichoderma viride* і ряд інших. У промислових умовах біохімічний спосіб отримання ЛК здійснюється шляхом культивування гриба *Aspergillus niger* на живильних середовищах, вироблених з харчового цукру, бурякової меляси, очеретяної меляси або гідролізатів крохмалю. Розроблено також метод отримання лимонної кислоти для технічних цілей культивуванням дріжджів роду *Candida* (*C. lipolytica*, *C. parapsilosis*) на середовищах з н-парафінами нафти. При цьому вихід лимонної кислоти від н-парафінів становить близько 140%, а вміст у ферментаційному середовищі – до 140 г/дм³.

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

У промисловому виробництві лимонної кислоти широко застосовують гриби *A. niger*, оскільки цей вид дає високий вихід цільового продукту, з ним легко працювати, він відносно недорогий і цим самим робить виробничий процес економічно вигідним. Проте необхідно взяти до уваги, що до *A. niger* належать багато штамів, що відрізняються один від одного за своєю морфологією та біохімічними характеристиками: кольору спор та міцелію, розміру та кількістю спор, розміру міцелію, утилізації субстрату, ферментаційному часі, здатності продукувати лимонну кислоту на різних субстратах.

Продуцент лимонної кислоти повинен мати певні характеристики, а саме:

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

Оптимальні умови культивування наступні: температура для утворення ЛК 30-32°C, для росту і розвитку гриба – 32-37°C; рН 3,0-7,0. При відносно високих значеннях рН (вище 6,5) поряд з лимонною кислотою інтенсивно синтезується і щавлева кислота, а при рН 5,0-5,5 спостерігається тенденція до утворення глюконової кислоти.

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

1. Отримання посівного матеріалу.
2. Підготовка сировини до ферментації.
3. Підготовка та стерилізація повітря.
4. Ферментація.
5. Відокремлення біомаси продуцента від культуральної рідини.
6. Екстракція лимонної кислоти з культуральної рідини та отримання її у вигляді кристалів.

Надсинтез лимонної кислоти міцеліальними грибами забезпечується лімітуванням росту грибів одним або декількома мінеральними компонентами середовища (Fe, Mn, N, P), надлишковим вмістом джерела вуглецю та низькою величиною рН ферментаційного середовища. Гриб припиняє зростання після повного поглинання з середовища дефіцитного елемента, але продовжує споживати наявне в середовищі джерело вуглецю. У клітинах гриба накопичується лимонна кислота, яка не може метаболізуватися в циклі трикарбонових кислот через інгібування ряду ферментів (аконітази, ізоцитратдегідрогенази та ін) і виділяється в навколишнє середовище.

Посівний матеріал *Aspergillus niger* одержують у вигляді конідій. У виробничих умовах посівний матеріал накопичують у кюветах площею 10-12 дм² на агаризованому середовищі наступного складу: пивне сусло, розведене до 7% за сахарометром; 1-2% NaCl, 0,1% сечовини, 0,001 мг% CuSO₄, 2-3% агару. Середовище розливають у 10-20 алюмінієвих кювет шаром товщиною 1,5 см, засівають конідіями за допомогою пульверизатора та витримують у рослинній камері 7-8 діб. На поверхні середовища розвивається щільна міцеліальна плівка, вкрита конідіями. Плівку підсушують у рослинній камері при температурі 32°C протягом 1-2 діб. Кювети переглядають у стерильному боксі та відбраковують за морфологічними ознаками (незріле спороношення або інфекція). Конідії збирають з поверхні плівки відсмоктуванням повітря спеціальним пристроєм (працюючим за принципом пилососу), підсушують у термокамері при 28-30°C, а потім змішують із стерильним активованим вугіллям у співвідношенні 1:2 і розфасовують у стерильні колби (або банки) ємністю 0,5-1,0 л, закриті ватними пробками. Зберігають посівний матеріал за кімнатної температури, уникаючи впливу прямих сонячних променів. Термін придатності спорового матеріалу – 6 місяців.

Промислове виробництво лимонної кислоти здійснюється трьома різними способами: поверхневим культивуванням грибів, глибинним культивуванням, твердофазною ферментацією, що має назву "процес Коджі".

Поверхневий спосіб культивування є досить простим. Він передбачає застосування стерильного рідкого середовища. Приготування середовища відбувається у спеціальних чанах. Після стерилізації та охолодження середовище подається насосами до кювет завтовшки 12-18 см. Кювети розташовуються на стійках в асептичних ферментаційних камерах, де контролюються такі параметри: температура, початкове та кінцеве значення рН, час проростання спор, час ферментації, вологість повітря.

За допомогою спеціального обладнання шляхом розпилювання до середовища додають посівний матеріал – спори *A. niger*. Спори проростають і утворюють плівку міцелію. Через добу тонка плівка міцелію набуває сіро-білого кольору. За декілька днів вона стає товстішою. Початкова температура підтримується в діапазоні 28-30°C, відносна вологість становить 40-60%. У період активного росту міцелію температура повинна бути в діапазоні 34-35°C за помірної аерації. У період активного утворення лимонної кислоти температура знижується до 32-34°C, а подача кисню збільшується в 3-4 рази. Початкове значення рН середовища становить 5,0-6,0, а кінцеве – 1,0-2,0. Процес ферментації становить 8-12 днів, після чого культуральна рідина відділяється від біомаси гриба та використовується для екстракції лимонної кислоти.

Розрізняють *три режими поверхневого культивування*: беззмінний, однозмінний, беззмінний з доливами. При беззмінному режимі гриб культивують на одному і тому ж живильному середовищі до закінчення кислотоутворення (8-9 діб).

Однозмінний режим відрізняється тим, що через 6-7 діб. культуральну рідину зливають, плівку гриба промивають стерильною водою та заливають під плівку новий розчин. При високій активності плівки гриба змінити розчин можна не один, а навіть кілька разів.

Найбільш ефективним є доливний спосіб, суть якого полягає в тому, що, починаючи з 5-6 діб. культивування гриба через кожні 36-48 год проводиться долив живильного середовища (один або кілька разів) під плівку гриба в кількості 30-35% від початкового об'єму. Загальна тривалість процесу зростає до 11-12 діб.

Доливний режим забезпечує збільшення виходу лимонної кислоти з 1 м² поверхні кювет на 15-20% і знижує питому витрату меляси на 10-15% порівняно з іншими методами. Ферментацію припиняють при зниженні вмісту цукру в розчині до 1-2%. Загальна кислотність ферментаційного розчину сягає 20%. Крім лимонної кислоти в культуральній рідині присутні глюконова, щавлева та деякі інші кислоти. Але вміст лимонної кислоти складає 90-98% від усіх органічних кислот у розчині. Вихід лимонної кислоти від цукрози становить 68-80%.

Після зливу культуральної рідини під плівку гриба для промивання подають гарячу воду (70-75°C). Кислу промивну воду приєднують до основного розчину. Інактивованій міцелій після висушування використовують як кормову добавку.

За глибинного культивування процес ферментації відбувається у спеціальних біореакторах з мішалкою (ферментерах). Низьке значення рН під час ферментації та сама лимонна кислота спричиняють корозію, тому внутрішня частина біореактора виготовляється з матеріалу, стійкого до корозії. Важливою умовою у виборі біореактора для виробництва лимонної кислоти є забезпечення системою аерації, що здатна підтримувати високий рівень розчинного кисню.

При глибинному способі культивування продуцентів лимонної кислоти застосовують спеціально відселекціоновані природні або мутантні штами *Aspergillus niger*. Штами, які використовуються як продуценти при поверхневому культивуванні, непридатні.

Для глибинного культивування гриба готують два мелясні розчини: основний (3-4% цукру) і доливний (25-28% цукру). Основний розчин збагачують мінеральними компонентами (NH_4Cl , MgSO_4 , K_2HPO_4), мелясу звільняють від заліза та інших металів обробкою жовтою кров'яною сіллю. Сольовий і мелясний розчини стерилізують окремо при температурі відповідно 120-125°C та 128-130°C. Для засіву виробничого ферментатора застосовують посівний матеріал у вигляді міцеліальної маси гриба, отриманої з конідіального матеріалу, вирощуванням глибинним методом протягом 30-36 годин у посівному апараті на основному розчині.

Ферментація триває 5-7 діб при температурі 32-33°C та поступовому збільшенні рівня аерації протягом доби з 2 до 20 м³/(м³· год).

Починаючи з другої доби культивування, здійснюють 2-3 доливи мелясним розчином з розрахунку досягнення кінцевої концентрації цукру в ферментаційному середовищі 12-15%. Після закінчення процесу культуральну рідину нагрівають до 60-65°C та відокремлюють міцелій фільтруванням із промиванням гарячою водою. Фільтрат містить 5-12% органічних кислот (залежно від якості меляси та активності штаму), кількість лимонної кислоти – 80-95% від загальної суми кислот.

Процес отримання лимонної кислоти з використанням *A. niger* проводиться в ферментерах об'ємом 100 м³. Як посівний матеріал використовують конідії гриба в об'ємі 10 м³. Після проростання спор підсилюють аерацію. Необхідним є додавання піногасника, оскільки під час перемішування утворюється піна.

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

Переваги та недоліки методів ферментації. Поверхневий та глибинний методи продовжують співіснувати, але на сьогодні значну увагу надають глибинному методу. Глибинний метод дає змогу застосовувати широкий набір вуглецевмісної сировини. До того ж ферментація ведеться в стерильних умовах, що є важливою передумовою для переходу на безперервний, повністю механізований процес. За глибинного методу швидкість ферментації є високою – в одному апараті (біореакторі) одразу утворюється велика кількість культуральної рідини, а за поверхневого – вона збирається по численних кюветах.

Поверхневий спосіб має такі *переваги*: висока концентрація лимонної кислоти у культуральній рідині; значно менше утворюється побічних кислот, внаслідок чого зменшуються затрати меляси на ферментацію та легше виділити

лимонну кислоту в чистому вигляді, і як наслідок – низька собівартість лимонної кислоти; низькі затрати енергії на виробничий процес.

Витрати на обслуговуючий персонал більші за поверхневого способу, оскільки підготовка камер і зняття міцелію з кювет потребує значних затрат ручної праці.

Перевагами твердофазної ферментації є низькі затрати на утилізацію відходів та низькі енергозатрати; високий вихід продукту; низький рівень контамінації через високий рівень кислотності в біореакторі; використання живильного середовища спрощеного складу. Вадами такого методу ферментації є труднощі, що виникають під час контролю рН та складу поживного середовища; високі затрати на виділення кислоти в чистому вигляді через високий вміст домішок у продукті.

Лимонну кислоту *виділяють із розчину* у вигляді важкорозчинної солі кальцію.

Культуральну рідину нагрівають до кипіння та нейтралізують вапняним або крейдовим молоком до рН 7,0-7,5. Цитрат та оксалат кальцію утворюють осад, а глюконат кальцію та основна частина органічних та мінеральних речовин меляси залишаються в розчині.

Осад промивають гарячою водою і розкладають цитрат кальцію сірчаною кислотою за таких умов, коли оксалат кальцію залишається в осаді. Розкладання цитрату здійснюють при температурі 60°C після змучування осаду у воді (1 : 3 за масою) у присутності активованого вугілля для освітлення розчину (2% до маси лимонної кислоти) при перемішуванні протягом 20 хв та витраті сірчаної кислоти 0,421 дм³ лимонної кислоти у цитраті. Наприкінці процесу у реактор вводять сульфід барію для осадження важких металів.

Розчин лимонної кислоти, отриманий в реакторі, відокремлюють фільтруванням від осаду, що містить гіпс, кальцію оксалат, вугілля, сульфід металів. Фільтрат упарюють під вакуумом при температурі 70°C у два етапи, в проміжку між якими відокремлюють фільтруванням гіпс, що випав в осад. На першому етапі фільтрат упарюють до густини 1240-1260 кг/м³, на другому – до 1350-1360 кг/м³, що відповідає концентрації лимонної кислоти в розчині близько 80%.

Концентрат охолоджують до температури 8-10°C та кристалізують лимонну кислоту у присутності затравки – дрібних кристалів лимонної кислоти – протягом 40–50 хв. Кристали відокремлюють центрифугуванням з промиванням деіонізованою водою і віджимом до вологості 2-3%. Висушують кристали в барабанній сушарці гарячим повітрям за температури 35°C.

Отримання оцтової кислоти

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. Світове виробництво оцту становить близько 1 млн л.

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), 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.

Етиловий спирт окислюється до оцтової кислоти під впливом оцтовокислих бактерій родів *Gluconobacter* і *Acetobacter*. Це грамнегативні хемоорганогетеротрофні, ендоспор не утворюють, паличкоподібні організми, рухомі або нерухомі.

Оцтовокислі бактерії використовують для виробництва харчового оцту з вина та спирту. Два роди оцтовокислих бактерій розрізняють за ступенем окислення органічних субстратів. Так, бактерії роду *Acetobacter* (*A. peroxydans*) сприяють накопиченню оцтової кислоти як проміжного продукту та подальшому її окисленню до CO_2 і H_2O (бактерії ще називають переокислювачами). Види роду *Gluconobacter* (*G. oxydans*) викликають утворення оцтової кислоти як кінцевого продукту реакції, який зазвичай не піддається подальшому окисленню (бактерії називають недоокислювачами).

У процесі виробництва спиртового оцту одержують рідину, що містить 6-9% оцтової кислоти, яку під назвою столового оцту широко застосовують як смакову речовину, а також для консервування харчових продуктів. Оцтова кислота є сильною отрутою для дуже багатьох мікроорганізмів, чим і пояснюється її застосування в консервному виробництві. Оцтова кислота, що утворилася в забродженій спиртовій рідині, може бути сконцентрована відморожуванням чи перегонкою. Перегонкою отримують 70-80 %-ну оцтову кислоту, відому під назвою оцтової есенції.

Виробництво оцтової кислоти зі спирту здійснюється в окиснювальних генераторах, виготовлених із дубових клепок, які мають форму конуса. Внутрішню поверхню такого генератора покривають пивною смолкою або парафіном.

Генератори розрізняють за формою і розміром: одні мають до 3 м у діаметрі і до 6 м у висоту, інші – відповідно 2,5 і 5 м, треті – 1,25 і 2,5 м.

Крім дерев'яних генераторів, існують керамічні, сталеві (із кислотостійкої сталі), скляні і залізобетонні з кислотоопірним облицюванням.

Усі метали, за винятком благородних і алюмінію, дуже інтенсивно підлягають корозії оцтовою кислотою. Для створення більшої поверхні окиснення в генераторах застосовують наповнювальний матеріал – стружку із червоного бука, берези, граба або сосни. Останні заздалегідь обробляються лугом для видалення смолистих речовин. Стружка як наповнювач може слугувати 20-30 років.

Як наповнювальний матеріал використовують також деревне вугілля, кокс, пемзу і кукурудзяні качани.

Для запуску генератор спочатку завантажують стружками, які підкислюють оцтовою кислотою, що містить оцтовокислі бактерії. Для цього зазвичай використовують свіжий, непастеризований, неосвітлений оцет, відібраний із генератора. Первинним підкисленням забезпечується достатня кількість оцтовокислих бактерій і пригнічується розвиток шкідливих бактерій.

У період підкислення генератор ізолюють, не допускаючи потрапляння в нього повітря, а, отже, і можливості розмноження небажаних мікроорганізмів у період низької кислотності стружки.

Потім щодня в декілька прийомів уводять у генератор для підкислення оцет у кількості 60-50 л на 1 м³ стружки. При автоматизації виробництва оцет для підкислення вводиться через автоматичний пристрій порціями по 2 л через кожні 20 хв. Кислотність оцту повинна бути не нижчою за 9%. Оцтовокислі бактерії, що вводяться в генератор разом з оцтом, затримуються на стружках.

Оцет, що витікає із генераторів, що має сильний запах, смак деревини і темне забарвлення, відправляють на склад для подальшого використання під час приготування суслу. На підкислення 1 м³ стружки витрачається біля 400 л оцту. Тривалість підкислення становить 8-10 діб. Як тільки кислотність оцту, що витікає, стає однаковою з кислотністю оцту, який заливають у генератор, процес підкислення закінчують і починають аерувати генератор. Одночасно з цим заливають сусло для бродіння.

Повітря через отвори в стінці генератора проникає всередину. Аерація може здійснюватись також примусово, за допомогою вентиляторів.

Сусло для бродіння готують з оцту, розведеного водою до 6%-ї концентрації оцтової кислоти. До розведеного оцту додають слабкий розчин етилового спирту (зазвичай 3%-ї концентрації) з тим, щоб після його окиснення отримати 9%-й оцет. Крім спирту додають живильні речовини, необхідні для розвитку бактерій: солодове сусло і солі KH_2PO_4 або K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Сусло для бродіння (оцтово-спиртову суміш) заливають на поверхню стружки в генераторі і воно повільно протікає в ньому зверху вниз.

Таким чином, виробництво оцту являє собою безперервний процес. У правильному технологічному режимі один раз заряджений генератор може безперебійно працювати багато років без заміни стружки. Теоретичний вихід оцтової кислоти становить 103 кг із 100 л безводного спирту.

Відібраний із генератора оцет освітлюють і фільтрують. Для освітлення оцту застосовують желатин, рибний клей або активоване вугілля.

Оброблений зазначеними засобами оцет залишають на декілька днів для відстоювання. Освітлений оцет зціджують, а осад фільтрують для вилучення залишків оцту. Інколи весь оцет після відстоювання фільтрують на багатошаровій установці, яка складається із фільтраційної тканини, азбестоцелюлозної маси і піску.

Профільтрований нерозведений оцет наливають у дубові бочки і зберігають у них не менше 2 місяців у лагерному відділенні оцтового заводу. Свіжий оцет із генератора, звичайно, має різкий запах і смак. Після зберігання (старіння) оцет набуває приємного запаху і смаку, якість його значно підвищується. Деякі хімічні зміни, які відбуваються під час старіння оцту, подібні до тих змін, які спостерігаються при старінні вина. Одним із таких змін є етерифікація. Міцність оцту після певного терміну витримки розведенням водою доводять до стандартної кислотності. Розводять оцет водою в градуйованих резервуарах, обладнаних лопатною мішалкою. Після досягнення потрібної кислотності розведений оцет фільтрують.

Якщо оцет високої кислотності зберігається без змін необмежений час, то в розведеному водою оцті можуть розвинутиись оцтовокислі бактерії і оцтові вугриці (Оцтова вугриця (лат. *Turbatrix aceti*) – вид круглих хробаків із сімейства *Ranagrolaimidae*. Оцтова вугриця з'являється іноді у величезних кількостях в оцті, що бродить, і крохмальному клейстері, але харчується, мабуть, за рахунок грибків, що розвиваються в зазначених рідинах), які спричиняють помутніння продукту. Щоб захистити оцет від порчі, його пастеризують.

Пастеризацію оцту проводять у безперервно діючих апаратах, виготовлених із хромонікелевої сталі. Оцет, проходячи через пастеризатор, нагрівається до 60-70°C. За наявності в оцті оцтових вугриць його до розведення водою обробляють повареною сіллю в концентрації 1-2 %, яка смертельна для мікроорганізмів за дводобової витримки.

Оцет розливають у бочки і пляшки. У бочки оцет заливають в гарячому стані безпосередньо з пастеризатора, а в пляшки його попередньо пропускають через холодильник. Для надання розведеному оцту стійкості під час зберігання разом з пастеризацією в нього додають нешкідливу консервувальну речовину – піросульфит калію в кількості 10-15 г на 1 дал.

Оцтову кислоту при біологічному синтезі можна отримати 4 способами.

1. Окислювання етанолу оцтовокислими бактеріями. Бактерії родів *Acetobacter* (*A.aceti*; *A.xylinum*; *A.peroxydans*) і *Gluconobacter* (*G.oxydans*) здатні асимілювати вуглеводмісні та спиртовмісні субстрати, накопичуючи в культуральній рідині значну кількість ацетату. Вони характеризуються специфічними культуральними та фізіологічними властивостями:

- висока ацидофільність, ростуть при рН 4,0; оптимум 5,0-6,0;
- бактерії – суворі анаероби, підвищена чутливість до дефіциту кисню пов'язана з активністю ферменту апірази, під дією якого АТФ швидко гідролізується і стає недоступною для метаболізму клітин;
- виражена здатність окислювати органіку у частково окислені продукти, найбільш характерна здатність окислювати етанол в оцтову кислоту.

Схема біосинтезу оцтової кислоти:

На першому етапі етанол окислюється до ацетальдегіду при участі залежної алкогольдегідрогенази, далі відбувається гідратація ацетальдегіду і повторне окислення, каталізоване залежною ацетальдегідрогеназою.

Оптимальними умовами біосинтезу оцтової кислоти бактеріями *Acetobacter aceti* є:

- температура 30°; pH 5,0-6,0;
- інтенсивна аерація середовища;
- відношення вихідного субстрату – етанол і оцтова кислота в співвідношенні 5,5%:7,5%.

2. Бактерії *Clostridium aceticum*, *Cl.thermoautofrophicum*, *Eubacterium limosum* та інші види здатні в анаеробних умовах утилізувати гексози, пентози і молочну кислоту, утворюючи ацетат як єдиний продукт метаболізму. Деякі види цієї групи, наприклад *Acetoanaerobicum woodii*, *Cl. thermoaceticum* та *Cl. formiaceticum*, здатні синтезувати оцтову кислоту в результаті асиміляції мурашиної кислоти й фіксації CO₂.

Оптимальні умови біосинтезу оцтової кислоти *Cl. thermoaceticum*:

- температура 60°;
- pH 6,7-7,4;
- умови суворо анаеробні.

3. Біосинтез оцтової кислоти молочнокислими бактеріями за механізмом гетероферментативного молочнокислого бродіння з фіксацією CO₂, однак цей метод не перспективний для одержання оцтової кислоти як цільового продукту.

4. Біосинтез оцтової кислоти за механізмом пропіоновокислого бродіння. Каталізаторами пропіоновокислого бродіння є бактерії роду *Propionibacterium* (*P. shermanii*; *P. pentosaceum*; *P. prendenreichii*) і деякі види клостридій (*Cl.propionicum*). Специфічною властивістю даної групи факультативно анаеробних мікроорганізмів є здатність асимілювати гексози і, рідше, пентози з утворенням пропіонової та оцтової кислот.

ЛЕКЦІЯ 13

Виробництво антибіотиків

План

1. Загальна характеристика процесу біосинтезу антибіотиків
2. Напівсинтетичний спосіб одержання аналогів природного пеніциліну
3. Антибіотикорезистентність, її види
4. Технологія кормових препаратів антибіотиків

Під назвою «антибіотики» об'єднані речовини, що утворюються біооб'єктами та вибірково пригнічують зростання інших мікроорганізмів. Пізніше це поняття поширилося і на продукти їх хімічної модифікації, що відбулося у найменуванні «напівсинтетичні антибіотики». Отримання та використання антибіотиків займає велике місце у сучасній фармацевтичній промисловості.

Найважливіша риса антибіотиків – вибірковість їх дії на метаболізм, зазвичай із кількох тисяч метаболічних реакцій антибіотик пригнічує лише одну чи кілька.

Три основні обставини, що здатні для всіх антибіотиків, визначають особливості їх біосинтезу: 1. антибіотики не належать до прямих продуктів трансляції чи взагалі матричного синтезу; 2. антибіотики як вторинні речовини утворюються із первинних метаболітів; 3. біосинтез молекули будь-якого антибіотика відбувається за участю низки ферментів.

Продуценти більшості антибіотиків, у тому числі найважливіших для медичної практики, є аеробами або (рідше) факультативними анаеробами. У зв'язку з цим у перші роки після отримання пеніциліну, граміцидину С та деяких інших речовин продуценти вирощували на поверхні рідкого живильного середовища в стаціонарних умовах у мікробіологічних матрацах або колбах, що поміщаються в термостат або термостатні кімнати. Культура продуцента зростала лише на поверхні середовища. Цей спосіб був трудомістким, неекономічним і не дозволяв напрацьовувати антибіотик у великих кількостях. Незабаром поверхнева ферментація була замінена на глибинну. Через живильне середовище пропускали повітря і безперервно перемішували середовище. Це дозволило використовувати для зростання продуцента весь обсяг середовища. Тільки глибинна ферментація створила можливість сучасного біотехнологічного виробництва із випуском кінцевого продукту у великій кількості.

Особливість виробництва антибіотиків – двофазний характер розвитку продуцентів. У першій фазі розвитку культури, що зветься *трофофаза* (фази збалансованого зростання мікроорганізму), йде інтенсивне накопичення біомаси продуцента. Продуцент синтезує білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ферменти та інші БАВ, необхідні для зростання мікроорганізму; спостерігається швидке споживання основних компонентів субстрату, інтенсивне поглинання кисню. У культуральному середовищі може знижуватися рН як наслідок накопичення органічних кислот. У трофофазі антибіотик, як правило, не утворюється або синтезується незначна його кількість. Можливо, у цій фазі синтез ферментів, що беруть участь в утворенні антибіотика, пригнічений. У другій фазі – *ідіофазі* (фазі незбалансованого зростання мікроорганізму) – накопичення біомаси сповільнене. Культуральне середовище вже збіднене компонентами, необхідними для розвитку продуцента та збагачене продуктами його життєдіяльності. У культурі переважають протеолітичні процеси, що призводять до її підлужування. Продукти метаболізму мікроорганізми частково використовують на побудову клітин міцелію, частково – на синтез антибіотика. Максимум біосинтезу антибіотика в культуральному середовищі настає, як правило, після максимального накопичення біомаси, цей максимум неоднаковий у різних мікроорганізмів та за різних умов культивування. З накопиченням певної концентрації антибіотика зростання мікроорганізмів припиняється.

Практика промислової мікробіології показує, що процес отримання того чи іншого продукту життєдіяльності активніше йде у змішаних культурах, за

спільного розвитку кількох видів (частіше двох) мікроорганізмів. Спільним культивуванням спеціально підібраних мікроорганізмів створюють умови, за яких значно збільшується утворення антибіотиків як результат активації низки біохімічних процесів. У змішаних культурах ферментативна реакція є відповіддю на прояв певних антагоністичних взаємин. При спільному культивуванні різних мікроорганізмів можуть виникати своєрідні гібриди цих організмів, які мають інші властивості порівняно з вихідними чистими культурами.

Для виробництва пеніциліну, що належить до групи β -лактамних сполук, використовують спеціально відібрані штами цвілевих грибів (суперпродуцентів), що належать до роду *Penicillium*, напр. *Penicillium chrysogenum*. Для промислового виробництва пеніциліну застосовують біореактори-ферментери з механічним перемішуванням об'ємом понад 10 000 дм³. Поживне середовище, що використовується для виробництва пеніциліну, зазвичай містить кукурудзяний екстракт, лактозу, глюкозу, мінеральні солі. Глюкоза може знижувати біосинтез антибіотика; на середовищах, що містять лактозу або сахарозу (за умов депресії), біосинтез антибіотика йде активніше. Важливу роль у процесі біосинтезу пеніциліну грає сірка, що міститься у структурі антибіотика. Як джерело сірки використовують натрію сульфат та натрію тіосульфат. Надлишок іонів міді не впливає на зростання гриба, але пригнічує біосинтез пеніциліну. Ефект гальмування біосинтезу знімається додаванням у середу іонів заліза. Після стерилізації та охолодження середовище засівається пророслими спорами гриба, аерується шляхом пропускання повітря і перемішується за допомогою мішалки. Для запобігання надмірному утворенню піни застосовуються хімічні піногасники. Температура у період першої фази має бути 30°C, у другу фазу – 20°C; рН у період зростання гриба – нижче 7,0; споживання вуглеводів має бути повільним, що досягається використанням лактози або дрібним введенням глюкози.

Синтез того чи іншого пеніциліну залежить від наявності специфічної речовини в середовищі, інакше кажучи, попередника, який мікроорганізм включає до молекули антибіотика без попереднього розщеплення. Слід зазначити, що попередники біосинтезу пеніциліну (фенілоцтова кислота, фенілацетамід, феноксиоцтова кислота) за певних концентрацій та рН середовища токсично впливають на продуцент. Фенілоцтова кислота найменш токсична. Додавання їх у середу у концентрації понад 500 мкг/мл пригнічує зростання міцелію, особливо у перші 24 години його розвитку. За таких умов забезпечується найбільший вихід бензилпеніциліну, який через 72 години може досягати 500-1000 мкг/мл.

При розвитку гриба без внесення попередника утворюється близько 45% бензилпеніциліну (пеніцилін G) та близько 53% пеніциліну K. При додаванні до середовища фенілоцтової кислоти змінюється співвідношення компонентів у бік різкого збільшення бензилпеніциліну, кількість якого в залежності від віку культури досягає 75-99% від суміші пеніцилінів. В процесі культивування *P. Chrysogenum* в середовищі, що не містить фенілоцтової кислоти, накопичуються сірковмісні сполуки не β -лактамного характеру, близькі до

цистеїну та метіоніну. Додавання в середу фенілоцтової кислоти сприяє більш інтенсивному метаболізму сірковмісних компонентів у сполуки β -лактамного характеру.

Процес біосинтезу пеніциліну ведеться при ретельному дотриманні стерильності всіх операцій, оскільки забруднення культур сторонньої мікрофлорою різко знижує накопичення антибіотика. Це пов'язано з тим, що багато бактерій повітря здатні утворювати пеніцилінази.

Виділення пеніциліну починається з фільтрації чи центрифугування (відділення міцелію гриба). З культуральної рідини антибіотик, де він знаходиться у вигляді кислоти, виділяють шляхом екстракції неполярними органічними розчинниками (амілацетатом, хлороформом, бутилацетатом, бутанолом та ін.). Очищення антибіотика проводять шляхом заміни розчинників, оскільки солі пеніциліну погано розчиняються в органічних розчинниках. Екстрагований пеніцилін у вигляді кислоти переводять у водний розчин у вигляді солі, додаючи луг. Повторюючи ці операції, пеніцилін концентрують та очищають.

Більшість пеніцилінів виробляють у вигляді натрієвих або калієвих солей. Новокаїнові та бензатинові солі є основою пролонгованих препаратів пеніциліну для внутрішньом'язового введення.

В даний час велике практичне значення має **напівсинтетичний (біологічний + хімічний) спосіб одержання аналогів природного пеніциліну**. Вихідним продуктом служить 6-амінопеніциланова кислота (6-АПК). Цю кислоту одержують в результаті біосинтезу при розвитку *P. Chrysogenum* за відсутності попередника в середовищі або шляхом ферментативного дезацильовання бензилпеніциліну або феноксиметилпеніциліну за участю ферменту пеніцилінацилази (пеніцилінамідази). Другий спосіб найперспективніший. Використовується іммобілізована пеніцилінацилаза, яка гідролізує бензилпеніцилін з утворенням 6-АПК та фенілоцтової кислоти.

Пеніцилінацилаза утворюється різними групами мікроорганізмів, у тому числі всіма грибами, що продукують пеніцилін.

В даний час запропоновано спосіб отримання іммобілізованих клітин *E. Coli* з високою пеніцилінацилазною активністю, придатних для багаторазового застосування.

Сама собою 6-АПК не активна. Її піддають хімічному ацилюванню та отримують аналоги пеніциліну (оксацилін, ампіцилін, метицилін, амоксицилін та ін) з поліпшеними або новими властивостями. Усього нині використовується близько чотирьох десятків таких препаратів.

З усієї загальної кількості природних пеніцилінів приблизно 35% використовується як медичні препарати, а 65% – для отримання 6-АПК.

Найчастіше мішенню антибіотика є білок – бактеріальний фермент, метаболіт, елемент цитоскелета, протонний насос та ін.

Для того, щоб потрапити всередину клітини, антибіотику необхідно пройти крізь її клітинну стінку та мембрану по каналах, які також складаються з білків. Білки численні й різноманітні, кожен із антибіотиків вражає «свій» білок – і нешкідливий всім мікроорганізмів, які такого білка не мають.

Білки легші і швидше, ніж інші сполуки (вуглеводи, фосфоліпіди і т.д.), схильні до адаптивних змін. Саме це є основою масштабної проблеми – **резистентності**, тобто вміння бактерій досить швидко виробляти стійкість до будь-якого антибіотика.

Життєвий цикл бактерії (близько 20-30 хв) зазвичай закінчується поділом. Тобто через кожні півгодини на місці однієї клітини буде вже дві, а за добу встигне змінитись близько сімдесяти поколінь. Тому з еволюційної з погляду природний відбір для бактерій працює швидше, ніж для макроорганізмів. Яким би потужним не був антибіотик, завжди існує ймовірність, що серед мільярда бактерій знайдеться хоча б одна, яка встоїть завдяки випадково набутій мутації. А зумівши вижити, отримає ексклюзивну можливість розмножитися і передасть цю здатність виживати дочірнім клітинам, а ті, своєю чергою, своїм. З нащадків таких бактерій рано чи пізно сформується популяція, несприйнятлива до старого антибіотика. Відповідно до еволюційної теорії Дарвіна виникає *хромосомна резистентність*. Подібним чином пристосовуються і вищі організми, які перебувають під постійним пресингом. Комахи, що шкодять сільськогосподарським культурам, виробляють стійкість до пестицидів, тільки в них це займає набагато більше часу. Бактерії ж, мало того, що розмножуються швидко, але і вміють обмінюватися генами безпосередньо одна з одною за допомогою плазмід (це називається *горизонтальним перенесенням генів*). Це ще більше прискорює їхню адаптацію до нових умов. Резистентність, набута внаслідок горизонтального перенесення генів, називається *плазмідною резистентністю*.

Особливо резистентність поширена у відділеннях інтенсивної терапії, де є мікроорганізми із множинною лікарською стійкістю. Насамперед це грамнегативні бактерії, оскільки структура їхньої оболонки ускладнює проникнення ліків усередину, а ті молекули, що надійшли в клітину, викачуються з бактерії назад спеціальними молекулами-насосами.

Технологія кормових препаратів антибіотиків

У США ринок кормових препаратів антибіотиків (АБ) оцінюється в 170 млн доларів на рік. Кожен мільйон доларів, витрачений на виробництво препаратів, приносить у тваринництві дохід у 5-10 млн доларів. Вивченням та виробництвом АБ займаються відомі біотехнологічні фірми США – "Eli Lilly", "Pfizer" та ін.

Застосування АБ у тваринництві забезпечує додатковий приріст маси тварин при відгодівлі та зниження витрати кормів на 5-10%. Для кормових цілей застосовують неочищені препарати АБ, які є висушеною біомасою продуцента, що містить крім АБ білки, амінокислоти, вітаміни та інші біологічно активні речовини. У найрозвиненіших країнах широко використовують кормові препарати АБ.

До АБ, застосовуваним у кормових цілях, надється низка вимог. Вони не повинні:

- Використовуватися в медицині (в терапевтичних цілях) і не повинні викликати резистентності бактерій до АБ, що застосовуються в медицині;
- Змінювати своєї структури в організмі;
- Сприяти виникненню алергії;
- поширюватися і накопичуватися в тканинах та органах тварин.

У вітчизняній практиці освоєно виробництво кормових препаратів біовіт (антибіотик хлортетрациклін (ХТЦ)).

Виробництво біовіту.

Продуцент – актиноміцет *Streptomyces aureofaciens*. Поживне середовище для виробничої ферментації: борошно кукурудзяне – 7,0%; екстракт кукурудзяний – 0,9%; NH_4Cl – 0,6%; CaCO_3 – 0,6%; бензил роданистий (стимулятор синтезу АБ) – 3 г/м³; CoCl_2 (для біосинтезу вітаміну В12) – 3 г/м³; піногасник (технічний риба́чий жир) – 0,2%; рН 6,6-6,8.

Режим ферментації: температура культивування – 26-28°C; витрата повітря – 60-70 м³/(м³·год); тривалість ферментації – 70-90 год. Активність культуральної рідини (КР) – 3800-5000 од./см³ (3,8-5,0 кг/м³). Тепловиділення під час ферментації близько 10000 кДж/(м³ год).

В умовах глибинного культивування актиноміцети розмножуються вегетативно шляхом відділення фрагментів міцелію. На твердих живильних середовищах актиноміцети утворюють колонії, на поверхні яких розвиваються спорангії, містять спори круглої чи овальної форми.

Як посівний матеріал використовують спори, які при температурі 2-6°C можна зберігати до 3 місяців. Споривий матеріал вирощують на розвареному пшоні.

Накопичення посівного матеріалу здійснюють у дві стадії:

- у гойдалкових колбах об'ємом 750 см³ (200 см³ середовища);
- у посівному апараті на живильному середовищі наступного складу: борошно кукурудзяне (або житнє) – 5-6%; кукурудзяний екстракт – 5-6%; піногасник (технічний риба́чий жир) - 1,0%; рН 6,6-7,0.

У гойдалкових колбах вирощування триває 24-30 год. при температурі 26-28°C. Для засіву посівного апарату використовують 600-800 см³ посівного матеріалу із колб. Тривалість процесу у посівному апараті становить 30-36 годин при температурі 26-28°C. Допустиме зберігання посівного матеріалу при температурі 16-18°C до 20 год (або при 20-22°C не більше 10 год).

Борошно заварюють при 80°C протягом 15 хв, потім задають кукурудзяний екстракт, солі, ретельно перемішують і стерилізують при температурі 135-140°C 20-30 хв.

Перед засівом у ферментатор додають роданистий бензил, розчинений в стерильному риба́чому жирі.

До кінця ферментації характерно підвищення рН до 7,0-7,2. Одночасно з утворенням ХТЦ *Streptomyces aureofaciens* синтезує також вітамін В12. Більшість ХТЦ (90%) і вітаміну В12 (70%) перебуває у міцелії. КР містить 3,0-3,5% сухих речовин.

Існують різні технологічні варіанти переробки КР із отриманням сухого продукту. Найбільш прийнятний варіант, в якому передбачається осадження

розчиненого ХТЦ обробкою лугом (наприклад, NH_4OH з витратою 2,2-2,3 $\text{дм}^3/\text{м}^3$ КР) з підвищенням показника рН до 8,0-8,5. У цих умовах утворюється ХТЦ-основа, що слабо розчиняється у воді, і втрати антибіотика при виділенні з КР знижуються. Вологість продукту – до 8%. Продукт стандартизують додаванням наповнювача (пшеничні висівки, соєве борошно та ін.). Біовіт - порошок (або гранули) коричневого кольору. Має алергічну дію і підвищує загальну захворюваність при концентрації в повітрі робочої зони більше $22\text{мг}/\text{м}^3$. ГДК у повітрі робочої зони – $0,1\text{ мг}/\text{м}^3$ ХТЦ.

ЛЕКЦІЯ 14

Біотехнологічні особливості отримання молочнокислих продуктів

План

1. Загальні властивості молочнокислих бактерій
2. Мікроорганізми, що входять до складу заквасок
3. Технологічні процеси виробництва продуктів з молока
4. Основні стадії біотехнологічного виробництва молочнокислих продуктів
5. Коагуляція білків молока
6. Технологія виготовлення кисломолочних продуктів

Молочнокислі бактерії широко поширені в природі і використовуються в багатьох біотехнологічних процесах, пов'язаних з виробництвом молока і

кисломолочних продуктів. Середовищем існування цих бактерій є молоко, молочні продукти, поверхня рослин, ризосфера і прикоренева зона. Разом з рослинами молочнокислі бактерії потрапляють в шлунково-кишковий тракт людини і тварин, складаючи його мікрофлору.

Основною властивістю молочнокислих бактерій, за якою їх об'єднують в окрему велику групу мікроорганізмів, є здатність утворювати в якості головного продукту бродіння молочну кислоту. Молочнокисле бродіння здійснюють бактеріальні організми, гетерогенні за морфологією, які відносяться до родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*.

В основному молочнокислі бактерії культивують на середовищах з шестивуглецевими цукрами, але вони можуть також зброджувати деякі інші цукри. Відмінною ознакою молочнокислих бактерій є висока потреба у складних поживних середовищах, певних амінокислотах, вітамінах, особливо групи В. Найбільш важливим джерелом енергії для молочнокислих бактерій є моно- і дисахариди – глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза. В якості джерела енергії і в конструктивному обміні використовують також органічні кислоти: лимонну, яблучну, піровиноградну, фумарову та ін. Властивість зброджувати різні цукри і органічні кислоти, зокрема рибозу, цитрат або ацетат, лежить в основі тестів для ідентифікації молочнокислих бактерій.

Фізіологічною особливістю молочнокислих бактерій є їх кислотостійкість як наслідок характерного для них енергетичного обміну. Кокові форми можуть розвиватися в нейтральних і лужних середовищах, більшість же паличковидних форм не здатні рости в середовищі з рН вище 6,0; біфідобактерії не ростуть при рН вище 8,2. Ріст всіх молочнокислих бактерій продовжується до тих пір, поки в процесі бродіння вуглеводів рН в середовищі не знизиться до 5,0 і нижче. У результаті життєдіяльності гомоферментативних лактококів накопичується до 1% молочної кислоти, а *Lactobacillus bulgaricus* – до 3,5%.

Найбільш широке застосування молочнокислі бактерії знайшли у виробництві кисломолочних продуктів в харчовій промисловості. Гомо- і гетероферментативні молочнокислі бактерії давно використовуються в хлібопекарстві. Їх асоціації з дріжджами, сприятливі для створення аромату, смаку, пористості, забарвлення і свіжості, називаються *заквасками*. Молочнокисле бродіння знаходиться в основі силосування кормів і квашення овочів (капусти, огірків), плодів, ягід (маслин, яблук) і т. д. Ці процеси протікають за рахунок природних мікроорганізмів, що знаходяться на об'єкті заквашування. Останнім часом використовують спеціальні закваски, що забезпечують проведення процесів в прогнозованих режимах і з очікуваними результатами. Молочнокислими продуктами є різні сири, одержані з знежиреного або незбираного молока.

Молочнокислі бактерії включають в різні композиції профілактичних і лікувальних препаратів: біфідумбактерин, біфікол, колібактерин, лактобактерин. За допомогою молочнокислих бактерій в промисловості досить широко використовують отримання молочної кислоти.

Мікроорганізми, що входять до складу заквасок, які використовуються

для отримання кисломолочних продуктів

Застосовувані у виробництві кисломолочних продуктів культури живих бактерій можуть бути одним штамом певного виду (культури моноштамів), або кількома штамми та/або видами (змішані культури). Молочнокисле бродіння може бути гомоферментативним і гетероферментативним. При *гомоферментативному* бродінні основним продуктом є молочна кислота. При *гетероферментативному* бродінні утворюються діацетил (що додає смак вершковому маслу), спирти, ефіри, леткі жирні кислоти. Комерційні культури-*закваски* складаються з бактерій, що утворюють молочну кислоту та пахучі речовини (тобто умовно поділяються на 2 категорії – кислотоутворюючу та ароматоутворюючу).

Вибір і склад комбінацій з цих штамів і видів бактерій визначаються бажаними властивостями і умовами отримання продуктів, наприклад, швидкістю утворення молочної кислоти.

Streptococcus lactis – енергійний кислотоутворювач, що зброджує глюкозу за гомоферментативним типом, тобто накопичує в результаті бродіння переважно молочну кислоту (гранична кислотність у молоці – 100-120°Т). Оптимальна температура +30°C, не зростає при 45°C, деякі штами зростають при 41°C. Зростає при концентрації кухонної солі до 5,5%.

Streptococcus cremoris також відноситься до гомоферментативної кислотоутворюючої мікрофлори, проте має деякі особливості. В результаті життєдіяльності клітин цього виду утворюється більш ніжний згусток, здатний при обробці утримувати більше сироватки, ніж бажано, наприклад, при отриманні сиру (може вийти сир з ніжнішою консистенцією). Мікроорганізми цього виду сильно інгібуються при температурі 40°C. Недоліком є велика чутливість до кухонної солі та присутності інгібуючих речовин у молоці.

Streptococcus lactis subsp. diacetylactis – представник гетероферментативних молочнокислих мікроорганізмів (гранична активна кислотність 4,7-5,0 од. рН). Оптимальна температура + 20-26°C, деякі штами зростають при 37°C, межі зростання +10-36°C. Зростає при концентрації кухонної солі 3,0%. При зброджуванні цими мікроорганізмами молочного цукру утворюється не тільки молочна кислота, а й значна кількість летких жирних кислот, вуглекислого газу, ацетоїну, діацетилу, що забезпечують формування аромату та малюнку в сирах.

Streptococcus thermophilus – гомоферментативний молочнокислий стрептокок помірної кислотоутворюючої здібності (гранична активна кислотність дорівнює 4,0-4,5 од.). Оптимальна температура +40-45°C, деякі штами ростуть при 50°C, але ніколи не ростуть при 53°C, нижня межа зростання 20°C. Може витримувати нагрівання при 65°C протягом 30 хвилин.

Lactobacillus helveticus – зброджує лактозу за гомоферментативним типом, дуже сильний кислотоутворювач (гранична кислотність у молоці – 300-350°Т – понад 2% молочної кислоти). Оптимальна температура +40-42°C, не зростає при 15°C, max +50-53°C.

Lactobacillus lactis – гомоферментативний мікроорганізм, слабший кислотоутворювач (до 300°Т – близько 1,6% молочної кислоти). Оптимальна температура +40-43°С, не зростає при 15°С, max + 50-52°С.

Lactobacillus plantarum – гомоферментативна молочнокисла паличка, має дуже слабку кислотоутворювальну здатність (гранична кислотність у молоці – 140-150°Т). Деякі штами не згортають, а лише підкислюють молоко. Оптимальна температура +30-35°С, не зростає при 45°С, межі +15-40°С.

Lactobacillus fermentum – гетероферментативна молочнокисла паличка. Майже не згортає молоко. Оптимальна температура +30-35°С, не зростає при 15°С, зростає при 45°С.

Інтенсивні дослідження у галузі селекції мікроорганізмів з використанням методів генної інженерії дозволили розробити стандартизовані чисті культури з чітко визначеними властивостями. Розробляють концентровані культури, використання яких не потребує наявності заквашувального приміщення та заквашувального обладнання на підприємстві, спеціально навченого обслуговуючого персоналу. При виробництві сметани, сиру або сиру такі концентрати вносять безпосередньо до ванни або резервуару з молоком, вершками або нормалізованою сумішшю.

Отримання молочних продуктів у харчовій промисловості побудовано на процесах ферментації. Основою біотехнології молочних продуктів є молоко. Молоко (секрет молочних залоз) - унікальне природне живильне середовище, що містить 82-88% води і 12-18% сухого залишку. До складу сухого молочного залишку входять білки (3,0-3,2%), жири (3,3-6,0%), вуглеводи (молочний цукор лактоза – 4,7%), солі (0,9-1%), міnorні компоненти (0,01%): ферменти, імуноглобуліни, лізоцим і т.д.

Молочні жири дуже різноманітні за своїм складом. Основні білки молока – альбумін, казеїн. Завдяки такому складу молоко являє собою прекрасний субстрат для розвитку мікроорганізмів. Шляхом використання реакцій, які супроводжують головний процес зброджування лактози отримують різні продукти переробки молока: сметану, йогурт, сир і т.д. Властивості кінцевого продукту залежать від характеру та інтенсивності реакцій ферментації. Ті реакції, які супроводжують утворення молочної кислоти, визначають зазвичай особливі властивості продуктів. Утворення молочної кислоти є найважливішою ознакою, за якою можна говорити про ефективність молочнокислого бродіння і відповідно про якість одержуваного кисломолочного продукту. Кількість молочної кислоти в досліджуваній пробі визначають методом титрування розчином NaOH. Кислотність молока або кисломолочного продукту виражають у градусах Тернера (°Т) або відсотках молочної кислоти. Так, 1°Т відповідає 1 мл 0,1 н. розчину NaOH, який пішов на титрування 100 мл досліджуваного середовища. Оскільки відомо, що молекулярна маса молочної кислоти становить 90 г/моль, то для приготування 1 л 1 н. розчину потрібно 90 г кислоти, значить, в 1 мл 0,1 н. розчину міститься 0,009 г кислоти, що дорівнює 1°Т. Для кожного з вироблених молочною промисловістю продукту існують норми по кислотності, затверджені Міністерством охорони здоров'я, які свідчать про якість продукту.

Вторинні реакції ферментації, що йдуть при дозріванні сирів, визначають смак окремих їх сортів. У таких реакціях беруть участь пептиди, амінокислоти і жирні кислоти, що знаходяться в молоці.

Всі технологічні процеси виробництва продуктів з молока діляться на дві частини: 1) первинна переробка – знищення побічної мікрофлори, 2) вторинна переробка.

Первинна переробка молока включає в себе кілька етапів. Спочатку молоко очищається від механічних домішок і охолоджується, щоб уповільнити розвиток природної мікрофлори. Потім молоко сепарується (при виробництві вершків) або гомогенізується. Після цього проводять пастеризацію молока, при цьому температура піднімається до 80°C, і воно закачується в танки або ферментери.

Вторинна переробка молока може йти двома шляхами: з використанням мікроорганізмів і з використанням ферментів.

З використанням мікроорганізмів випускають кефір, сметану, сир, кисляк, казеїн, сири, біофруктолакт, біолакт, з використанням ферментів – харчовий гідролізат казеїну, суху молочну суміш для коктейлів і т.д.

При внесенні мікроорганізмів у молоко лактоза гідролізується до глюкози і галактози, глюкоза перетворюється на молочну кислоту, кислотність молока підвищується, і при рН 4-6 казеїн коагулює. Одночасно йдуть протеолітичні і ліполітичні процеси, що робить білки молока більш доступними і збагачує додатковими смаковими речовинами.

Для процесів ферментації молока використовуються чисті культури мікроорганізмів, так звані *закваски*. Виняток становлять закваски для кефірів, які представляють природний симбіоз декількох видів молочнокислих грибів і молочнокислих бактерій. Цей симбіоз в лабораторних умовах відтворити не вдалося, тому підтримується культура, виділена з природних джерел. При підборі культур для заквасок дотримуються таких вимог:

- Склад заквасок залежить від кінцевого продукту (наприклад, для отримання ацидофіліну використовується ацидофільна паличка, для виробництва кисляку – молочнокислі стрептококи);
- Штами повинні відповідати певним смаковим вимогам;
- Продукти повинні мати відповідну консистенцію, від ламкої крупинчатої до в'язкої, сметаноподібної;
- Певна активність кислотоутворення;
- Фагорезистентних штамів (стійкість до бактеріофагів);
- Здатність до синерезису (властивості згустку віддавати вологу);
- Утворення ароматичних речовин;
- Сполучуваність штамів (без антагонізму між культурами);
- Наявність антибіотичних властивостей, тобто бактеріостатична дія по відношенню до патогенних мікроорганізмів;
- Стійкість до висушування.

Культури для заквасок виділяються з природних джерел, після чого проводиться спрямований мутагенез і відбір штамів, що відповідають перерахованим вище вимогам.

Розрізняють однокомпонентні, одновидові (одноштамові, багатоштамові) і змішані закваски. Одноштамові заквашувальні культури – закваска, що складається лише з одного штаму певного виду бактерій. Багатоштамова одновидова закваска містить один або кілька штамів, які належать до одного виду бактерій.

Багатоштамова закваска може містити багато штамів, що належать до різних видів бактерій і навіть родів. Вона може бути сумішшю заквашувальних культур невизначеного складу і багатоштамовою заквашувальною культурою.

Біотехнології на основі молока включають, як правило, всі **основні стадії біотехнологічного виробництва**.

Накопичувальні культури. Метод накопичувальних культур дуже простий. Для накопичення потрібні такі умови, в яких організм долає конкуренцію інших. Підбираючи ряд факторів (джерела енергії, вуглецю, азоту, акцептори електронів, газову атмосферу, освітленість, температуру, рН та ін.), створюють певні умови та інокують (засівають) середовище змішаною популяцією. Найбільш пристосовані до цих конкретних умов мікроорганізми ростуть і витісняють всі інші супутні організми. Багаторазовими пересівами на такому самому рідкому поживному середовищі і посівом на агаризоване середовище такого самого складу можна без особливих зусиль виділити накопичений штам.

Загальною ознакою молочнокислих бактерій є здатність зброджувати вуглеводи (моно- і дисахариди) з утворенням молочної кислоти (молочнокисле бродіння). Інокулятом для одержання накопичувальних культур молочнокислих бактерій можуть бути кисломолочні продукти. Як поживне середовище використовують стерильне молоко. У пробірку із стерильним молоком вносять 1 мл кислого молока чи іншого кисломолочного продукту. Засіяну пробірку і контрольну (із стерильним молоком) ставлять у термостат при 30-32°C на кілька діб.

Заквашувальні культури випускають у рідкому, замороженому та ліофільно висушеному стані. Якість заквасок контролюють за активністю та чистотою. Активність закваски контролюють за кількістю мікрофлори, кислотністю та тривалістю заквашування. Виробничі закваски для сиру кисломолочного, сметани, простокваші повинні мати кислотність 80-85°Т, для масла і сирів з низькою температурою другого нагріву – 90-100°Т. Кислотність ацидофільної, болгарської заквасок має не перевищувати 95-110°Т, кефірної 95-100°Т, закваски для кумису – 130-160°Т.

Тривалість заквашування при внесенні материнської закваски молочнокислих стрептококів (1-3%) становить 6-8 год., молочнокислих паличок (0,5-1%) – 4-6 год.

Попередній мікробіологічний аналіз закваски проводять щоденно безпосереднім мікроскопуванням пофарбованих препаратів. Мінімальна кількість молочнокислих бактерій неконцентрованих заквасок становить $1 \cdot 10^8$ КУО/г. (колоній утворюючих одиниць).

Мікробіологічний контроль якості заквасок передбачає визначення кількості життєздатних бактерій та сторонніх мікроорганізмів. Слід зазначити, що у заквасках не повинно бути сторонньої мікрофлори.

Процеси ферментації при виробництві багатьох молочних продуктів, таких як сметана, сир, багато сирів йдуть у ферментерах відкритого типу. Як правило, вони займають небагато часу. До одних з найпростіших відносять виробництво кефіру, кисляку, сметани і масла. Наприклад, при виробництві сметани до вершків додають 0,5-1% закваски, використовуваної при виробництві масла. Далі продукт витримують, поки концентрація кислоти не досягне 0,6%.

Процеси отримання молочнокислих продуктів дуже прості та доступні для відтворення в домашніх умовах. Вони не вимагають суворих умов дотримання стерильності, протікають, як правило, при кімнатній або трохи підвищеній температурі. Власне, спочатку вони були одними з перших «домашніх» біотехнологій, які були пізніше поставлені на промислову основу.

При зброджуванні молочного цукру молочнокислими бактеріями, під впливом утворюваної молочної кислоти відбувається *кислотна коагуляція білків молока*. Кислотна коагуляція казеїну лежить в основі отримання структурованого молочного згустку при виробництві кисломолочних продуктів.

При гомоферментативному молочнокислому бродінні з 1 моля лактози утворюється 4 моля молочної кислоти (342 г молочного цукру зброджується до 360 г молочної кислоти). Межа накопичення молочної кислоти залежить від виду застосовуваної закваски, температури сквашування та інших технологічних факторів. Молочнокислі палички мають більш високу межу накопичення молочної кислоти (до 140-250°Т), а лактококи – нижчий (90-130°Т).

Сичужне згортання молока

Отримання сичужного згустку є одним з найскладніших процесів в біотехнології сироваріння, в основі якого лежить ензиматичне перетворювання казеїну в параказеїн, з якого формується просторова структура згустку. Параказеїн утворюється внаслідок втрати казеїном колоїдної стійкості, викликаной гідролітичною дією реніну або інших молокозгортаючих ферментів.

Класичним молокозгортаючим препаратом є сичужний порошок, одержуваний зі слизової оболонки четвертого відділення шлунка (сичуга) підсисних телят і ягнят. Крім нього застосовують пепсини і ферментні препарати, що є сумішшю різних молокозгортаючих ферментів тваринного походження. Також використовують молокозгортаючі ферменти мікробного походження, але вони не є рівноцінною заміною сичужного порошку, оскільки відрізняються більшою протеолітичною активністю.

Сичужне (ензиматичне) згортання молока – перша стадія вироблення сичужних сирів, що складається з двох процесів:

- розщеплення казеїну;
- флокуляції (агрегації) дестабілізованих казеїнових міцел, в результаті якої казеїн зі стану золю переходить в стан гелю і утворюється згусток.

Перший процес іде під дією ензимів і отримав назву *первинної, або ензиматичної фази*.

Паралельно з біохімічним перетворенням казеїнового комплексу в результаті гідролітичної дії молокозгортаючих ферментів проходять фізико-хімічні зміни.

Закінчення цієї фази визначають по припиненню змін в молоці, що викликаються розщепленням казеїну хімозином, наприклад, з припинення збільшення вмісту небілкового азоту. Другий процес йде без участі молокозгортаючих ензимів, в присутності іонів Ca^{2+} , і називається *вторинною (неензиматичною) фазою*.

Виготовлення молочних продуктів є другим за значенням після виробництва алкогольних напоїв харчовим виробництвом, яке базується на використанні мікроорганізмів.

Хоч *технології виготовлення кисломолочних* продуктів відрізняються між собою, вони мають кілька спільних етапів.

I етап – приготування заквашувальних культур. Для цього використовують виробничі штами мікроорганізмів, що попередньо пройшли перевірку на безпечність і мають клінічно доведений позитивний ефект на організм людини. Штами повинні зберігатися в умовах низьких температур (-4°C або у рідкому азоті) чи бути ліофільно висушеними. Для виготовлення кожної серії продукту потрібно використовувати нову ампулу.

Багато, щоб виробничим культурам була притаманна здатність до накопичення упродовж 6-18 год. біомаси у такій кількості, щоб до завершення процесу концентрація мікроорганізмів була не менше як 10^7 клітин у 1 мл чистого продукту.

II етап – приготування сировини і матеріалів. Сировина і матеріали повинні також проходити ретельну перевірку відповідно до вимог Держсанепідемагляду. Доцільно використовувати в технологічному процесі сировину і матеріали, піддані високотемпературній стерилізації (140°C упродовж кількох секунд) або стерилізації автоклавуванням чи ультрафільтрацією.

Виробничі штами активно розвиваються в незбираному, знежиреному і згущеному молоці (вміст сухих речовин – не менше як 18-24 %), вміст білка – 3,7-4,0 % (до вихідного молока додається 4% і більше сухого знежиреного молока). У сировину також вносяться речовини, що забезпечують необхідну в'язкість і текстуру продукту (пектини, агар, крохмаль тощо), стабілізатори. Іноді для збільшення в'язкості й щільності згустків готового продукту додають іони кальцію у вигляді цитрату або глутамату. За використання стабілізаторів молоко повільно нагрівається до $50-70^{\circ}\text{C}$ упродовж 1,5-2 год для їхнього повного розчинення і формування невеличких казеїнових глобул, вкритих жиром.

III етап – заквашування живильної основи. У стерильні ферментери з молоком вноситься необхідна кількість закваски. Найчастіше закваски вносять у молоко, охолоджене до $40-42^{\circ}\text{C}$. У процесі заквашування можна контролювати рН, температуру, концентрацію кисню тощо. Зазвичай

ферментацію здійснюють до досягнення рН 4,8, після чого продукт без різкого перемішування (для уникнення розрідження згустку) охолоджують до 20-25°C, розфасовують. При такій температурі утворюється продукт з найкращою в'язкістю та стійкістю згустку.

IV етап – асептичний (стерильний) розлив. Продукт охолоджують з 20-25°C до 6°C упродовж 8-10 год., щоб не порушити структуру кисломолочного продукту.

V етап – контроль готової продукції за органолептичними, мікробіологічними та іншими показниками.

ЛЕКЦІЯ 15

Біотехнологія продуктів з сировини рослинного походження

План

1. Виробництво спирту
2. Виробництво пива
3. Виробництво вина

Алкогільні напої отримують шляхом зброджування сировини, що містить цукор, в результаті якого утворюються спирт і вуглекислий газ. Першими напоями, отриманими на основі спиртового бродіння, є вино та пиво. До появи робіт Пастера наприкінці XIX століття про суть процесів, що відбуваються при бродінні, і їх механізмах було відомо дуже мало. Пастер показав, що бродіння

здійснюється без доступу повітря живими клітинами дріжджів, при цьому цукор перетворюється на спирт та вуглекислий газ. Зброджування здійснюється дріжджами роду *Saccharomyces*. В одних випадках використовується природний цукор (наприклад, що міститься у винограді, з якого роблять вино), в інших цукор отримують з крохмалю (наприклад, при переробці зернових культур у пивоварінні). Наявність вільних цукрів є обов'язковою для спиртового бродіння за участю *Saccharomyces*, оскільки ці види дріжджів не можуть гідролізувати полісахариди.

У виробництві спиртних напоїв найчастіше застосовують штами дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* або *Saccharomyces carlsbergensis*. Головна різниця між ними полягає в тому, що *S. carlsbergensis* можуть повністю зброджувати раффінозу, а *S. cerevisiae* до цього не здатні.

Вимоги до дріжджів при виробництві алкогольних напоїв такі: дріжджі повинні забезпечувати повноту зброджування, високу його швидкість і легко випадати в осад.

Виробництво спирту

Етиловий спирт застосовується в багатьох галузях економіки та в побуті. Найбільша його кількість в світі використовується в якості добавки до моторних палив чи основного їх компоненту. Крім того, значні обсяги спирту етилового використовуються для технічних потреб, виробництва алкогольних напоїв, в медицині тощо. Загалом можна виділити три основні напрямки використання спирту етилового та, відповідно, три його типи як товарної продукції:

- спирт етиловий ректифікований, застосовується для виробництва алкогольних напоїв, оцту, в деяких галузях харчової промисловості, в медицині;
- спирт етиловий технічний, застосовується в різних галузях промисловості в якості розчинника, незамерзаючого компонента, сировини для подальшої переробки;
- біоетанол (паливний етанол); застосовується в якості компоненту моторних палив чи їх основної частини.

Виробництво етилового спирту за допомогою дріжджів засноване на технології, що давно склалася. У спиртовому виробництві використовують придатні для цього штами роду *Saccharomyces*. Основну масу спирту, що виробляється в даний час, отримують за допомогою дріжджів роду *S. cerevisiae*, іноді *S. uvarum* (*carlsbergensis*), *S. diastaticus*. Найголовніше тут – підібрати дріжджі, які підходять для переробки певного субстрату. Дріжджі *S. cerevisiae* можуть рости на глюкозі, фруктозі, мальтозі та мальтотріозі, тобто на простих цукрах. *S. diastaticus* може також використовувати декстрини, а види дріжджів *Kluveromyces fragilis* та *K. lactis* – лактозу. Великі спиртові заводи завжди підтримують свою власну культуру дріжджів у спеціальних середовищах. Вибір штаму дріжджів під час виробництва спирту визначається його продуктивністю у спеціальних умовах бродіння суслу. Бродіння має йти активно з утворенням спирту у кількості, близькій до теоретичної межі.

Одним з лімітуючих факторів у ферментаційному виробництві етанолу є нездатність мікроорганізмів переносити високі концентрації спирту і викликана цим зупинка процесу бродіння після досягнення відносно високої концентрації спирту. Штами дріжджів, що використовуються у спиртовій промисловості, повинні зберігати життєздатність аж до концентрації етанолу 12-15% (за обсягом). Крім того, якщо в якості сировини використовується зерно, дріжджі повинні мати здатність гідролізувати полісахариди до глюкози. Це необхідно для повного перетворення крохмалю на етиловий спирт та вуглекислий газ.

Етапи виробництва спирту

Виробництво спирту складається з кількох етапів, виконувати які потрібно обов'язково у послідовному порядку. Для отримання чистого етилового спирту (більше 40%) необхідний перегін і очищення вихідної сировини.

Технологія отримання спирту включає наступні етапи:

- підготовка сировини;
- розварювання зерна водою;
- охолодження та оцукровування;
- зброджування;
- відгін спирту;
- ректифікація.

В якості сировини можуть бути використані ячмінь, жито, овес та інші зернові. Не допускається затхлий та пліснявий запахи. Суворої регламентації зерна, яке буде піддано розварюванню, не існує. Рекомендується вибирати сировину з вологістю до 17% і невеликою засміченістю. Зерно очищають від пилки, землі, дрібних каменів, насіння бур'янів та інших сторонніх домішок. Далі його відокремлюють на повітряно-ситовому сепараторі.

Розварювання зерна відбувається з метою руйнування його клітинних стінок. Внаслідок цього крохмаль вивільняється і переходить у розчинну форму. У такому стані він набагато легше оцукровується ферментами. Зерно обробляється парою при надмірному тиску 500 кПа. Коли розварена маса виходить з варильного апарату, зниження тиску призводить до утворення парі.

Подібне збільшення в обсязі розриває клітинні стінки і перетворює зерно на однорідну масу. На сьогоднішній день розварювання крохмалевмісної сировини здійснюють одним із трьох способів: періодичним, напівбезперервним або безперервним. Найбільшу популярність набув безперервний метод. Температура розварювання становить 172°C, а тривалість варіння близько 4 хвилин. Для отримання більш якісного результату вихідну сировину рекомендується подрібнювати.

Сам процес розварювання включає операції:

- Суворе дозування зерна та води;
- Нагрівання замісу до температури варіння;
- Витримка маси при заданій температурі.
- Подрібнене зерно слід змішати з водою в кількості 3 літри на 1 кг зерна.

Зерновий заміс нагрівається парою (75°C) і подається насосом у контактний отвір установки. Саме тут відбувається миттєвий нагрів до температури 100°C. Після цього підігрітий заміс поміщається у варильний апарат.

У процесі *оцукрювання* в охолоджену масу додають солодове молоко (*подрібнене проросле зерно у співвідношенні 1 кг солоду на 2-4 л води*) для розщеплення крохмалю. Активна хімічна взаємодія призводить до того, що продукт стає абсолютно придатним для подальшого процесу зброджування. В результаті виходить сусло, яке містить 18% цукру із кислотністю 0,3 град.

Зброджування сусла починається при введенні в оцукровану масу виробничих дріжджів. Мальтоза розщеплюється до глюкози, яка у свою чергу зброжується у спирт та діоксид вуглецю. Також починають утворюватися вторинні продукти бродіння (ефірні кислоти і т.д.). Цей процес повинен проходити в закритій бродильній установці, яка допоможе запобігти втратам спирту і виділенню діоксиду вуглецю у виробничий цех.

Існують *три основні способи зброджування* цукровмісної сировини: періодичний, періодичний з повторним використанням клітин та безперервний. При *періодичному* процесі субстрат зброжується після внесення до нього вирощеної свіжої закваски, отриманої в аеробних умовах. Бродіння протікає в анаеробних умовах, і весь субстрат, що залишився, перетворюється при цьому на спирт. Після завершення бродіння дріжджі видаляють, для наступного циклу одержання спирту вирощують нову порцію закваски.

При використанні дріжджів за періодичною схемою близько 5% цукру витрачається на зростання клітин та енергозабезпечення синтезу інших сполук: оцтової кислоти, сивушних масел, ацетальдегіду та ін. З цієї причини максимальний вихід становить 48% від субстрату за масою. Слід зазначити, що для періодичного процесу характерна мала об'ємна продуктивність: за 36 годин бродіння утворюється 5% (вага/об'єм) розчин спирту, що відповідає утворенню в середньому 1,4 г спирту на 1 л за 1 год. Недоліками періодичного процесу також є тривале зброджування та неповне використання субстрату.

Ці недоліки можна усунути, застосовуючи *періодичну схему з повторним використанням клітин*. При цьому в кінці циклу дріжджові клітини відокремлюють від збродженої пульпи і зберігають для використання у наступному циклі. Шляхом застосування схеми з повторним використанням клітин або *безперервного бродіння* вихід спирту можна підвищити до 10 г/л на годину. При цьому клітини відокремлюються від барди і використовуються наново: тим самим підтримується висока концентрація клітин у середовищі.

Після завершення зброджування концентрація спирту становить 6-12%. Вона залежить від штаму дріжджів та початкової концентрації цукру. Залишки дріжджів відокремлюють шляхом відстоювання або центрифугування.

У процесі бродіння діоксид вуглецю та пари спирту, що виділяються з бродильної установки, надходять у спеціальні відсіки, де відбувається розподіл водно-спиртової рідини та діоксиду вуглецю. Вміст етилового спирту в бражці має дорівнювати до 9,5 об.%.

Далі приступають до *відгону спирту зі бражки* та його ректифікації. Спирт починає виділятися зі бражки в результаті кипіння при різних температурах. Сам механізм перегонки заснований на наступній закономірності: спирту та воді властиві різні температури кипіння (вода – 100°C, спирт – 78°C). Виділений пар починає конденсуватися і збиратися в окрему ємність. Очищення спирту від домішок здійснюють у ректифікаційній установці.

При підігріванні браги до 90°C пари починають підніматися по колоні у конденсатор, де вони повністю охолоджуються. Після цього чистий спирт надходить в спеціалізовану колону, маючи міцність 50-55 об.%

Виробництво пива

Приготування пива є одним із найбільш складних технологічних процесів у харчовій промисловості. Для отримання напою високої якості потрібно враховувати безліч нюансів і ретельно підбирати інгредієнти.

У класичній технології допускається використання тільки чотирьох компонентів:

Солод – продукт, одержуваний шляхом пророщування насіння злаків. Для виготовлення пива використовується ячмінь. Після замочування насіння ячменю розбухає і в ньому починаються хімічні реакції, що розщеплюють крохмаль на потрібний для бродіння солодовий цукор.

Вода. В пивоварінні воду розрізняють за складом і концентрацією солей. Для деяких сортів пива краще підходить «жорстка вода» (з високим вмістом солей), наприклад, для мюнхенського. Є сорти, зроблені виключно на воді з низьким вмістом солей, це пльзеньське пиво. Сучасні технології дозволяють пивоварам регулювати концентрацію солей у воді з дуже високою часткою точності.

Хміль. Надає пиву характерний гіркий смак і запашний аромат. Він також відповідає за піноутворення. Замінити хміль у виробництві пива без втрати якості неможливо. Це унікальна рослина, до складу якого входить більше 200 речовин, що відповідають за смак. Цікаво, що для пива годяться тільки шишки жіночих рослин хмелю.

Дріжджі. На сьогоднішній день використовуються спеціальні пивні дріжджі сімейства *Saccharomycetaceae*, які не зустрічаються в природі. Вони штучно виведені спеціально для пивоваріння. В залежності від технології бродіння у виробництві пива використовуються два види дріжджів:

- верхового бродіння (*Saccharomycetaceae cerevisiae*) – зустрічаються в таких видах пива як портер, ель і стаут;
- низового бродіння (*Saccharomycetaceae carlsbergensis*) – застосовуються при виготовленні табірною і середньоєвропейського пива.

Різниця між цими видами пивних дріжджів в тому, що на остаточній стадії бродіння дріжджі верхового бродіння збираються на поверхні (спливають), низового – на дні сусла. Це помітно впливає на смак.

Етапи виробництва пива

1. Приготування сусла. Спочатку ячмінний солод дроблять, але зерна не повинні перетворитися в однорідну масу. У складі сусла обов'язкові великі і

дрібні крупинки так званий «солодовий помел». В різних сортах пива співвідношення великих і дрібних частинок істотно відрізняється.

Потім солодовий помел змішують з водою. Цей процес називається «затиранням», а отримана суміш – затором. При додаванні води ферменти ячменю починають розщеплювати крохмаль на солодовий цукор. Для прискорення ферментації затор нагрівають до температури 76°C.

Далі готове сусло фільтрують. Проварений затор переливають з котла в спеціальне сито, закрите знизу. В такому стані затертий солод знаходиться деякий час, поки на дні не осядуть тверді частинки – дробина. Коли сито відкривають, крізь нього і шар дробини починає просочуватися чисте рідке сусло, яке збирається в спеціальний котел для подальшого варіння.

2. Варіння сусла. Отримане на попередньому етапі сусло нагрівають, доводять до кипіння і додають хміль. Кількість шишок залежить від сорту пива і уподобань майстра. У кожній рецептурі використовується різна кількість хмелю.

Варіння сусла займає 2-3 години. В ході цього процесу всі мікроорганізми гинуть і руйнуються ферменти, тому подальші хімічні реакції неможливі.

Далі зварене сусло фільтрують від залишків хмелю і дають йому відстоятися. На дні випадають найдрібніші частинки, які не вдалося відфільтрувати на попередньому етапі. Також на деяких заводах використовується прискорена технологія видалення небажаних залишків центрифугою.

3. Бродіння. Чисте сусло надходить через труби на дно бродильних чанів, т.з. циліндроконічних танків. Після того як сусло повністю охолоне, в чан додають дріжджі. Для пива верхового бродіння перед додаванням дріжджів сусло охолоджують до температури 18-22°C, для пива низового бродіння – до 5-10°C.

Через добу після закладки дріжджів на поверхні бродильного чана утворюється товстий шар піни. Це означає, що дріжджі успішно почали перетворювати цукор в вуглекислий газ і спирт. В ході бродіння виділяється багато тепла, тому сусло потребує постійного охолодження, температура повинна бути стабільною.

В ході бродіння стежать за концентрацією вуглекислоти в чанах. При досягненні максимально допустимого рівня газ відводять по спеціальних трубах. Бродіння зупиняється після того, як весь цукор, що міститься в пиві, розклався дріжджами.

4. Дозрівання. На попередніх етапах вийшло молоде нефільтроване пиво, яке потребує подальшого дозрівання. Для дозрівання потрібні великі ємності з нержавіючої сталі, сам процес триває від кількох тижнів до чотирьох місяців.

Під час дозрівання потрібно підтримувати стабільну температуру і тиск в ємностях, ці параметри не повинні коливатися. На сучасних підприємствах технологічний процес контролює спеціальне обладнання, здатне автоматично змінювати температуру і тиск.

5. Фільтрація. Після дозрівання пиво проходить ще одну фільтрацію двома різними фільтрами, призначеними для очищення від великих і дрібних

частинок. Після цього пінний напій стає абсолютно прозорим і готовим до розливу.

6. Розлив. На заключному етапі виробництва пива його переливають в тару різних видів. Перед розливом в пляшки, кеги, барила їх ретельно миють, потім видаляють повітря, яке потрапило всередину. Пиво є швидкопсувним алкогольним напоєм, який вимагає стерильних умов. Без стерильності термін зберігання готового продукту дуже невеликий і помітно погіршується його смак. При розливі в скляну тару пляшки попередньо пастеризують – повільно нагрівають до температури 65°C, що істотно подовжує термін зберігання пива.

В сучасних технологіях для зниження собівартості пива, збільшення екстрактивності, створення певного смаку застосовуються **несолоджені (не пророщені) матеріали**. Для цього використовують рисову січку, ячмінне борошно, кукурудзяну знежирену крупу, сою, пшеницю, обрубаний ячмінь, а також буряковий цукор і глюкозу. Загальна кількість несолоджених матеріалів, що додається, може становити 15-50 % маси ячмінного солоду.

Оскільки пиво високої якості можна отримати тільки за відсутності в розчині, що зброджується, сторонніх мікроорганізмів проводяться дослідження в цьому напрямку. Шляхом схрещування дріжджів, що мають агресивні властивості, з промисловими пивними дріжджами отримано штам пивних дріжджів, що вбивають дикі дріжджі. Селекціонери також намагаються отримати штам пивних дріжджів, що знищує бактеріальну мікрофлору.

Удосконалити пивні дріжджі можна також, прищеплюючи їм здатність до флокуляції (злипання) клітин в кінці ферментації, що дозволяє видалити дріжджі з готового пива. Флокуляція залежить від складу середовища, умов культивування, але одночасно є генетично обумовленою властивістю, що контролюється генами.

Виробництво вина

Виноробство, на відміну від пивоваріння, до останнього часу було засноване на використанні місцевих дріжджів дикого типу. Єдина обробка, якої піддавали виноград до віджиму, – обкурювання сірчаним газом, щоб сік не темнів. Крім того, сірчаний газ пригнічує діяльність невинних дріжджів; це дозволяє винним дріжджам, які менш чутливі до нього, здійснювати бродіння без перешкод.

Використовуються дріжджі-сахароміцети: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. oviformis*, *S. ellipsoideus*.

Білі столові вина отримують по наступній технологічній схемі:

- Подрібнення винограду і відділення гребенів;
- Стікання і пресування мезги;
- Освітлення соку;
- Бродіння;
- Знімання вина з осаду;
- Обробка і витримка вина.

Подрібнення винограду і відділення гребнів з ціллю отримання високоякісних виноматеріалів проводять на валькових дробарках-гребневідокремлювачах. Подрібнена мезга через перфоровану поверхню

потрапляє в збірник, за допомогою шнека виводиться із машини і надходить в стікач.

Вилучення соку із мезги відбувається спочатку на стікачах. На них відділяють сусло – самотік, що йде на виготовлення високоякісних білих столових вин. Подальше вилучення соку проводиться на пресах. Потім частково осушена мезга поступає в циліндр з обертаючимся шнеком, де відбувається пресування мезги і отримання сусла першого віджиму. Подальше вилучення соку із мезги виконується на пресах періодичної або безперервної дії. Процес пересування чергується з перемішуванням мезги. Сусло, отримане пресуванням, містить велику кількість зважених часток і використовується для виготовлення кріплених вин. Отримане сусло повинно бути звільнено від зважених часточок, залишків шкірки і м'якоті. Для цього сусло витримують у відстійних резервуарах протягом 20-24 годин. Одночасно в сусло вводять SO_2 із розрахунку 75-120 мг/л з ціллю пригнічення життєдіяльності мікроорганізмів, що знаходяться в суслі.

Під час відстоювання сусла відбувається його *освітлення*. Перед освітленням сусло може охолоджуватись до температури 10-12°C, в такому випадку тривалість відстоювання складає 10-12 годин.

Потім освітлене сусло із відстійних резервуарів подається на *бродиння*. Процес бродиння здійснюється періодичним або безперервним способом. Для проведення бродиння використовують бочки, бутилі, металеві або залізобетонні резервуари. При періодичному способі бродиння сусло перекачують в бродильну ємність, вводять розчин винних дріжджів в кількості 2% до об'єму сусла. Температура сусла, що бродить, підтримується на рівні 15-20°C,

В перші декілька днів відбувається розмноження дріжджів і починається повільне бродиння. Потім настає період бурного бродиння, що характеризується інтенсивним виділенням діоксиду вуглецю; він продовжується 8-10 діб. Швидкість бродиння поступово знижується і починається третій період бродиння – доброджування, або тихе бродиння, котре триває 2-3 тижні. В цей період утворення CO_2 послаблюється, дріжджі поступово осідають на дно, відбувається освітлення молодого вина. Разом із спиртом і діоксидом вуглецю в процесі бродиння утворюються вторинні продукти спиртового бродиння (гліцерин, альдегіди, кислоти та ін.), що грають важливу роль у створенні смаку і аромату вина. На накопичення вторинних продуктів бродиння впливає склад сусла, раса дріжджів і умови бродиння. По закінченню бродиння молоде вино знімають із дріжджів, переливаючи його в іншу ємність. Потім молоде вино піддають обробці та витримці.

При безперервному способі бродиння проводять в бродильних установках, що складаються із шести основних бродильних резервуарах місткістю 2000 дал кожен і п'яти напірних баків. Бродильні резервуари з'єднані системою трубопроводів, що забезпечують перетікання збродженого сусла із резервуара в резервуар, заповнення і звільнення установки. Зброджуване сусло перетікає послідовно через всі резервуари під тиском створеним діоксидом вуглецю.

При виготовленні червоних столових вин на відміну від білих забезпечують хороший контакт суслу з мезгою для більш повного вилучення із неї фарбуючих, дубильних і ароматичних речовин. Отримані вина відрізняються інтенсивним забарвленням, характерним смаком і ароматом. Червоні столові вина виготовляються із червоних сортів винограду із вмістом цукру не менше 17% і кислотністю 6-9 г/л. Після подрібнення і відокремлення гребнів мезга подається в накопичувальні резервуари і змішується в потоці з SO₂ (витрата 72-100 мг/л).

Існує декілька технологічних схем переробки винограду для отримання червоних вин. Наприклад, отримана мезга занурюється в резервуари, в яких при 28-32°C протікає бродіння з плаваючою або зануреною «шапкою». В процесі бродіння під дією виділеного CO₂ шкірка винограду спливає і накопичується на поверхні суслу, утворюється «шапка». З ціллю кращого вилучення із неї фарбуючих і дубильних речовин «шапку» періодично, 3-4 рази на добу перемішують. При досягненні молодим вином необхідного забарвлення його відділяють від мезги, а мезгу пресують. Червоні вина можна отримати і шляхом попередньої теплової обробки мезги при 55-60°C до надання суслу необхідного забарвлення. Після цього мезгу охолоджують і пресують. Отримане червоне сусло зброджують по білому способу.

Після завершення спиртового бродіння молоде вино зберігають у особливих умовах, щоб воно не зіпсувалося. Якщо вино не передбачається піддавати яблучно-молочнокислому доброджуванню, з нього видаляють дріжджі, щоб припинити бродіння. Потім обробляють сірчанним газом, щоб придушити окислювальні процеси, що викликають його потемніння.

Першосортні вина витримують різним чином залежно від типу вина, а більш дешеві розливають, як правило, у той же рік, коли вони були отримані. Труднощі при виробленні дешевих вин зазвичай пов'язані з їхньою схильністю до вторинного, яблучно-молочнокислого бродіння, яке розвивається на час розливу. Якщо вино схильне до такого бродіння, його штучно викликають до розливу або пригнічують. При виробництві першосортних червоних вин таке бродіння навіть бажане. Воно становить природну частину процесу та відбувається при зберіганні. Цей тип бродіння здійснюється молочнокислими бактеріями, зокрема *Leuconostoc*, *Lactobacillus* та *Pediococcus*. Воно не йде за низьких значень рН; створивши такі умови, його можна придушити. У білих винах яблучно-молочнокисле бродіння проходить рідше, оскільки рН у них нижче. Для ініціації бродіння іноді замість бактерій використовують іммобілізовані ферменти.

У виноробстві також використовуються ферментні препарати, зокрема пектолітичної дії. Застосування пектинази збільшує швидкість фільтрації суслу, сприяє його освітленню та стабілізації. При цьому зростає вміст екстрактивних речовин, вітаміну С, флавоноїдів, які мають Р-вітамінну активність.

Подальші успіхи виноробства будуть визначатися використанням ефективніших штамів винних дріжджів та комерційних препаратів винних заквасок. Це дозволить отримувати вина найвищої якості.

За допомогою клітинної та генної інженерії створюються високопродуктивні штами винних дріжджів, розробляються безперервні процеси зброджування соку з використанням іммобілізованих клітин.

ЛЕКЦІЯ 16

Іммобілізація ферментів та клітин

План

1. Загальні відомості про іммобілізацію
2. Властивості, що набувають ферменти при іммобілізації
3. Фізичні методи іммобілізації
4. Хімічні методи іммобілізації
5. Іммобілізація клітин

Більш широке використання ферментів до останнього часу стримувалося рядом причин, з яких найважливішими є: проблеми, що виникають при використанні ферментів

- трудомісткість відділення ферментів від початкових компонентів і продуктів реакції після завершення процесу, в наслідок чого ферменти використовуються, як правило, одноразове;
- нестійкість ферментів при зберіганні, а також при різних впливах (головним чином теплових);
- трудомісткість очищення ферментів і отримання їх в достатньо активному вигляді.

Шляхом подолання цих труднощів є отримання так званих іммобілізованих ферментів.

Іммобілізація – обмеження рухливості молекул ферментів, оснований на фізико-хімічних принципах, що дозволяють зміцнити структуру ферменту таким чином, щоб активний центр його молекули зберігав власну працездатність (каталітичну активність) тривалий час, не підлягаючи структурним змінам, що викликають порушення його конфігурації.

При іммобілізації ферменти з розряду гомогенних каталізаторів (тобто каталізаторів, що знаходяться в тій самій фазі, що й субстрати реакції) переходять у розряд гетерогенних (тобто тих, що утворюють особливу фазу, яка відокремлена від реагентів). Ферменти і реагенти можуть бути розділені, що дозволяє: а) в певний час зупинити реакцію; б) регенерувати (поновити) фермент після закінчення реакції і використовувати його для нового циклу біотехнологічного процесу; в) отримати продукт реакції без домішок ферменту, що має особливе значення для харчової і фармацевтичної промисловості.

Процес може бути чисельно реалізований в періодичному режимі з використанням одного той самого ферментного препарату. Ще важливіше можливість безперервного режиму з використанням відомого у хімічній технології принципу взаємодії рухливої і нерухливої фаз. Рухлива фаза – розчин, суспензія, емульсія реагентів – протікає через реактор, заповнений насадкою з іммобілізованим на носії біокаталізатором.

Фактором, що сприяє тривалому, в тому числі безперервному, функціонуванню іммобілізованих біокаталізаторів, є їх збільшена стабільність, зберігання активності тривалий час як при зберіганні, так і при біотехнологічному процесі.

Ферменти при іммобілізації набувають властивості, які не здатні для них у вільному стані.

Стабілізація ферменту при іммобілізації. Включення ферменту в осередку полімерної структури, внутрі- і міжмолекулярні зшивання його, закріплення його на носії - все це зміцнює фермент в робочій конформації і запобігає руйнуванню і денатураційним перебудовам. Це пояснює збільшення стабільності іммобілізованого ферменту при тривалому зберіганні і функціонуванні, а також його більшу стійкість до впливу підвищеної температури, екстремальних значень рН, органічних розчинників. Як що

ферменти включені у мікропористий носій, полімерні структури або мікрокапсули, то вони також захищені від впливу мікроорганізмів.

Зміна функціональних властивостей ферментів при іммобілізації. На характеристики ферменту при іммобілізації суттєво впливає мікрооточення, що визначається природою носія. Так іммобілізація ферменту на аніонному або катіонному поліелектроліті зрушує його оптимум рН, відповідно, в лужний або кислий бік.

Іммобілізація викликає зниження ефективності інгібіторів ферментів. Одной з причин цього може бути ускладнення доступу інгібіторів до іммобілізованого ферменту.

Важливе практичне значення іммобілізації полягає в тому, що ферментам можна надати властивість функціонувати у неводному середовищі, зокрема в органічних розчинниках. Складається якби двофазна система, оскільки носій ферменту утримує в собі воду, і завдяки цього водного мікрооточення зберігається каталітична активність.

Суть іммобілізації ферментів полягає в прикріпленні їх в активній формі до нерозчинної основи або включенні в напівпроникну мембранну систему. Існує два методи іммобілізації ферментів: фізичний та хімічний.

Фізичні методи полягають у зв'язуванні ферменту без участі ковалентних зв'язків. Вони поділяються на два типи: адсорбційні та механічні.

При адсорбційній іммобілізації фермент утримується на поверхні носія за рахунок електростатичних, гідрофобних та водневих зв'язків, а також дисперсійних взаємодій. При механічному способі іммобілізації відбувається включення ферменту в гелі, які зшиті поперечними зв'язками, включення ферменту в мікрокапсули, волокна, мембрани тощо. Фізичні методи іммобілізації прості, швидкі й ефективні. Вони широко застосовуються в інженерній ензимології.

Виділяють чотири таких типи зв'язування ферментів:

- адсорбція на нерозчинних носіях;
- включення в пори гелю;
- просторове відділення ферменту від об'єму реакційної системи за допомогою напівпроникної мембрани;
- включення в двофазне середовище, де фермент розчиняється і перебуває тільки в одній із фаз.

Найпростіший метод іммобілізації ферменту – це *адсорбція на нерозчинному носії*. Процедура іммобілізації полягає в змішуванні за придатних умов ферменту й носія, інкубації і відділенні нерозчинного компонента суміші від розчинного компонента центрифугуванням або фільтруванням.

Адсорбція ферментів на носіях здійснюється переважно за рахунок сольових та водневих зв'язків, а також Ван-дер-ваальсових сил. В ідеальному випадку іммобілізація ферменту не повинна призводити до втрати каталітичної активності.

Недолік цього методу полягає в тому, що фермент може зв'язуватися з носієм недостатньо міцно, тобто отримані похідні не володіють стабільністю: вплив незначних умов (рН, іонної сили, температури і природи розчинника)

може призвести до десорбції ферменту з носія. Десорбцію ферменту може викликати також і субстрат. Вказані недоліки зменшують широке використання методу адсорбції для іммобілізації ферментів.

Переваги методу – простий, легкий у використанні, дешевий, забезпечує високий вихід і рівномірне розподілення зв'язаного ферменту в носії.

Ферменти можна адсорбувати (внаслідок фізичних або іонних взаємодій) на кераміці, склі, силікагелі, оксидах і гідроксидах металів, полісахаридах, органічних смолах та інших носіях. Для посилення адсорбції ферменти іноді хімічно модифікують, вводячи в поверхневий шар білкової глобули додаткові іонні або гідрофобні групи.

Методика адсорбційної іммобілізації. На практиці для одержання іммобілізованих адсорбцією ферментів використовуються такі методичні підходи.

Статичний метод найбільш простий і полягає в тому, що носій додають у водний розчин ферменту і одержану суміш залишають на певний час без перемішування. Іммобілізація досягається за рахунок довільної дифузії ферменту до поверхні носія з подальшою адсорбцією. Недоліком методу є те, що для одержання препарату з високим вмістом адсорбованого ферменту потрібен тривалий час.

Спосіб з перемішуванням, або *динамічний метод*. При ньому носій суспендується в розчині ферменту і одержана суміш безперервно перемішується за допомогою магнітного чи механічного змішувача, або на лабораторній гойдалці. Цей спосіб більш ефективний за попередній.

Відокремлення іммобілізованого ферменту проводиться шляхом фільтрування або центрифугування. Після відмивання неадсорбованого ферменту препарат готовий до використання.

Метод електроосадження. У цьому випадку в розчин ферменту занурюють два електроди з нанесеним на поверхню одного з них шару носія. При вмиканні електричного струму молекули ферменту завдяки наявним на їх поверхні зарядженим групам починають переміщуватися в розчині й осаджуються на поверхні носія.

Метод нанесення в колонці. Найбільш зручний для технологічного використання іммобілізованого ферменту. Через колонку, заповнену носієм, за допомогою помпи прокачують розчин ферменту, причому швидкість потоку має бути такою, щоб частинки були у завислому стані, утворюючи «кип'ячий шар». Промивку теж проводять у колонці.

Включення ферменту в гель. Суть цього методу полягає в тому, що молекули ферменту включаються у трьохмірну сітку із тісно переплетених полімерних ланцюгів, що утворюють гель. Іммобілізацію ферментів у гелі проводять двома способами.

1. Фермент поміщають у водний розчин мономеру, а потім проводять полімеризацію, в результаті чого утворюється полімерний гель із включеними в нього молекулами ферменту. В реакційну суміш часто додають також біфункціональні зшиваючі агенти, які надають полімеру, що утворюється, структуру трьохмірної сітки.

2. Альтернативний спосіб – фермент вносять у розчин уже готового полімеру, який потім якимось чином переводять у гелеподібний стан.

До переваг методу відносять простоту реалізації, можливість створювати іммобілізовані препарати будь-якої геометричної конфігурації, забезпечуючи при цьому рівномірний розподіл біокатализатора в об'ємі носія. Багато полімерних гелів володіють високою механічною, хімічною і тепловою стійкістю, що дає змогу багаторазово використовувати іммобілізовані препарати на їх основі. Іммобілізація в гелі призводить до значної стабілізації ферментів (вихід активності до 90 %). Фермент, включений у гель, також надійно захищений від інактивації внаслідок бактеріальної контамінації.

Основним недоліком цього методу є те, що полімерна матриця створює значні перешкоди для дифузії субстрату до ферменту, знижуючи цим каталітичну ефективність іммобілізованого препарату.

Таким методом можна іммобілізувати α -амілазу, глюкоамілазу, глюкооксидазу та ін. Попередньо фермент адсорбується на порошкоподібних каоліні, желатині, крохмалі, целюлозі.

Для іммобілізації ферментів використовують також гелі полікремнієвої кислоти (силікагель), поліакриламідний гель, гель кальцію альгінату, каррагінану, агару тощо.

Іммобілізація ферментів з використанням напівпроникних мембран. Цей метод іммобілізації здійснюється за таким принципом: водний розчин ферменту відділяється від водного розчину субстрату напівпроникною мембраною, яка легко пропускає невеликі молекули субстрату, але представляє собою непроникний бар'єр для крупних молекул ферменту.

Перевагами цього методу є збереження каталітичної активності ферменту, підвищення його стабільності, а також можливість одержувати іммобілізовані препарати з високим вмістом включеного ферменту.

Основним недоліком мембранних систем є неможливість ферментативного перетворення високомолекулярних субстратів, для яких мембрана створює дифузійний бар'єр.

Існують модифікації цього методу, які відрізняються лише за способами одержання напівпроникної мембрани та її природою.

Мікрокапсулювання ферментів у напівпроникні мембрани. Суть методу: водний розчин ферменту включають всередину мікрокапсул, які представляють собою замкнуті сферичні кульки з тонкою полімерною стінкою (мембраною).

Метод мікрокапсулювання ферментів дозволяє отримати капсули з тонкою та ультратонкою мембраною (0,1 – 2,0 мкм), що позитивно впливає на характеристики іммобілізованого препарату (збільшення активності поверхні та зменшення дифузійних ускладнень).

Перевага мікрокапсулювання — велика площа поверхні, що припадає на одиницю активності іммобілізованого ферменту. Це дає змогу використовувати високі концентрації ферменту в початковому розчині та досягати більшої ефективності дії іммобілізованого препарату.

Недоліком методу є дифузійні ускладнення, що виникають при проходженні субстрату та продуктів реакції через полімерну напівпроникну оболонку.

Метод включення ферментів у волокна полягає у розчиненні волокна полімеру в органічному розчиннику, емульгуванні отриманого розчину з розчином чи суспензією ферменту і продавлюванні емульсії через тонкі отвори прядильного пристрою в рідину, що коагулює (наприклад, у толуол).

Одержані волокна представляють собою пористі полімерні гелі, що містять гомогенну дисперсію невеликих крапель водного розчину ферменту розміром близько 1 мкм. Ферментвмісні волокна володіють високою механічною міцністю.

Від мікрокапсулювання цей спосіб іммобілізації відрізняється, головним чином, формою одержуваних препаратів.

До іммобілізації з використанням напівпроникних мембран належить *метод включення в ліпосоми*, які застосовують, головним чином, з медичною метою, а також при проведенні фундаментальних досліджень (такі системи подібні до природних мембран, тому їх вивчення може дати корисну інформацію про ферментативні процеси в клітині).

Хімічні методи іммобілізації

До хімічних методів іммобілізації належать іммобілізація за допомогою ковалентного зшивання з полімерним носієм та поперечного зшивання ковалентними зв'язками молекул білка без носія.

Переваги таких препаратів:

1. Висока міцність утвореного кон'югату, що забезпечується ковалентним зв'язком ферменту з носієм. При варіюванні умов таких як рН, температура фермент не десорбується з носія і не забруднює цільових продуктів каталізуємої ним реакції.

2. При хімічній модифікації ферментів можливі зміни їх властивостей (субстратної специфічності, каталітичної активності, стабільності). Саме завдяки цьому методу вдається досягти найбільших ефектів стабілізації ферментів.

Суттєвим недоліком хімічної іммобілізації є інактивація ферменту. Однак, цього можна запобігти, якщо проводити іммобілізацію при наявності субстрату, який захищає активний центр.

Метод ковалентного зв'язування ферментів має два різновиди.

1. Ковалентні зв'язки утворюються між реактивними групами носія та ферменту (безпосередньо або через проміжну ланку). В утворенні цих зв'язків з боку ферменту беруть участь функціональні групи амінокислотних залишків, з яких найбільшу перевагу мають аміногрупи L-лізину та карбоксильні групи глутамінової і аспаргінової кислот.

2. *Сополімеризаційний метод* – молекули ферменту зв'язуються одна з одною за допомогою біфункціонального реагенту з утворенням нерозчинного „суперполімеру”, який може розглядатися як носій.

Даний метод є більш гнучким, порівняно з попереднім, завдяки можливості широкого вибору зшиваючого реагенту для іммобілізації.

Суть методу полягає в утворенні різного типу тривимірних сіток, вузлами яких є молекули ферменту, ковалентно пов'язані між собою через зшиваючий реагент. Розмір молекули реагенту визначає дифузійні характеристики усієї системи. На першій стадії у молекулу ферменту вводять подвійні зв'язки, що забезпечують здатність до сополімеризації. Наприклад, фермент ацилюють акрилоїлхлоридом, потім акрилоїлірований фермент вносять у розчин мономеру і проводять сополімеризацію. У результаті фермент виявляється хімічно “вшитим” у полімерну сітку гелю.

Імобілізація ферментів металохелатним методом. Для уникнення недоліків при імобілізації ферментів методами ковалентних зв'язків можна використовувати властивості перехідних металів утворювати хелатні комплекси. В якості перехідних металів використовують титану хлорид чистий або у кислому розчині, гідроксиди титану, цирконію, хрому (їх оксиди нетоксичні), заліза, ванадію, олова. Як носії – похідні целюлози і силікагелі, глутаровий альдегід. Желеподібні гідратовані оксиди металів утворюють з ферментом нерозчинні комплекси, що володіють доброю ферментативною активністю. На целюлозі одержують препарати імобілізованих ферментів з найбільшою активністю.

В даний час *імобілізованими вважають клітини*, для яких створені штучні обмеження рухливості в зовнішньому середовищі, а матеріальний посередник, що забезпечує обмеження рухливості, вважається носієм. В цілому система клітина-носій називається імобілізованим біокаталізатором.

Перевага імобілізованих клітин, порівняно з імобілізованими ферментами полягає головним чином в тому, що при використанні імобілізованих клітин

- відпадають стадії виділення, очищення та імобілізації самих ферментів, які, як правило, є найбільш дорогими при здійсненні повного технологічного процесу.

- зниження витрат на виділення і очищення продуктів реакції;

- можливість створення безперервних і напівбезперервних автоматизованих процесів;

- ферменти в клітинах знаходяться в найбільш природному оточенні, що позитивно позначається на їх термостабільності, а також на їх операційній стабільності (тривалості роботи). Відомо багато прикладів, коли після виділення з організму ферменти швидко втрачали активність, а іноді їх взагалі не вдавалося виділити в активній формі, тоді як в клітинах вони зберігають каталітичні властивості досить довго. У цих випадках застосування цілих клітин, а не ферментів цілком виправдано і єдино прийнятним.

- імобілізація цілих клітин підвищує безпеку і термін роботи в якості каталізатора в порівнянні зі звичайними клітинами.

З мільйонів відомих людині видів мікроорганізмів в промисловості використовують всього тисячі штамів відносно невеликого числа видів. Це пов'язано з тим, що виробничий штам повинен відповідати ряду строгих вимог:

- рости на дешевих субстратах;
- володіти високою швидкістю росту або давати високий вихід продукту за короткий час;
- проявляти синтетичну активність, пов'язану з утворенням бажаного продукту при низькому вмісті побічних продуктів;
- утворювати максимально високу концентрацію цільового продукту, щоб витрати на його виділення були економічно виправдані;
- бути стійким до фагової і іншими видами інфекцій;
- бути не токсичними (нешкідливими) для людей і навколишнього середовища;
- бажано використовувати штами, для яких легко підтримувати стерильність у виробництві.

За допомогою іммобілізованих мікроорганізмів реалізуються процеси, в яких, використовуючи природні (або придбані) властивості клітин, можна довго підтримувати на постійному рівні їх синтетичну активність, спрямовану в бік утворення необхідного продукту.

Для зниження собівартості кінцевого продукту необхідно, щоб промислові штами були екстремофільними, т. е. росли при підвищених температурах, дуже високих концентраціях солей, кислих або лужних рН.

Стерильність мікробіологічного виробництва - проблема, реалізація якої вимагає значних капіталовкладень. При експлуатації іммобілізованих клітин вимоги до стерильності виробництва кілька знижуються і, в цьому випадку з'являється ряд переваг.

По-перше, процеси, в яких можна використовувати іммобілізовані клітини, як правило, реалізуються в тривалому проточному режимі (зменшується число маніпуляцій з вільними клітинами, а також проточність системи реактора не дає можливості потрапляють спорам і одиничним мікроорганізмам розмножуватися).

По-друге, висока концентрація мікроорганізмів, що активно здійснюють метаболічні процеси, створює несприятливі умови для розмноження поодиноких клітин сторонньої мікрофлори.

По-третє, якщо іммобілізація проведена шляхом включення в будь-якої гелевий носій, то сторонні мікроорганізми в матрицю носія, як правило, не потрапляють.

Зрозуміло, що не так легко в природі підібрати штами, які відповідають всім перерахованим вимогам. Для проведення подібної роботи в даний час розроблені раціональні скринінгові методи, які дозволяють відібрати клітини, які мають (або придбали в результаті мутагенезу) високу продуктивність і/або інші корисні для виробництва властивості. Вельми перспективним представляються способи поліпшення виробничих показників штамів шляхом використання рекомбінаційних методів, що дозволяють цілеспрямовано отримувати мікроорганізми із заданими властивостями.

Заміна вільно культивованих клітин мікроорганізмів на біокатализатори у вигляді іммобілізованих препаратів піднімає біотехнологічний процес на

новий якісний рівень. Сама іммобілізація змінює умови проведення біологічних процесів в більшій мірі, ніж властивості самих організмів.

Використання іммобілізованих мікроорганізмів зачіпає і екологічний аспект. Періодичне і безперервне культивування мікроорганізмів для виробництва різних речовин призводить до того, що корисний продукт утворюється при регулярному нарощуванні біомаси, що не утилізується і є відходом. Будь-які, навіть непатогенні мікроорганізми, при досить високій концентрації погіршують екологію повітря, води, ґрунту, можуть викликати алергічні захворювання у людей і т. д. Заміна вільно культивованих клітин на іммобілізовані позбавляє від необхідності регулярного нарощування біомаси.

При необхідності використання патогенних або умовно патогенних мікроорганізмів в разі їх іммобілізації в масі носія, вони виявляються ізольованими від навколишнього середовища. Застосування іммобілізованих клітин пов'язано з рішенням деяких нових проблем, наприклад, повторної утилізації або, навпаки, знищення відпрацьованого біокатализатора.

Існує і можливість повторної утилізації і носія: наприклад Криогель полівінілового спирту, використаний в якості носія протягом трьох місяців, розплавляють при температурі 90-100⁰С і потім знову використовують.

Слід зазначити і *труднощі*, які виникають при заміні вільно культивованих клітин на іммобілізовані.

Перше, консистенція сировини, використововуваного в мікробіологічному виробництві. Так, наприклад, процес отримання етилового спирту з гідролізатів некондиційного картоплі і зерна. Така сировина являє собою надзвичайно густу неомогенну масу, що містить велику кількість твердих частинок. Застосування в даному процесі іммобілізованих клітин є недоцільним, оскільки з одного боку, неможливо здійснювати безперервну подачу в реактор густого живильного середовища, а з іншого, важко підібрати відповідний метод іммобілізації дріжджів і носій, які в цьому випадку забезпечили б збереження іммобілізації.

Друге, значну проблему при використанні іммобілізованих біокатализаторів створює масопереніс, оскільки в останньому випадку не можна використовувати традиційні для культивування вільних клітин способи інтенсивного перемішування або барботації газів.

У дослідженнях по іммобілізації мікроорганізмів і їх використанні виділяють два основних напрямки, що розрізняються за завданнями:

1. Створення каталізаторів для процесів біотрансформації різних органічних сполук (розщеплення або синтезу специфічних зв'язків, модифікації конкретних груп і т. д.).
2. Створення каталізаторів для реалізації процесів біосинтезу різних органічних сполук, в тому числі первинних та вторинних метаболітів, з компонентів живильного середовища.

Очевидні відмінності цих напрямків визначають конкретні вимоги, що пред'являються до фізіологічних характеристик іммобілізованих клітин.

Методи іммобілізації клітин подібні до методів іммобілізації ферментів.

Хімічний метод оснований на утворенні ковалентних зв'язків з активованим носієм, на поперечному зшиванні клітин за рахунок активних груп у клітинній оболонці з біфункціональними реагентами (наприклад, глутаровим альдегідом).

До фізичних методів відносяться адсорбція і агрегація.

Хімічні методи використовуються рідше, порівняно з іншими, та є малоприматними для іммобілізації живих клітин. Найбільш поширеними методом є включення клітин до складу гелів, мембран і волокон.

Іммобілізація клітин включенням у різні гелі, мембрани, волокна основана на хімічних і фізичних взаємодіях. При такому способі іммобілізації клітини можуть зберігати життєздатність та, за наявності поживного середовища, розмножуватися у приповерхневих шарах гелів.

У випадку адсорбційної іммобілізації використовується природна здатність багатьох мікроорганізмів закріплюватися на різноманітних твердих або желеподібних носіях і продовжувати свою життєдіяльність у стані обмеженої рухливості. При цьому процедура штучної іммобілізації передбачає найчастіше просте пропускання суспензії клітин через реактор з адсорбентом.

Недолік даного методу – незначна міцність утримання клітин і обмежена кількість біомаси, що адсорбується одиницею носія. Ці недоліки значною мірою можна усунути при використанні крупнопористих носіїв (пористого скла, кераміки тощо). Величина пор при цьому повинна в кілька разів перевищувати розмір клітин.

Методи ковалентної іммобілізації клітин на нерозчинних носіях

У більшості випадків ковалентної іммобілізації клітин на носії використовують хімічні реакції за участю аміногруп компонентів поверхні клітини.

Запропоновано метод ковалентного зв'язування клітин з силікагелем, активованим солями перехідних металів. Перевагою силікагелю є відсутність набухання в різних розчинниках і водних розчинах, висока механічна міцність, стійкість до дії мікроорганізмів.

Важливо, що в результаті такої реакції не змінюється склад рідкої фази – в неї не переходять речовини, здатні несприятливо впливати на клітини. На сьогодні метод ковалентної іммобілізації клітин мікроорганізмів на нерозчинних носіях не дуже поширений у використанні. Галуззю застосування таких біокаталізаторів є переважно вузькоспеціалізовані, невеликі за обсягом системи типу заснованих на іммобілізованих клітинах чутливих елементів біодатчиків.

Методи штучної агломерації клітин мікроорганізмів

Способи формування відносно великих (порівняно з одиночними клітинами) і механічно досить міцних мікробних асоціатів, що за своїми властивостями задовольняли б вимогам, що висуваються до часток іммобілізованих біокаталізаторів, засновані на загальних принципах закріплення мікроорганізмів на носії: це адсорбція (біоспецифічна,

неспецифічна або їхнє сполучення), або хімічна зшивка. У ролі носія тут виступає клітина, з'єднана із сусідніми клітинами стійкими в часі зв'язками.

Деякі автори називають цей варіант "іммобілізацією без носія", маючи на увазі відсутність у системі виконуючого функцію носія додаткового неклітинного матеріалу.

Технологічно найбільш простий випадок – самофлюкуляція. Відомо, що багато мікроорганізмів здатні агрегувати із суспензій з високим вмістом біомаси, утворюючи так звані флокули (біофлокули). Ця властивість притаманна штамам дріжджів, бактерій, деяким міцеліальним культурам.

Універсальних прийомів одержання флокул з характеристиками (сукупністю фізико-механічних властивостей, біологічної продуктивності, стабільності функціонування), що підходять для роботи в звичайних реакторах, не існує.

Головними перевагами самофлюкуляції перед іншими методами іммобілізації клітин є:

- відсутність істотних стресових впливів на організми (це дозволяє використовувати одержуваний каталізатор у процесах, де необхідна погоджена робота ферментних систем живої клітини);
- можливість досягнення значних питомих концентрацій маси в реакторі (сприяє високій продуктивності технологічної системи в цілому).

Показано, що в ряді випадків механічна міцність флокул цілком достатня для функціонування у колоночних реакторах витіснення і, навіть, у реакторах, заснованих на псевдозрідженні, де частки піддавалися рушійним навантаженням. Проте самофлюкуляція і висока стабільність флокул – поєднання властивостей, що не часто зустрічається.

В якості флокулюючих агентів використовують водорозчинні синтетичні поліаміни (полікатиони) або частково гідролізований поліакриламід (сополімер акриламідів з акриловою кислотою – полікатион). Однак, при формуванні зазначених біофлокул досить складно одержати частки з прийнятними для великомасштабної технології характеристиками (міцністю, розмірами, формою).

Іммобілізація клітин мікроорганізмів у масі носія

Метод включення клітин у полімери різної природи застосовується як у лабораторному, так і в промисловому масштабі. При цьому як носій використовують природні полімери (каррагінан, агар, желатину, хітозан, колаген, різні пектини) і синтетичні (поліакриламідний гель, фото чутливі полімери, поліуретани, полівініловий спирт та ін.). Залежно від їх механічних властивостей і характеру проведеного процесу полімери можуть використовуватися в різній формі: гранул, мембран, волокон.

Іммобілізація клітин і ферментів з включенням в гель відноситься до механічних методів. Гель, в який включають клітини, як правило, складається зі сферичних часток. Включення живих клітин вимагає м'яких умов іммобілізації, носій повинен представляти систему відкритих пор з хорошими умовами для газообміну.

При виборі способу іммобілізації і носія для створення ефективного біокаталізатора слід, безумовно, користуватися фізіологічними і метаболічними особливостями продуцента.

ЛЕКЦІЯ 17

Застосування іммобілізованих ферментів і клітин

План

1. Можливості застосування мікроорганізмів
2. Застосовуються іммобілізованих препаратів в різних галузях промисловості

3. Екологічний аспект застосування іммобілізованих мікроорганізмів

Промислове впровадження іммобілізованих препаратів відбувається в тих процесах, де продукт реакції не може бути отриманий без їх участі або де вартість продукту настільки перевищує вартість вихідної сировини, що отримана різниця може окупити витрати на використовувані препарати і їх іммобілізацію. Саме цим пояснюється останнім часом підвищений інтерес до процесів іммобілізації і використання іммобілізованих ферментів і клітин.

Розробка технологічних процесів із застосуванням іммобілізованих ферментів і клітин проводиться в різних країнах, в першу чергу, в Японії, Італії, США, Данії, Голландії.

У 60-ті і особливо в 70-і роки минулого століття проводилися інтенсивні дослідження і прикладні розробки в області отримання та застосування іммобілізованих біокатализаторів, причому в цій якості використовувалися в основному ферменти або клітини мікроорганізмів, що мають в своєму складі той чи інший «корисний» фермент.

Можливості застосування мікроорганізмів

1. Утилізація відходів, контроль за станом навколишнього середовища
2. Отримання енергії (біоенергія)
3. Отримання кормів, їжі, напоїв, виробів побутової хімії
4. Заміна традиційної сировини на нетрадиційні
5. Видобуток мінеральної сировини (в т.ч. з моря)
6. Очищення і концентрація речовин
7. Отримання фізіологічно активних сполук
8. Застосування для біосинтезу, біотрансформації і біодеградації
9. Застосування для цілей технічної мікробіології
10. Використання в охороні здоров'я, ветеринарії
11. Використання в біоелектроніці

До 90-их років ХХ ст. дев'ять процесів з використанням іммобілізованих ферментів або клітин знайшли великомасштабне застосування в ряді країн світу:

1. Виробництво глюкозо-фруктозних сиропів з глюкози з використанням іммобілізованої глюкозоізомерази.
2. Поділ рацемічних сумішей амінокислот з використанням іммобілізованої аміноацілази.
3. Виробництво оптично активних D-амінокислот з амінокислот з використанням іммобілізованої гідантоїнази.
4. Синтез L-аспарагінової кислоти з фумарової кислоти з використанням іммобілізованих мікробних клітин, що містять аспартазу.
5. Синтез L-яблучної кислоти з фумарової кислоти з використанням іммобілізованих мікробних клітин, що містять фумарази.
6. Ферментативна модифікація антибіотиків з використанням іммобілізованої пеніциллінамідази.

7. Отримання глюкозо-галактозних сиропів з молочної сироватки з використанням іммобілізованої лактази.

8. Отримання дієтичного безлактозного молока з використанням іммобілізованої лактази.

9. Отримання глюкозо-фруктозних спиртів з сахарози з використанням іммобілізованої інвертази.

Ряд процесів знаходяться в стадії відпрацювання та обговорення доцільності їх великомасштабного застосування. До них в першу чергу відносяться:

1. Отримання глюкози з часткових гідролізатів крохмалю з використанням іммобілізованої глюкоамілази.

2. Отримання глюкози і (або) етанолу з целюлози з використанням іммобілізованої целюлази

Ферменти, як біологічні каталізатори, застосовуються в різних галузях промисловості – харчовій, фармацевтичній, текстильній, шкіряній, в медицині, сільському господарстві, в тонкому органічному синтезі, для очищення стічних вод тощо.

Зокрема, широкого використання набули іммобілізовані ферменти та ферментні композиції в технологічних процесах *харчової промисловості*, таких як гідроліз крохмалю, білків, полісахаридів, освітлення вин, соків, покращення їх фільтрації, інтенсифікації процесів дифузії; в консервній промисловості; в масложировій – вдосконалення процесів рафінації і екстракції, гідроліз масел, покращення якості харчових продуктів, удосконалення умов їх зберігання після обробки іммобілізованими ферментами. В харчовій промисловості за участі іммобілізованих ферментів також одержують глюкозо-фруктозні сиропи, глюкозу, яблучну та аспарагінову кислоти, оптично активні L-амінокислоти, дієтичне безлактозне молоко, цукри із молочної сироватки тощо.

Для *синтетичної органічної хімії* важливим є збереження ферментом каталітичної активності у двофазних реакційних середовищах навіть при досить малому вмісті води. Тому рівновагу реакції, що каталізується, (вихід продукту) експериментатор може регулювати в широких межах, підбираючи необхідний органічний розчинник.

Іммобілізовані ферменти дали поштовх до створення принципово нових методів «безреагентного» неперервного аналізу багатокomпонентних систем органічних та неорганічних сполук. Головною ланкою у цих методах є «ферментні електроди» та «ферментні термістори». Важливу роль у контролі за станом навколишнього середовища та в клінічній діагностиці грають такі методи, як біоломінісцентний та імуноферментний аналіз.

Нині проблеми *біоконверсії енергії* та маси намагаються вирішувати біотехнологічними методами з використанням іммобілізованих ферментів при фотолізі води та біоелектрокаталізі, у створенні паливних елементів.

Перспективним є й використання іммобілізованих ферментів у процесах переробки лігніноцелюлозної сировини.

Імобілізовані ферменти можуть застосовуватися також як штучні підсилювачі слабких сигналів. На активний центр імобілізованого ферменту можна подіяти через носій, піддаючи його ультразвуковому обробленню чи фотохімічним перетворенням. Це дозволяє регулювати каталітичну активність системи фермент-носій під дією механічних, ультразвукових і світлових сигналів. На цій основі були створені механічно- і звукочутливі датчики та відкритий шлях до створення безсрібної фотографії.

На сьогодні найінтенсивніше розвивається використання імобілізованих ферментних препаратів у медицині.

Основними напрямками ензимотерапії є:

- 1) ліквідація дефіциту ферментів з метою компенсації вродженої чи набутої функціональної нестачі;
- 2) видалення нежиттєздатних, денатурованих структур, клітинних і тканинних осколків;
- 3) лізис тромбів;
- 4) комплексна терапія злоякісних новоутворень;
- 5) детоксикація організму.

Імобілізовані ферменти відкрили шлях до створення лікарських препаратів пролонгованої дії із зниженою токсичністю та алергенністю.

Ферментвмісні препарати за допомогою катетеризації вводять безпосередньо в м'язову тканину або в капілярну мережу ураженого органу, де імобілізовані ферменти підтримують високу локальну концентрацію. Імобілізовані на водорозчинній полісахаридній матриці тромболітичні ферменти (стрептодеказа, стрептокіназа), переносяться в місце розміщення тромбу та ефективні в меншій дозі.

Перспективним є одержання біологічно активних полімерів медичного призначення спільною імобілізацією протеолітичних ферментів та антимікробних речовин з метою створення лікарських препаратів поліфункціональної дії. Розроблені технології створення інтерактивних ранових медичних пов'язок, отриманих імобілізацією ферментів та ліків на діальдегід целюлози.

Однією з основних задач при одержанні медичних препаратів на основі імобілізованих ферментів є створення системи лікарських засобів зрегульованою фармакокінетикою (*вивчає закономірності всмоктування, розподілу, метаболізму і виділення (екскреції) лікарських препаратів*). З цією метою використовують включення ферментів у мікрокапсули, в тому числі і в ліпосоми.

Залежно від фізичних параметрів фосфоліпідів (заряду, рідини, розміру) ліпосоми проникають у клітину ендоцитозом або за рахунок злиття з природними мембранами. При ендоцитозі фосфоліпідна оболонка ліпосом у середині клітин руйнується фосфоліпазами і ферменти вивільняються в цитоплазму; при злитті з клітинною мембраною фосфоліпідний комплекс ліпосом входить до складу клітинних мембран, активна субстанція потрапляє в цитоплазму.

Спрямованість дії ліпосом може бути змінена за рахунок складу компонентів, що утворюють мембрану, спорідненість ліпосом до клітин-мішеней посилена специфічними чинниками (антитілами та ін.).

Пігулки і гранули ферментних препаратів (трипсину, лізоциму, лужної фосфатази, каталази та ін.) отримують у суміші з біосумісними полімерами.

Імплантований у зону ураження або поблизу від неї фермент, що знаходиться в полімері, практично повністю захищений від дії агресивного фізіологічного середовища. З полімеру фермент виходить у нативному стані, швидкість його подальшої інактивації і виведення аналогічна нативному ферменту, що використовується традиційним способом. Ліпосомні препарати ефективні при лікуванні інфаркту мозку та ішемічній хворобі серця.

Існують перспективні дослідження мультиферментних мікрокапсул, які імітують клітини живого організму. Створено препарати пролонгованої дії (тромболітичні, фібринолітичні, протеолітичні) для лікування серцево-судинних захворювань, тромбозів, тромбоемболій, інфарктів міокарда. Стерильний апірогенний розчин іммобілізованих на поліетилен оксидіпротеаз може використовуватися в медицині і ветеринарії при отриманні ін'єкційних препаратів іммобілізованих ферментів; ліпази, іммобілізовані на твердих носіях, – при лікуванні різних захворювань шлунково-кишкового тракту та порушенні жирового обміну.

Одним із способів збільшення продуктивності безперервних мікробіологічних процесів і отримання високої щільності клітинної культури є використання *іммобілізованих клітин*. Іммобілізовані клітини зберігають проліферативну функцію як безпосередньо після іммобілізації, так і після тривалого використання в біотехнологічних процесах. При цьому кінетичні характеристики росту (питома швидкість росту і час подвоєння) іммобілізованих клітин істотно не відрізняються від аналогічних характеристик вільних клітин.

Іншою важливою характеристикою іммобілізованих клітин, що відрізняє їх від вільних клітин, є тривала функціональна активність. Існує припущення, що носій грає роль захисного бар'єру для іммобілізованих клітин, «екрануючи» їх від негативного впливу метаболітів і перешкоджаючи їх проникненню в матрицю.

За допомогою іммобілізованих мікроорганізмів реалізуються процеси, в яких, використовуючи природні (або придбані) властивості клітин, можна довго підтримувати на постійному рівні їх синтетичну активність, спрямовану на утворення необхідного продукту.

Стерильність мікробіологічного виробництва – проблема, реалізація якої вимагає значних капіталовкладень. При експлуатації іммобілізованих клітин вимоги до стерильності виробництва дещо знижуються і в цьому випадку з'являється ряд переваг.

По-перше, процеси, в яких можна використовувати іммобілізовані клітини, як правило, реалізуються в тривалому проточному режимі (зменшується число маніпуляцій з вільними клітинами, а також проточність

системи реактора не дає можливості спорам і одиничним мікроорганізмам, які розмножуються, в нього потрапляти).

По-друге, висока концентрація мікроорганізмів, що активно здійснюють метаболічні процеси, створює несприятливі умови для розмноження поодиноких клітин сторонньої мікрофлори.

По-третє, якщо іммобілізація проведена шляхом включення в будь-який гелевий носій, то сторонні мікроорганізми в матрицю носія, як правило, не потрапляють.

Використання іммобілізованих мікроорганізмів має і екологічний аспект. Періодичне і безперервне культивування мікроорганізмів для виробництва різних речовин призводить до того, що корисний продукт утворюється при регулярному нарощуванні біомаси, що не утилізується і є відходом. Будь-які, навіть непатогенні мікроорганізми, при досить високій концентрації погіршують екологію повітря, води, ґрунту, можуть викликати алергічні захворювання у людей і т. д. Заміна вільно культивованих клітин на іммобілізовані позбавляє від необхідності регулярного нарощування біомаси.

Слід зазначити, що пріоритет в області іммобілізації клітин належить не вченим, а природі. У природі більшість мікроорганізмів знаходиться (на тій чи іншій стадії розвитку) в закріпленому стані на поверхні тіла тварин, рослин, у воді, в гірських породах і особливо в ґрунті. Без адгезії мікроорганізми не могли б існувати у природі. Вона є важливою екологічною рисою існування мікроорганізмів. Так, у ґрунті адгезія дозволяє мікроорганізмам утримуватись у ґрунтовому профілі і не вимиватись у нижні горизонти. Крім того, адгезовані клітини знаходяться на межі розділу твердого тіла і рідини, де зосереджені основні поживні речовини. Розкладання рослинних решток, деяких мінералів теж відбувається лише при адгезії мікроорганізмів.

Явище *адгезії* (іммобілізація цілих мікробних клітин) на різних носіях почали використовувати дуже давно. Ще більше 150 років тому в Німеччині використовували закріплені на буковій стружці бактерії для виробництва оцту. В 1857 р. Луї Пастер наголошував, що додавання адсорбентів стимулює спиртове бродіння.

Однією з перших робіт, яка започаткувала використання в області інженерної ензимології поряд з ферментами безпосередньо клітин, є робота шведських дослідників К. Мосбаха і П. Ларссона, опублікована в 1970 р.

Перший промисловий процес з використанням іммобілізованих клітин здійснено в 1973 році. Відома японська фірма «Танабе Сейяко» за допомогою іммобілізованих у поліакриламідному гелі клітин *Escherichia coli* здійснила процес одержання аспарагінової кислоти з фумарової кислоти. З 1974 року фірма "Танабе Сейяко" (Японія) приступила до промислового виготовлення яблучної кислоти з використанням включених в ПААГ клітин *Brevibacterium ammoniagenes*. У 1978 році ПААГ був замінений каррагінаном, що дозволило збільшити ефективність біокатализатора в 2,3 рази, а заміна штаму на більш активний збільшила цей показник ще в 5 разів. Це призвело до того, що стало можливим за допомогою одноразового приготування гранул отримувати в безперервних умовах до 100 т яблучної кислоти.

Тепер існує більше десятка біотехнологічних процесів, у яких використовуються іммобілізовані клітини (синтез амінокислот, органічних кислот, антибіотиків).

Ферментативна активність іммобілізованих клітин використовується також при очищенні стічних вод, особливо від токсичних сполук, наприклад фенолу, бензолу, гексаметилендіаміну.

Можлива також деградація і неприродних речовин, таких як циклічний димер амінокапронової кислоти, який міститься у стічних водах з нейлонового виробництва. Створені пілотні установки, в яких використовується суміш адсорбованих мікроорганізмів, що здійснюють денітрифікацію стічних вод, а також вилучення з них важких металів. Показана можливість використання цілих клітин *Algaligenes eutrophus*, іммобілізованих в альгінатний або карагінановий гель, для очищення стічних вод від тритію. 10 г клітин (сиря біомаса) еквівалентні 1 г платинового каталізатора.

Іммобілізовані клітини використовуються для обробки не тільки стічних вод, але й органічних відходів. Реактор з адсорбованими клітинами в анаеробних умовах діяв два роки. Одержаний біогаз містив 90% метану і менше 5% CO₂.

Для іммобілізації можуть використовуватись клітини у різному стані: живі і пошкоджені різною мірою. Одностадійні реакції можуть здійснювати і живі, і пошкоджені клітини. Поліферментні реакції проводять з використанням живих клітин, які тривалий час можуть регенерувати АТФ та інші коферменти (НАД, НАДФ).

Ще більш придатні іммобілізовані мікроорганізми для багатоступеневих процесів. Наприклад, широкі можливості відкриваються при виробництві спирту за допомогою іммобілізованих дріжджів. Етанол утворюється з глюкози в анаеробних умовах в результаті багатоступінчастої реакції, в якій використовуються системи регенерації АТФ і НАДФ. Японська компанія "Киова Хакко" тривалий час на дослідних заводських установках (колонки загальним обсягом 4000 л) з іммобілізованими клітинами дріжджів отримує 2400 л спирту в день з цукрово-очеретяної меляси. Продуктивність такого повністю автоматизованого процесу в 20 разів вище порівняно з традиційними реакторами періодичної дії, причому витрати на електроенергію і робочу силу істотно нижче. З 20% розчину глюкози за 2,5 години утворюється приблизно 13% розчин спирту.

Можливості іммобілізованих клітин великі. Їх можна використовувати практично в усіх відомих сьогодні біотехнологічних процесах. Порівняно зі вільноживучими клітинами, іммобілізовані клітини мають у більшості випадків явні переваги. Наприклад, при виробництві аспарагінової кислоти з фумарової за допомогою іммобілізованих клітин витрати виробництва знизилися на 40% тільки завдяки підвищенню продуктивності праці, економії фондів заробітної плати, автоматизації та підвищення виходу продукту.

Чи означає це, що іммобілізовані клітини витіснять ферменти з промисловості? Треба ретельно зважити, в яких випадках слід віддати перевагу іммобілізованим ферментам, а в яких – іммобілізованим клітинам. Переваг

іммобілізованих клітин неможна не бачити. Вони полягають насамперед у тому, що відпадає необхідність в очищенні ферментів, причому активність і стабільність іммобілізованих клітин дуже високі, з їх участю легко здійснюються багатоступінчасті процеси, при яких потрібна регенерація коферментів. Однак, за участю іммобілізованих клітин не вдається розщепити високомолекулярні субстрати (наприклад, крохмаль, целюлозу), оскільки вони не можуть подолати такого бар'єру, як клітинна мембрана. В цьому випадку можна було б одночасно використовувати клітини і позаклітинні ферменти. Для аналітичних цілей можна підключити іммобілізовані клітини до сенсорів. Однак час вимірювання за допомогою бактеріальних сенсорів значно більше, ніж у разі ферментних, внаслідок тривалої дифузії субстрату через мембрани клітин. Крім того, бактеріальні сенсори менш чутливі і часто не настільки специфічні, як ферментні сенсори. Це робить бактеріальні сенсори особливо зручними при визначенні таких складних параметрів, як, наприклад, загальна кількість сполук, що піддаються біологічній деградації. Для контролю стану навколишнього середовища при визначеннях вмісту кисню в стічних водах в Японії – використовують мікробіологічний сенсор. Такий аналіз займає всього кілька хвилин замість 5 днів, необхідних при традиційному визначенні. Недоліком мікроорганізмів є те, що на відміну від ізольованих ферментів це складні системи, причому в результаті того, що в них відбувається обмін речовин можуть утворитися побічні продукти, які повинні бути згодом видалені. Крім того, при застосуванні ферментів на 1 г носія можна іммобілізувати приблизно в 10 разів більшу активність, ніж при іммобілізації клітин, тобто при тій же кількості носія перетворити більше субстрату.

Таким чином, іммобілізовані клітини в найближчому майбутньому не зможуть замінити іммобілізовані ферменти. Швидше, обидві форми іммобілізованих на носіях біокатализаторів, доповнюючи один одного, будуть відігравати важливу роль у промисловості майбутнього.

Список використаних джерел

1. Біотехнологія в агросфері: навч. посіб. / Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. ; Кабінет Міністрів України, Нац. ун-т біоресурсів і природокористування України. Вінниця: Нілан, 2014. 265 с.
2. Біотехнологія: Підручник / В.Г. Герасименко, М.О. Герасименко, М.І. Цвіліховський та ін.; Під общ. ред. В.Г. Герасименка. Київ : Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.
3. Буценко, Л.М., Пенчук Ю. М., Пирог Т. П. Технології мікробного синтезу лікарських засобів: навч. посібник. Київ : НУХТ, 2010. 323 с.
4. Екологічна біотехнологія. У 2 кн. : навч. посіб. Кн. 1 / [О. В. Швед, Р. О. Петріна, О. З. Комаровська-Порохнявець, В. П. Новіков]. - Львів: Львівська політехніка, 2018. 424 с.
5. Карпов О.В., Демидов С. В., Кир'яченко С. С. Клітинна та генна інженерія : Підручник. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. 208 с.
6. Конспект лекцій з дисципліни «Промислова та екологічна біотехнологія» для студентів очної форми навчання та після дипломної освіти зі спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія першого (бакалаврського) рівня /Укладач: Корнієнко І. М. – Кам'янське: ДДТУ, 2017. 119с.
7. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л., Бородай В. В., Коломієць Ю. В. Загальна (промислова) біотехнологія: навчальний посібник. Київ : ФОП Корзун, 2014. 252 с.
8. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин : Підручник для студ. вищ. навч. Закладів. Київ : Поліграфконсалтинг, 2003. 520 с.
9. Основи біотехнології: монографія / І. В. Бондар, В. М. Гуляєв ; М-во освіти і науки України, Дніпродзержин. держ. техн. ун-т. Дніпродзержинськ, 2009. 211 с.
10. Основи біотехнології: Навч. посіб. / В. О. Слободян; Ін-т менеджменту та економіки. Івано-Франківськ, 2002. 188 с.
11. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія : підручник. Київ : НУХТ, 2009. 336 с.
12. Пляцук Л. Д., Черниш Є. Ю. Екологічна біотехнологія : принципи створення біотехнологічних виробництв : навчальний посібник. Суми : Сумський державний університет, 2018. 293 с
13. Промислові біотехнології. Курс лекцій. Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника. Івано-Франківськ, Супрун В.П., 2018. 197с.
14. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навчальний посібник. Миколаїв : Миколаївський ДАУ, 2012. 380с.
15. Юлевич О. І., Луговий С. І., Каратеева О. І., Баркарь Є. В. Біотехнології та біоінженерія. Вступ до фаху : навчальний посібник. Миколаїв : МНАУ, 2022. 285 с.

Промислова біотехнологія

Курс лекцій

Укладач: **Юлевич** Олена Іванівна

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 5,4.

Тираж 20 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Паризької Комуни, 9

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